

# DETEKSI BAKTERI PEMBENTUK AMINA BIOGENIK PADA IKAN *SCOMBRIDAE* MELALUI GEN PENYANDI DAN PRIMER SPESIFIK SECARA *MULTIPLEX-PCR*

**RIZSA MUSTIKA PERTIWI**



**TEKNOLOGI HASIL PERAIRAN  
SEKOLAH PASCASARJANA  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2021**

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



IPB University  
Bogor Indonesia

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
  2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Perpustakaan IPB University



**@Hak cipta milik IPB University**

**IPB University**



**IPB University**  
— Bogor Indonesia —

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



## PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA\*

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis berjudul Deteksi Bakteri Pembentuk Amina Biogenik pada Ikan *Scombridae* Melalui Gen Penyandi dan Primer Spesifik Secara *Multiplex*-PCR adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Januari 2021

*Rizsa Mustika Pertiwi*  
NIM C351180111

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.  
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



## RINGKASAN

RIZSA MUSTIKA PERTIWI. Deteksi Bakteri Pembentuk Amina Biogenik pada Ikan *Scombridae* Melalui Gen Penyandi dan Primer Spesifik Secara *Multiplex*-PCR. Dibimbing oleh MALA NURILMALA dan ASADATUN ABDULLAH.

Amina biogenik merupakan komponen basa nitrogen yang terbentuk oleh dekarboksilasi asam amino. Amina biogenik yang sering terdeteksi pada produk perikanan di antaranya histamin, tiramin dan kadaverin yang dihasilkan oleh bakteri. Deteksi bakteri dapat dilakukan melalui gen penyandi yang dihasilkan bakteri pembentuk amina biogenik serta deteksi melalui spesifik bakteri pembentuknya. Gen pengkode dekarboksilasi asam amino tersebut yaitu *histidine decarboxylase (hdc)*, *tyrosine decarboxylase (tdc)* serta *lysine decarboxylase (ldc)*. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi gen *hdc*, *tdc* dan *ldc* menggunakan *multiplex* PCR dan mengidentifikasi bakteri pembentuk amina biogenik pada ikan *scombridae*.

Sampel yang digunakan yaitu ikan tuna beku, tongkol beku, cakalang beku, tuna loin, pindang potong dan pindang bumbu kuning. Ikan tuna yang disimpan pada suhu ruang selama 3 hari sebagai kontrol positif, kontrol negatif berupa ddH<sub>2</sub>O dan media *enrichment*. Penelitian terdiri dari *enrichment* bakteri pada media *lactose broth* dan *marine broth*, isolasi DNA sampel daging ikan dan hasil *enrichment*, uji kemurnian dan konsentrasi isolat, amplifikasi gen target *hdc*, *tdc*, *ldc* menggunakan *multiplex* PCR, sekuensing, analisis bioinformatika bakteri pembentuk amina biogenik, desain primer dan amplifikasi spesifik bakteri *Morganella morganii* dan *Carnobacterium divergens* sebagai pembentuk amina biogenik menggunakan *multiplex* PCR.

Hasil yang diperoleh yaitu isolat DNA bakteri dengan rasio kemurnian (A<sub>260</sub>/280) yaitu 1,49-2,17 serta konsentrasi isolat 15,75-461,75 ng/μL. *Marine broth* merupakan media *enrichment* terpilih yang dapat mengamplifikasi 3 gen target *hdc*, *tdc* dan *ldc* menggunakan *multiplex* PCR. Gen *tdc*, *hdc* dan *ldc* teramplifikasi menggunakan *multiplex* PCR pada sampel tuna beku, pindang potong dan pindang bumbu kuning. Bakteri pembentuk amina biogenik histamin (gen *hdc*) yang teridentifikasi pada sampel tuna beku dan pindang potong yaitu *Acinetobacter baumannii* sedangkan pada pindang bumbu kuning yaitu *Morganella morganii*. Bakteri pembentuk tiramin (gen *tdc*) pada tuna beku, pindang potong dan pindang bumbu kuning yaitu *Enterobacter cloacae*. Bakteri pembentuk kadaverin (gen *ldc*) pada tuna beku dan pindang bumbu kuning teridentifikasi *Enterobacter cloacae* sedangkan pada pindang potong yaitu *Enterobacter hormaechei*. Primer spesifik bakteri *M. morganii* dan *C. divergens* sebagai pembentuk amina biogenik ditemukan pada seluruh sampel ditandai dengan teramplifikasi menggunakan *multiplex* PCR.

Kata kunci: *Carnobacterium divergens*, *hdc*, *Morganella morganii*, *ldc*, *tdc*



## SUMMARY

RIZSA MUSTIKA PERTIWI. Detection of Biogenic Amine Producing Bacteria in *Scombridae* Fish based on Multiplex PCR the Coding Genes and Specific Primers. Supervised by MALA NURILMALA dan ASADATUN ABDULLAH.

Biogenic amines are nitrogenous base components formed by amino acid decarboxylation. Biogenic amines that are often detected in fishery products are histamine, tyramine and cadaverine which are produced by bacteria. Bacterial detection can be carried out by coding genes and specific forming bacteria. The amino acid decarboxylation coding genes are histidine decarboxylase (*hdc*), tyrosine decarboxylase (*tdc*) and lysine decarboxylase (*ldc*). The purpose of this study aims to detection *hdc*, *tdc* and *ldc* gene using multiplex PCR and identification of biogenic amine producing bacteria in *scombridae* fish.

The specimens used were frozen tuna, little tuna, skipjack and loin tuna. In addition, Indonesian traditional tuna such as *pindang potong*, *pindang bumbu* were observed. Tuna stored at room temperature for 3 days as positive control, ddH<sub>2</sub>O, medium pre-enrichment as control negative. The study consisted of the pre-enrichment stage of bacteria on lactose broth and marine broth medias, DNA isolation (sample with and non pre-enrichment), purity test and isolate concentration of target gene of *hdc*, *tdc*, *ldc* using multiplex PCR, sequencing, bioinformatics analysis of biogenic amine forming bacteria, desain and detection *Morganella morganii* and *Carnobacterium divergens* as histamine and tyramine forming bacteria.

The result obtained were generally in a good quality of bacterial DNA isolates, ratio A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>: 1.49-2.17 with concentration ranged between 15.75-157.84 ng/μL. Marine broth is a selected enrichment medium that can amplify *hdc*, *tdc* and *ldc* using *multiplex* PCR. The *tdc*, *hdc* and *ldc* genes were amplified using multiplex PCR on samples of frozen tuna, *pindang potong* and *pindang bumbu*. The histamine forming bacteria identified in frozen tuna and *pindang potong* was *Acinetobacter baumannii*, while on *pindang bumbu* was *M. morganii*. Tyramine forming bacteria in frozen tuna, *pindang potong* and *pindang bumbu* is *Enterobacter cloacae*. Cadaverin forming bacteria in frozen tuna and *pindang bumbu* is *Enterobacter cloacae*, while those on *pindang potong* is *Enterobacter hormaechei*. Specific primer *M. morganii* and *C. divergens* successfully amplified on all samples using multiplex PCR.

**Keywords:** *Carnobacterium divergens*, *hdc*, *Morganella morganii*, *ldc*, *tdc*



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2021  
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

*Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.*

*Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.*



# **DETEKSI BAKTERI PEMBENTUK AMINA BIOGENIK PADA IKAN *SCOMBRIDAE* MELALUI GEN PENYANDI DAN PRIMER SPESIFIK SECARA *MULTIPLEX-PCR***

**RIZSA MUSTIKA PERTIWI**

Tesis  
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Magister Sains pada  
Program Studi Teknologi Hasil Perairan

**TEKNOLOGI HASIL PERAIRAN  
SEKOLAH PASCASARJANA  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2021**

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
  2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



**@Hak cipta milik IPB University**

**IPB University**

**Tim Penguji pada Ujian Tesis:**

- 1. Dr. Kustiariyah, S.Pi M.Si**
- 2. Dr. Ir. Iriani Setyaningsih, MS**



**IPB University**  
— Bogor Indonesia —

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
  2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.






**Judul Tesis** : Deteksi Bakteri Pembentuk Amina Biogenik pada Ikan *Scombridae* Melalui Gen Penyandi dan Primer Spesifik Secara *Multiplex-PCR*  
**Nama** : Rizsa Mustika Pertiwi  
**NIM** : C351180111

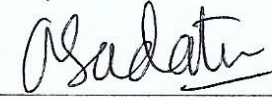
@Hak cipta milik IPB University

Disetujui oleh  
Komisi Pembimbing

**Pembimbing 1:**  
Dr. Mala Nurilmala, S.Pi M.Si

---

---

**Pembimbing 2:**  
Dr. Asadatun Abdullah, S.Pi M.S.M M.Si

Diketahui oleh

**Ketua Program Studi:**  
Dr. Ir. Wini Trilaksani, M.Sc  
NIP 19610128 198601 2 001

---

**Dekan Sekolah Pascasarjana:**  
Prof. Dr. Ir. Anas Miftah Fauzi, M.Eng  
NIP 19600419 198503 1 002

---

**Tanggal Ujian:**  
4 Desember 2020

**Tanggal Lulus:** 29 JAN 2021



@Hak cipta milik *IPB University*

IPB University



IPB University  
— Bogor Indonesia —

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

## PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah *subhanaahu wa ta'ala* atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga tesis ini berhasil diselesaikan. Penelitian ini dilaksanakan sejak bulan Desember 2019 sampai bulan Juli 2020 dengan judul Deteksi Bakteri Pembentuk Amina Biogenik pada Ikan *Scombridae* Melalui Gen Penyandi dan Primer Spesifik Secara *Multiplex-PCR*.

Penulis ucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Mala Nurilmala, S.Pi M.Si dan Dr. Asadatun Abdullah, S.Pi M.S.M M.Si selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan, arahan, dukungan, semangat, pengertian dan perhatian kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan tesis ini.
2. Dr. Ir. Iriani Setyaningsih, MS selaku dosen gugus kendali mutu (GKM) dan Dr. Kustiariyah, SPi MSi selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan dan arahan sehingga tesis ini dapat disajikan lebih baik.
3. Dr. Ir. Wini Trilaksani, M.Sc selaku Ketua program studi THP yang telah membantu dalam penyelesaian studi.
4. Prof. Dr. Ir. Nurjanah, M.S, Prof. Dr. Tati Nurhayati, S.Pi M.Si, Dr. Eng. Uju, S.Pi M.Si serta seluruh staf pendidik dan kependidikan departemen Teknologi Hasil Perairan yang memberikan dukungan dan kesempatan berharga selama saya berada di Departemen dan menjalani proses pendidikan ini.
5. Mamah, Apih, Tete dan seluruh keluarga besar yang selalu memberikan dorongan semangat serta untaian doa selama saya menempuh pendidikan.
6. Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah mendanai penelitian ini pada program hibah Sistem Inovasi Nasional melalui Peningkatan Sinergi (INSINAS) tahun 2018-2019 atas nama Dr. Mala Nurilmala S.Pi M.Si, serta tim yang telah bekerjasama menyelesaikan kegiatan dengan baik.
7. Rekan penelitian biomolekuler, teman-teman, kerabat serta sahabat yang hadir untuk menemani saya selama menempuh pendidikan ini.
8. Terima kasih penulis sampaikan juga kepada semua pihak yang telah membantu penyelesaian tesis ini.

Semoga tesis ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, Januari 2021

Rizsa Mustika Pertiwi  
NIM C351180111



## DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xii
PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.5 Ruang Lingkup Penelitian	3
II METODE	4
2.1 Waktu dan Tempat	4
2.2 Alat dan Bahan	4
2.3 Prosedur Penelitian	4
2.3.1 Preparasi sampel	5
2.3.3 Isolasi DNA bakteri dengan kit komersial	5
2.3.4 Elektroforesis isolat	7
2.3.5 Pengukuran kemurnian dan konsentrasi isolat	7
2.4.5 Desain primer spesifik <i>M. morganii</i> dan <i>C. divergens</i>	7
2.3.6 Deteksi bakteri pembentuk amina biogenik menggunakan amplifikasi PCR	8
2.3.7 Analisis bionformatika	9
2.4 Analisis Data	10
III HASIL DAN PEMBAHASAN	11
3.1 Elektroforegram Isolat DNA	11
3.2 Kemurnian dan Konsentrasi Isolat DNA	12
3.2 Gen Pengkode Amina Biogenik	15
3.3 Primer Spesifik <i>M. morganii</i> dan <i>C. divergens</i>	18
3.4 Bakteri Spesifik Pembentuk Amina Biogenik	19
3.4.1 <i>Singleplex</i> PCR <i>M. morganii singleplex</i>	19
3.4.2 <i>Singleplex</i> PCR <i>C. divergens singleplex</i>	21
3.4.3 <i>Multiplex</i> PCR <i>M. morganii</i> dan <i>C. divergens</i>	22
3.5 Bakteri Pembentuk Amina Biogenik Hasil Analisis Bioinformatika	23
IV SIMPULAN DAN SARAN	27
4.1 Simpulan	27
4.2 Saran	27
DAFTAR PUSTAKA	28
LAMPIRAN	34

Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.  
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

**DAFTAR TABEL**

1 Spesifik primer PCR	8
2 Komposisi PCR <i>mix</i> untuk primer gen <i>hdc</i> dan spesifik bakteri	9
3 Kemurnian isolat DNA	12
4 Konsentrasi isolat DNA	13
5 Hasil evaluasi primer spesifik bakteri	18
6 Spesies bakteri pembentuk amina biogenik	24

**DAFTAR GAMBAR**

1 Diagram alir penelitian	6
2 Elektroforegram isolat DNA	11
3 Elektroforegram gen pengkode amina biogenik	15
4 Elektroforegram multiplex PCR	17
5 Elektroforegram <i>singleplex</i> PCR bakteri <i>M. morgani</i>	20
6 Elektroforegram <i>singleplex</i> PCR bakteri <i>C. divergens</i>	21
7 Elektroforegram <i>multiplex</i> PCR bakteri	22
8 Pohon filogenetik	25

**DAFTAR LAMPIRAN**

1 Dokumentasi sampel penelitian	35
2 Isolasi DNA menggunakan KIT TianAmp	36
3 Langkah desain primer spesifik <i>M. morgani</i>	37
4 Langkah desain primer spesifik <i>C. divergens</i>	38
5 <i>Screenshot</i> hasil BLAST spesies bakteri	39





**@Hak cipta milik IPB University**

**IPB University**



**IPB University**  
— Bogor Indonesia —

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

# I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Ikan *scombridae* merupakan salah satu *famili* yang populer di dunia perikanan, di antaranya tuna, tongkol dan cakalang (TTC). Ekspor ikan *scombridae* menempati urutan kedua setelah udang dengan peningkatan 8,9% pada periode Januari-September 2018 (Sholeh 2018). Pemasaran ikan *scombridae* yaitu dalam bentuk segar utuh, beku utuh, diawetkan dan potongan (filet) (Rosiana 2015). Tahun 2018 ikan *scombridae* menyumbang devisa sebesar 713,9 Juta USD dengan volume ikan yang diekspor yaitu 168,4 ribu ton (14,96%) dari total nilai ekspor hasil perikanan (Hariono 2019). Produk olahan ikan *scombridae* yaitu pindang merupakan salah satu olahan yang banyak diminati oleh pasar dalam negeri terutama di daerah Jawa Barat (Thaheer *et al.* 2015), namun dapat juga ditemukan di daerah lain yaitu di Pelabuhan Ratu, Sukabumi (Mumpuni *et al.* 2018), Banyuwangi (Anggraeni *et al.* 2019) dan daerah lainnya.

Kelemahan pemasaran ikan *scombridae* adalah sering terjadi keracunan yang disebabkan oleh *scombrotxin*. *Scombrotxin* yaitu amina biogenik berupa racun alami yang terdapat pada ikan air laut terutama famili *scombridae*, terdiri dari histamin, putresin, kadaverin, tiramin dan agmatin. Laporan keracunan pangan di Indonesia yang disebabkan oleh kandungan histamin pada tahun 2000-2005 yaitu 12 kasus (6,7%) (Arisanti *et al.* 2008). Wilayah Jember pada pergantian tahun 2019-2020 terjadi kasus keracunan histamin yang menyebabkan pasien menderita sakit kepala, mual, gatal-gatal dan ada yang sampai tidak kuat untuk berjalan. Keracunan tersebut terjadi setelah konsumsi ikan tongkol bakar dengan kadar histamin 107,38-190,65 ppm. Kandungan histamin pada ikan terakumulasi akibat penanganan ikan yang kurang baik (Wahyunik 2020).

Batas toleransi amina biogenik telah ditetapkan sebagai standar untuk menjaga keamanan konsumen baik untuk pasar dalam negeri ataupun ekspor. Standar toleransi histamin yang diperbolehkan yaitu maksimal 100 mg/kg (BSN 2013), 50 mg/kg (FDA 2011) 15 mg/kg (FAO 2012), tiramin 100-800mg/kg, kadaverin 1690 mg/kg dan putresin 337 mg/kg (EFSA 2011). Amina biogenik bukan terbentuk alami pada produk perikanan, melainkan melalui proses dekarboksilasi asam amino histidina, ornitina, lisina dan arginina setelah ikan mati yang disebabkan oleh bakteri.

Bakteri pembentuk amina biogenik histamin di antaranya *Morganella morganii*, *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., (Kim *et al.* 2013, Nitta *et al.* 2016, Ibrahim *et al.* 2017, Arulkumar *et al.* 2018). Bakteri pembentuk tiramin salah satunya *Carnobacterium divergens* (Abdullah *et al.* 2020). Bakteri pembentuk kadaverin di antaranya *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Cronobacter* (Fadhlaoui-Zid *et al.* 2012), *Klebsiella pneumonia* (Yang *et al.* 2020). Bakteri-bakteri tersebut mengandung enzim tertentu yang dapat menyandikan pembentukan amina biogenik pada proses dekarboksilase. Gen penyandi amina biogenik yang dimaksud yaitu *histidine decarboxylase (hdc)* sebagai penyandi pembentukan histamin, *ornithine decarboxylase (odc)* sebagai penyandi pembentukan ornitin, *tyrosin decarboxylase (tdc)* sebagai penyandi pembentukan tiramin dan *lysine decarboxylase (ldc)* sebagai penyandi pembentukan kadaverin.

Deteksi dini pembentukan amina biogenik secara molekuler dilakukan untuk mencegah akumulasi amina biogenik pada produk. Teknik yang telah dilakukan salah satunya menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Deteksi amina biogenik secara PCR dapat dilakukan melalui amplifikasi marka molekuler 16S rRNA untuk bakteri pembentuknya, melalui primer spesifik bakteri atau gen penyandi enzim yang dihasilkan oleh bakteri pembentuk amina biogenik tersebut. Deteksi yang telah dilakukan pada ikan *scombridae* yaitu menggunakan teknik *singleplex* PCR. Nurilmala *et al.* (2019) melaporkan bahwa gen *hdc* teramplifikasi pada ikan tongkol abu-abu dengan bakteri yang terdeteksi yaitu *Enterobacter* sp., namun teknik PCR yang belum optimal. Nurilmala (2020) berhasil mengamplifikasi gen *hdc* pada ikan TTC (*scombridae*) dengan *enrichment* bakteri pada media *lactose broth*. Abdullah *et al.* (2020) mengaplikasikan teknik *end-point* PCR untuk mendeteksi gen *tcd* pada ikan *scombridae*. Nadya (2019) melakukan deteksi amina biogenik pada ikan *scombridae* melalui gen *ldc* dan *odc* dengan *enrichment* pada media *lactose broth* namun deteksi *odc* belum berhasil diamplifikasi.

*Enrichment* diperlukan untuk menumbuhkan bakteri pembentuk amina biogenik lebih banyak. Media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri pembentuk amina biogenik yaitu *lauryl sulfate tryptose* (LST) *broth*, *brilliant green lactose bile* (BGLB) *broth* dan *lactose broth* (Simora *et al.* 2018) dan *marine broth* (Björnsdóttir-Butler *et al.* 2011). Oleh karena itu pada penelitian ini juga membandingkan media yang digunakan untuk *enrichment* bakteri pembentuk amina biogenik dengan baik.

Teknik deteksi amina biogenik lain yang dapat digunakan antaralain menggunakan *multiplex* PCR. Perbandingan *singleplex* dan *multiplex* PCR terletak pada primer yang digunakan saat reaksi, *multiplex* PCR dapat digunakan untuk beberapa pasang primer sehingga dapat menghemat waktu kerja di laboratorium. *Multiplex* PCR telah digunakan untuk menentukan genetika populasi, garis keturunan, identifikasi spesies dan keamanan pangan (Sint *et al.* 2012). Aplikasi teknik *multiplex* PCR pada produk makanan di antaranya deteksi bakteri pembentuk amina biogenik pada minuman beralkohol dan produk fermentasi (Poveda *et al.* 2017, Diez-Ozaeta *et al.* 2019, Cousin *et al.* 2019, Yazgan *et al.* 2020, Xiong *et al.* 2020). Gen *hdc*, *tdc* dan *odc* dari isolat bakteri teramplifikasi menggunakan teknik *multiplex* PCR dengan bakteri yang terdeteksi yaitu *K. planticola*, *Proteus vulgaris*, *P. phosphoreum*, *M. morgani* serta *Staphylococcus* sp. *Escherichia coli* dan *Serratia liquefaciens* (de las Rivas *et al.* 2005). Deteksi gen pembentuk amina biogenik secara *multiplex* PCR telah dilakukan pada produk keju tradisional Turki (Avcı dan Tuncer 2017), sosis (Maksimovic *et al.* 2018) dan fermentasi kacang kedelai (Mah *et al.* 2019).

Deteksi gen *hdc*, *tdc* dan *ldc* pada ikan *scombridae* dari perairan Indonesia secara *multiplex* PCR belum dilakukan dan perlu untuk dilakukan agar diperoleh deteksi cepat secara molekuler. Penelitian ini diharapkan dapat mendeteksi bakteri pembentuk amina biogenik pada ikan *scombridae* pada berbagai jenis produksi secara *multiplex* PCR melalui gen penyandi dan primer spesifik. Penelitian ini juga menentukan media *enrichment* yang tepat untuk bakteri pembentuk amina biogenik pada ikan *scombridae*.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



## 1.2 Perumusan Masalah

*Scambrotoxin* yaitu amina biogenik yang menjadi permasalahan utama pada pemasaran ikan *scombridae* karena menyebabkan keracunan pada konsumen. Ikan *scombridae* dipasarkan dalam keadaan segar utuh, beku utuh, potongan/filet serta olahan. Teknik molekuler yaitu PCR diharapkan mampu mendeteksi dini pembentukan amina biogenik berdasarkan keberadaan bakteri pembentuk aminanya. Deteksi dini pembentukan amina biogenik pada ikan *scombridae* pada penelitian sebelumnya hanya menggunakan teknik *singleplex* PCR, sehingga diperlukan teknik *multiplex* PCR dalam pengembangannya. *Multiplex* PCR dapat mempercepat deteksi karena dapat dilakukan pada dua atau lebih target dalam reaksi.

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan umum penelitian ini yaitu mendeteksi gen *hdc*, *tdc* serta *ldc* pada ikan *scombridae* menggunakan *multiplex* PCR dan mengidentifikasi bakteri pembentuk amina biogenik. Tujuan khusus penelitian ini yaitu:

1. Menyeleksi media *enrichment* bakteri yang dapat mengamplifikasi 3 gen pembentuk amina biogenik (*hdc*, *tdc* dan *ldc*) menggunakan teknik *multiplex* PCR pada ikan *scombridae*.
2. Mengidentifikasi bakteri pembentuk amina biogenik dari gen *hdc*, *tdc* dan *ldc* yang teramplifikasi dari teknik *multiplex* PCR.
3. Desain primer dan amplifikasi spesifik bakteri *Morganella morganii* dan *Carnobacterium divergens* sebagai pembentuk amina biogenik secara *multiplex* PCR.

## 1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan memberikan beberapa informasi yang bermanfaat di antaranya:

1. Informasi media *enrichment* bakteri pembentuk amina biogenik terbaik pada ikan *scombridae*.
2. Informasi bakteri yang teridentifikasi berdasarkan gen *hdc*, *tdc* dan *ldc* yang teramplifikasi secara *multiplex* PCR.
3. Informasi primer spesifik dan keberhasilan amplifikasi bakteri *M. morganii* dan *C. divergens* secara *multiplex* PCR sebagai pembentuk amina biogenik.

## 1.5 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup penelitian meliputi preparasi sampel, *enrichment* bakteri menggunakan media *lactose broth* dan *marine broth*, isolasi DNA sampel daging ikan dan hasil *enrichment* menggunakan kit komersial, pengukuran konsentrasi dan kemurnian dan isolat, amplifikasi gen *tdc*, *tdc* dan *ldc* secara *multiplex* PCR, desain primer spesifik bakteri pembentuk amina biogenik, amplifikasi bakteri dengan primer spesifik secara *singleplex* dan *multiplex* PCR, sekuensing dan analisis bioinformatika.

## II METODE

### 2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2019-Juli 2020. Laboratorium yang digunakan yaitu Laboratorium Karakteristik Bahan Baku Hasil Perairan, Laboratorium Mikrobiologi Hasil Perairan dan Laboratorium Biomolekuler Hasil Perairan Departemen Teknologi Hasil Perairan, Laboratorium Terpadu Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan serta Laboratorium IPB *culture Collection* Institut Pertanian Bogor.

### 2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu *freezer* (GEA), mikro sentrifuge (Corning, Amerika Serikat), *vortex* (Biosan, Latvia), *spindown* (Corning, New York, USA), UV Transilluminator (Uvitec, Cambridge, England), *microwave* (Sharp, Osaka, Japan), spektrofotomer UV-Vis, PCR konvensional (Analytic Jena, USA), elektroforesis (HU6, SCIE-PLAS, Cambridge, England).

Sampel yang digunakan yaitu ikan tuna beku, tongkol beku, cakalang beku, tuna loin, pindang potong dan pindang bumbu kuning serta ikan tuna yang disimpan selama 3 hari pada suhu ruang sebagai kontrol positif. Dokumentasi bahan yang digunakan disajikan pada Lampiran 1. Ikan beku merupakan ikan yang diperoleh dari Perairan Binuangeun Banten pada bulan Juli 2018 dan disimpan pada suhu -28 °C selama satu setengah tahun. Tuna loin dari pasar swalayan dan pindang dari warung di sekitar kampus IPB Dramaga. Bahan kimia untuk analisis yaitu media *marine broth* (MB) (Zobell Marine Broth 2216), *lactose broth* (LB) (Difco™, Becton, Dickinson and Company USA), kit isolasi DNA yang terdiri dari *proteinase K*, *buffer GA*, GB, GD, PW dan TE (TIANamp Genomic DNA Kit, TianGen Biotech, Beijing), ddH<sub>2</sub>O, TBE Buffer (AccuGENETM 10X TBE Buffer, Lonza, Rockland, ME USA), marker (VC 100 bp plus DNA ladder (VIVANTIS, Selangor Darul Ehsan, Malaysia), agaros (SeaKem®LE Agarose, Lonza, Rockland, ME USA), *cybergreen*, kapa Taq PCR (Qiagen).

### 2.3 Prosedur Penelitian

Penelitian yang dilakukan meliputi preparasi sampel, *enrichment* bakteri, isolasi DNA, elektroforesis, pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA, amplifikasi gen *hdc*, *tdc* dan *ldc* menggunakan *multiplex* PCR, desain primer spesifik bakteri *M. morganii* dan *C. divergens*, deteksi bakteri *M. morganii* dan *C. divergens* menggunakan *singleplex* dan *multiplex* PCR, sekuensing serta analisis bioinformatika. Proses PCR menggunakan mesin PCR konvensional. Gen yang teramplifikasi pada proses PCR kemudian dimurnikan dan sekuensing. Proses sekuensing digunakan untuk menentukan urutan basa penyusun DNA kemudian dianalisis bioinformatika. Analisis bioinformatika terdiri dari penyejajaran (*alignment*) sekuen yang teridentifikasi dengan nukleotida pada *GenBank* menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Hasil BLAST berupa spesies bakteri pembentuk amina biogenik lengkap dengan persentase identitas antara nukleotida bakteri yang teridentifikasi dengan yang terdapat pada *GenBank*. Susunan nukleotida spesies bakteri pembentuk amina biogenik yang dihasilkan

selanjutnya dibuat pohon filogenetik dengan cara menyejajarkan sekuen tersebut terhadap sekuen bakteri yang memiliki kemiripan dan *outgroup* dengan spesies bakteri sampel dari *GenBank*. Pembuatan pohon filogenetik untuk melihat kekerabatan bakteri pembentuk amina biogenik. Diagram alir penelitian disajikan pada Gambar 1.

### 2.3.1 Preparasi sampel

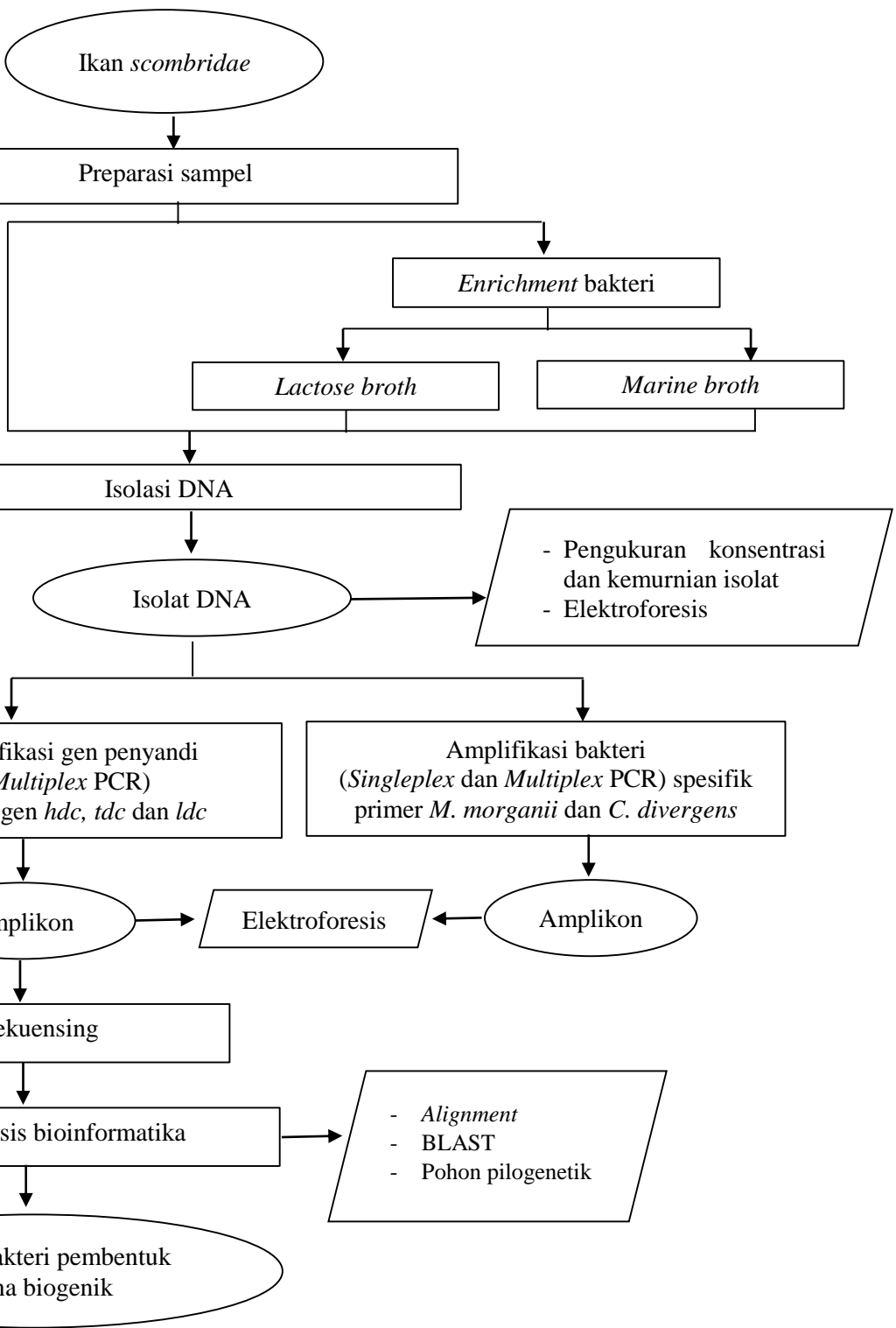
Sampel ikan tuna, tongkol dan cakalang beku berupa ikan utuh. Ikan beku kemudian disimpan pada suhu ruang kemudian sekitar 2 jam hingga dapat dipisahkan bagian daging, tulang, kulit dan jeroannya. Pindang bumbu kuning menggunakan 1 ekor utuh sedangkan pindang potong menggunakan 3 potong ikan. Kontrol positif menggunakan ikan tuna yang disimpan pada suhu ruang selama 3 hari. Kontrol positif berfungsi sebagai kontrol ikan yang sudah mengandung amina biogenik dan terdapat bakteri pembentuknya. Masing-masing daging ikan dilumatkan menggunakan blender.

### 2.3.2 *Enrichment* bakteri

*Enrichment* bakteri mengacu pada Simora *et al.* (2018) yang dimodifikasi Nurilmala *et al.* (2019). *Enrichment* menggunakan media *Lactose broth* (LB) dan *Marine broth* (MB). Ikan *scombridae* dihaluskan sebanyak 1 g ditambahkan 9 mL media MB. Sampel dalam media diinkubasi pada suhu 37 °C selama 16 jam kemudian disentrifugasi pada 13.000 g selama 3 menit. Endapan yang dihasilkan merupakan sampel yang digunakan untuk tahap selanjutnya.

### 2.3.3 Isolasi DNA bakteri dengan kit komersial

Isolasi DNA dilakukan sesuai dengan prosedur TIANamp Genomik DNA Kit Handbook. Isolasi DNA dilakukan 1 kali ulangan pada setiap sampel. Daging ikan tanpa *enrichment* diambil sebanyak 25 mg, sedangkan sampel hasil *enrichment* bakteri berupa endapan yang terdapat pada *tube* 2 mL hasil sentrifugasi. Sampel dicampur dengan 200 µL *buffer* GA dalam *tube* 2 mL, ditambahkan *proteinase* K 20 µL kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex*. Sampel yang telah homogen ditambah *buffer* GB 220 µL dan dihomogenkan kembali menggunakan *vortex* 15 detik. Campuran sampel diinkubasi pada 70 °C selama 10 menit, diendapkan menggunakan *spindown* untuk memisahkan kotoran atau sisa sampel. Filtrat dipindahkan dalam *tube* baru. Filtrat dalam *tube* baru ditambahkan etanol sebanyak 220 µL, dihomogenkan menggunakan *vortex* kemudian dipindahkan ke dalam *spin column* dan disentrifugasi pada 13.400 g selama 30 detik. Cairan yang terpisah dari kolom pemisah dibuang. *Buffer* GD sebanyak 500 µL ditambahkan ke dalam *spin column* kemudian sentrifugasi kembali pada 13.400 g selama 30 detik. Penambahan *buffer* PW ke dalam *spin column* sebanyak 600 µL kemudian disentrifugasi kembali pada 13.400 g selama 30 detik, proses penambahan *buffer* PW dilakukan sebanyak 2 kali. *Spin column* disentrifugasi kembali pada 13.400 g selama 2 menit, kemudian kolom penampung diganti dengan *tube* baru. *Buffer* TE ditambahkan sebanyak 50-100 µL ke dalam kolom dan diinkubasi selama 5 menit, kemudian disentrifugasi 13.400 g selama 2 menit. Filtrat yang terkumpul pada *tube* merupakan isolat DNA. Diagram alir isolasi DNA disajikan pada Lampiran 2.



Gambar 1 Diagram alir penelitian.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.  
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

### 2.3.4 Elektroforesis isolat

Elektroforesis digunakan untuk menyajikan produk PCR secara visual, alat yang digunakan yaitu elektroforesis horizontal sedangkan gel terbuat dari agaros (Howe 2007). Konsentrasi gel yang digunakan yaitu 1,2%, agaros sebanyak 600 mg dilarutkan dalam *buffer* TBE 50 mL (1,2%) dan dipanaskan pada suhu 130 °C. Larutan agaros pada suhu 50-60 °C dituangkan dalam cetakan, dipasangkan sisir untuk sumur sampel, disimpan pada suhu ruang hingga mengeras kemudian direndam dengan *buffer* TBE. Sampel sebanyak 3 µL dicampurkan dengan 3 µL *cybergreen* dan 3 µL *loading dye*, kemudian *loading* ke dalam sumur. *Loading* marker ke dalam sumur hanya ditambahkan *cybergreen* pada jumlah yang sama yaitu 3 µL. Elektroforesis dijalankan pada 100 Volt dan 60 mA selama 30 menit. Hasil elektroforesis diamati pada sinar UV, keberhasilan isolasi akan terbentuk pita yang berpendar, sedangkan keberadaan marker berfungsi sebagai indikator isolat panjang basa yang terlihat.

Elektroforesis dilakukan juga pada produk hasil amplifikasi PCR (amplikon PCR). Konsentrasi gel yang digunakan untuk elektroforesis amplikon gen target yaitu 1,2%. Gel yang digunakan untuk elektroforesis amplikon spesifik bakteri yaitu konsentrasi gel 2%. Konsentrasi yang lebih tinggi agar diperoleh poros gel yang lebih rapat, sehingga dapat memisahkan dengan jelas target DNA yang memiliki panjang basa lebih rendah.

### 2.3.5 Pengukuran kemurnian dan konsentrasi isolat

Pengukuran kemurnian dan konsentrasi isolat DNA menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang berteknologi nano (nanodrop) pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (Fatchiyah *et al.* 2011). Kemurnian diukur berdasarkan perbandingan nilai absorbansi 260 nm terhadap 280 nm. Panjang gelombang 260 nm digunakan karena dapat menyerap cahaya UV untuk sampel yang mengandung basa purin dan pirimidin, sedangkan panjang gelombang 280 nm untuk menyerap protein. Perbandingan nilai absorbansi tersebut mengidentifikasi kemurnian DNA terhadap protein. DNA yang murni memiliki nilai berkisar 1,8-2,0. Konsentrasi DNA dihitung dari serapan panjang gelombang 260 terhadap faktor pengencer dalam 50 µg, yaitu menggunakan rumus sebagai berikut:

$$[\text{DNA}] = \text{Å}260 \times 50 \times \text{faktor pengencer}$$

Keterangan :

Å260 = nilai absorbansi pada 260 nm

50 = larutan dengan nilai absorbansi 1,0 sebanding dengan 50 µg untai ganda DNA per mil

### 2.4.5 Desain primer spesifik *M. morgani* dan *C. divergens*

Desain primer spesifik bakteri *M. morgani* mengacu pada Sambrook dan Russell (2001) yaitu mengumpulkan sekuen DNA dari *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) yaitu *M. morgani* pada kode akses J02577.1, M62746.1, M62745.1, FJ469558.1, KP728800.1, FJ469562.1, FJ46558.1, FJ69563.1, FJ69560.1, FJ469560.1, AB083200.1, FJ469557.1, AB259290.1, KP 728802.1, KP728801.1, sekuen yang memiliki kekerabatan serta pembentuk



amina biogenik *Enterobacter aerogenes* dengan kode akses KP728798.1, 728797.1 *Raoultella* KP728806.1 dan KP728807.1 serta *Klebsiella* M62746.1. Sekuen DNA disejajarkan menggunakan *software offline bioedit* untuk mencari daerah *conserved* di wilayah awal (*forward*) dan akhir (*reverse*). Daerah *forward* dan *reverse* diuji menggunakan *oligoevaluator* untuk mencari suhu leleh (*temperature of melting/Tm*), %GC dan struktur sekunder. Primer tersebut juga dicek kembali menggunakan *software online Primer3Plus*. Langkah-langkah desain primer *M. morganii* secara manual dapat dilihat pada Lampiran 3.

Primer spesifik *C. divergens* didesain menggunakan *software online Primer3Plus* dari nukleotida dengan kode akses GenBank DQ336701.1. Langkah desain primer *C. divergens* disajikan pada Lampiran 4. Primer spesifik *M. morganii* dan *C. divergens* yang dipilih merupakan primer yang menunjukkan %GC >45% serta Tm pada primer *forward* dan *reverse* sama. Primer terpilih kemudian dipesan melalui perusahaan jasa pembuatan primer yaitu PT. Genecraft.

### 2.3.6 Deteksi bakteri pembentuk amina biogenik menggunakan amplifikasi PCR

Amplifikasi DNA dilakukan pada gen penyandi pembentuk amina biogenik (*hdc*, *tdc* dan *ldc*) dan bakteri spesifik pembentuk amina biogenik histamin (*M. morganii*) dan tiramin (*C. divergens*). Primer yang digunakan untuk deteksi gen yaitu hasil desain dari penelitian sebelumnya, sedangkan primer untuk deteksi bakteri merupakan hasil desain pada penelitian ini (Tabel 1). PCR yang digunakan merupakan PCR konvensional. Teknik amplifikasi gen menggunakan teknik *multiplex* PCR sedangkan amplifikasi bakteri spesifik dilakukan secara *singleplex* dan *multiplex* PCR.

Tabel 1 Spesifik primer PCR

Primer	Sekuen	Panjang amplikon (bp)
Gen <i>tdc</i> *		
<i>Forward</i>	TGGGGTTATGTSACCAATGG	571
<i>Reverse</i>	GTRTGGCCGTTACGYGARCC	
Gen <i>tdc</i> **		
<i>Forward</i>	TGGYTNGTNCNCARACNAARCAFTA	825
<i>Reverse</i>	ACRTARTCNACCATRTRAARTCNGG	
Gen <i>ldc</i> **		
<i>Forward</i>	TTYGAYWCNGCNTGGGTNCCNTAYAC	1098
<i>Reverse</i>	CCRTGDATRTCNGTYTCRAANCCNGG	
Bakteri <i>M. Morganii</i> ***		
<i>Forward</i>	CAAAGCTGGGGTTATGTG	196
<i>Reverse</i>	CGTCATAGTCGATTTCGC	
Bakteri <i>C. divergens</i> ***		
<i>Forward</i>	TGAATGGGATCAAATCGAAG	143
<i>Reverse</i>	AACCCATTTTATGAGGATCG	

\*Wongsariya *et al.* (2015), \*\* de las Rivas *et al.* 2006, \*\*\* hasil penelitian tesis

Bahan dalam reaksi PCR terdiri dari ddH<sub>2</sub>O, PCR *master mix*, primer untuk deteksi gen dan spesifik bakteri, isolat DNA. Primer terdiri dari *forward*, primer *reverse* dan isolat DNA. Formulasi reaksi PCR disajikan pada Tabel 2. Amplifikasi

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DNA dijalankan sesuai protokol *Quick-Star Protocol* (Qiagen Multiplex PCR kit) dengan modifikasi suhu *annealing* dan komposisi bahan yang digunakan. Tahap PCR meliputi *pre-denaturation*, *denaturation*, *annealing*, *extention* dan *final entention*. *Pre-denaturation* dijalankan pada suhu 95 °C selama 15 menit, *denaturation* pada suhu 94 °C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 50 °C selama 90 detik, *extention* pada suhu 72 °C selama 60 detik dan *final extention* pada suhu 72 °C selama 4 menit. Siklus amplifikasi sebanyak 35 kali dari tahap *denaturation* hingga *extention*. Produk PCR yang telah teramplifikasi disajikan secara visual menggunakan elektroforesis.

Tabel 2 Komposisi PCR *mix* untuk primer gen *hdc* dan spesifik bakteri

Komponen	Jumlah (µL)			
	Multiplex PCR Primer spesifik gen <i>hdc</i> , <i>tdc</i> , <i>ldc</i>	<i>Singleplex</i> PCR primer spesifik bakteri <i>M. morganii</i>	<i>Singleplex</i> PCR primer spesifik bakteri <i>C. divergens</i>	<i>Multiplex</i> PCR primer spesifik bakteri
Isolat DNA	2	2	2	2
PCR master mix	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer				
<i>hdc forward</i>	1	-	-	-
<i>hdc reverse</i>	1	-	-	-
<i>tdc forward</i>	1	-	-	-
<i>tdc reverse</i>	1	-	-	-
<i>ldc forward</i>	1	-	-	-
<i>ldc reverse</i>	1	-	-	-
<i>M.morganii forward</i>	-	1	-	1
<i>M. morganii reverse</i>	-	1	-	1
<i>C. divergens forward</i>	-	-	1	1
<i>C. divergens reverse</i>	-	-	1	1
ddH <sub>2</sub> O	4,5	8,5	8,5	6,5
Total	25	25	25	25

### 2.3.7 Analisis bionformatika

Analisis bioinformatika meliputi sekuensing, penyejajaran sekuen menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), pembuatan pohon filogeni. Sekuensing merupakan teknik penentuan urutan basa nukleotida pada suatu molekul DNA menggunakan mesin *sequencer* yang dilakukan di PT Genetika Sciencee. Sekuen yang diperoleh kemudian disejajarkan (*alignment*) menggunakan program *Molecular Evaluationary Genetic Analysis-X* (MEGA-X). Penyejajaran nukleotida hasil sekuensing dan data yang terdapat pada GenBank *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Identifikasi kemiripan spesies dan gen berdasarkan homologi urutan basa nukleotida yang dihasilkan (Tamura *et al.* 2013). Hasil BLAST juga dibuat pohon filogeni menggunakan metode *Neighbour-joining* dengan bootstrap 1000 menggunakan aplikasi MEGA-X.



## 2.4 Analisis Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini berupa data kualitatif. Perlakuan yang digunakan pada penelitian ini yaitu perbedaan media *enrichment* bakteri pada deteksi bakteri pembentuk amina biogenik. Data diolah menggunakan teknik bioinformatika. Hasil isolasi dan amplifikasi DNA disajikan dalam bentuk visual, yang kemudian dianalisis secara deskriptif.

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



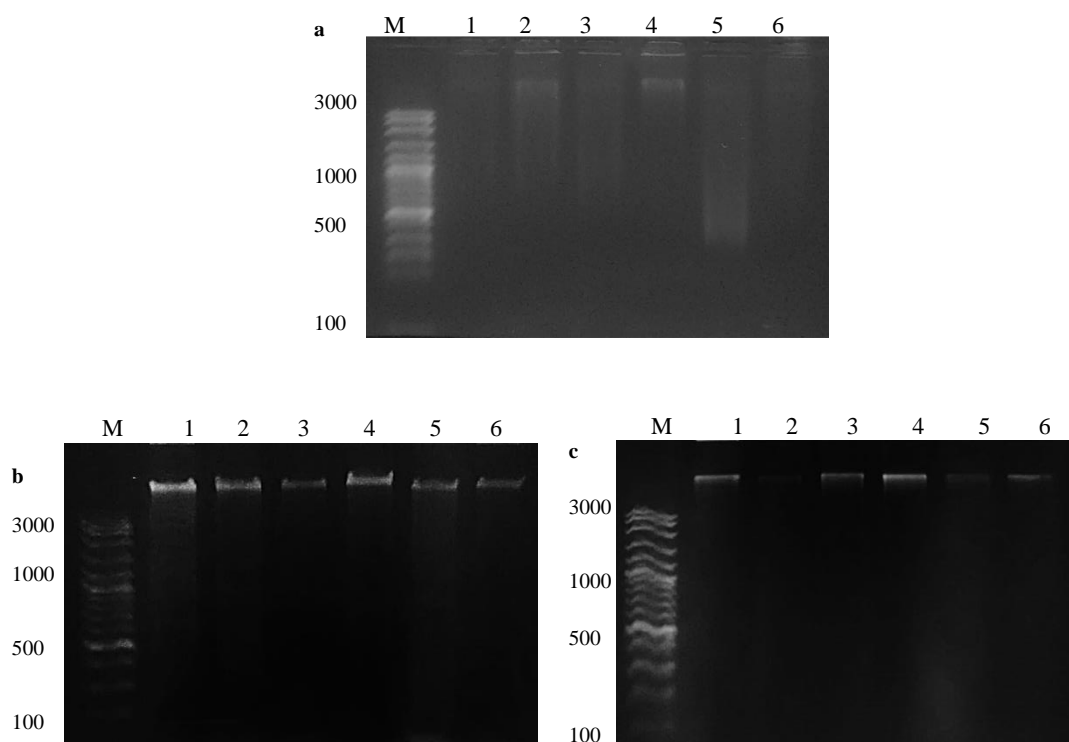
- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
  2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



### III HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 3.1 Elektroforegram Isolat DNA

Elektroforegram isolat DNA merupakan salah satu cara untuk melihat keberhasilan isolasi DNA. Elektroforegram isolat DNA dari daging ikan dan hasil *enrichment* media *lactose broth* dan *marine broth* disajikan pada Gambar 2. Isolat yang berhasil diisolasi memiliki pita yang berpendar saat dilihat menggunakan sinar ultraviolet.



Gambar 2 Elektroforegram isolat DNA daging ikan (a) hasil *enrichment* bakteri pada media *lactose broth* (b) dan *marine broth* (c): 1. tuna beku, 2. tongkol beku, 3. cakalang beku, 4. tuna loin, 5. pindang potong, 6. pindang bumbu kuning.

Isolat DNA bakteri pada Gambar 2 menunjukkan bahwa seluruh sampel berhasil diisolasi baik pada sampel daging ikan ataupun pada sampel hasil *enrichment* bakteri terlebih dulu. Isolat DNA menunjukkan pita pada area bobot molekul diatas 3000 bp, hasil ini sesuai dengan penelitian-penelitian sebelumnya. Prokariot yaitu bakteri memiliki bobot molekul DNA pada kisaran 4600 kb (Yuwono 2006). Isolat DNA dari daging ikan tuna beku, cakalang beku dan pindang bumbu kuning terlihat sangat tipis dan pada pindang potong terdapat pita *smear*. Pita-pita DNA hasil *enrichment* media *lactose broth* dan *marine broth* menunjukkan pita yang lebih bersih tanpa ada pengotor atau *smear*, tebal dan seragam.

Isolasi merupakan tahap awal dalam identifikasi berbasis DNA dengan prinsip perusakan dinding sel (lisis), pemisahan DNA dari bahan padat misalnya

selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Surzycki 2000). DNA tidak kasat mata sehingga perlu divisualisasikan salah satunya dengan elektroforesis. Elektroforesis memisahkan partikel bermuatan pada gel agaros menggunakan medan listrik sehingga molekul-molekul terpisah berdasarkan ukurannya (Agrawal 2008). Visualisasi DNA menggunakan marker sebagai standar atau tolak ukur pita sampel yang kita gunakan.

Isolasi yang digunakan yaitu menggunakan kit komersial khusus bakteri. Liu *et al.* (2018) melaporkan bahwa metode kit *TIANamp bacteria* dapat digunakan dalam isolasi DNA bakteri dari berbagai macam spesies. Tahap paling penting dalam isolasi DNA yaitu proses lisis sel. *Proteinase K* sangat membantu pada proses isolasi DNA, karena dapat mempercepat pelisisan sel sehingga DNA dapat kita peroleh dan terpisah dari komponen lain dalam sel. Han *et al.* (2018) menjelaskan bahwa pada proses isolasi DNA menggunakan lisozim dan *proteinase K* berperan untuk mempercepat proses, serta penggunaan suhu inkubasi berperan penting untuk mengaktifkan enzim yang digunakan.

### 3.2 Kemurnian dan Konsentrasi Isolat DNA

Kemurnian dan konsentrasi isolat diuji menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Sinar pada panjang gelombang 260 nm dapat diserap oleh basa purin dan pirimidin sebagai penyusun DNA, sedangkan sinar pada panjang gelombang 280 nm dapat terserap protein dan fenol (Sambrook dan Russell 2001). Kemurnian isolat DNA dilihat berdasar perbandingan rasio serapan A260 terhadap A280, hasil disajikan pada Tabel 3. Kisaran rasio isolat DNA daging ikan yaitu 1,17-2,17, hasil *enrichment lactose broth* yaitu 1,65-2,12 serta hasil *enrichment marine broth* yaitu 1,49-1,93.

Tabel 3 Kemurnian isolat DNA (Rasio A260/A280)

Sampel	Daging ikan	Media <i>enrichment</i> bakteri	
		<i>Lactose broth</i>	<i>Marine broth</i>
Kontrol positif (tuna)	2,12	2,12	1,51
Tuna beku	2,17	1,65	1,49
Tongkol beku	2,06	1,97	1,53
Cakalang beku	2,09	2,02	1,90
Tuna loin	2,11	1,89	1,93
Pindang potong	2,10	1,70	1,69
Pindang bumbu kuning	1,95	1,92	1,59

Kemurnian DNA pada umumnya berada pada kisaran 1,8-2,0. Rasio yang kurang dari 1,8 menandakan kontaminasi protein, sedangkan apabila lebih dari 2,0 ada kontaminasi RNA (Olson dan Morrow 2012). Sampel yang memiliki kemurnian pada kisaran umum pada sampel daging ikan yaitu pindang bumbu kuning. Isolat DNA yang murni pada tahap *enrichment lactose broth* yaitu tuna beku, tuna loin dan pindang bumbu kuning. Isolat DNA yang murni pada tahap *enrichment marine broth* yaitu cakalang beku dan tuna loin.

Isolat DNA pada penelitian ini terdapat sampel yang memiliki kemurnian diluar kisaran umum. Hasil tersebut diduga disebabkan oleh adanya komponen pengotor. Isolat dari daging ikan diduga kontaminasi asam nukleat lain yaitu RNA karena serapan basa purin dan pirimidin tinggi yang menyebabkan nilai

kemurniannya lebih dari 2. Hasil *enrichment* bakteri diduga terkontaminasi protein karena lebih tinggi serapan absorbansi panjang gelombang 280 sehingga kemurniannya rendah. Hasil tersebut sama dengan penelitian Nurilmala *et al.* (2020) bahwa isolat DNA dari daging ikan memiliki kemurnian yang lebih dari kisaran umum sedangkan kemurnian sampel hasil *enrichment* berada kisaran 1,48-2,09.

Komponen yang menyebabkan kontaminasi protein pada sampel hasil *enrichment* yaitu bahan dalam media, salah satunya ada kandungan protein lain (pepton). Nilai absorbansi protein yang terserap menjadi lebih tinggi dibandingkan dengan nilai absorbansi asam nukleat, sehingga kemurniannya memiliki nilai dibawah 1,8. Konsentrasi komponen pengotor pada penelitian ini tidak dilakukan pengkajian lebih lanjut. Abdullah *et al.* (2020) melaporkan rasio kemurnian isolat DNA bakteri pada sampel ikan tuna, tongkol dan cakalang yaitu 2,04-2,11 dan berhasil amplifikasi pada proses PCR. Ahmed *et al.* (2014) melaporkan juga bahwa isolat DNA bakteri yang memiliki kemurnian rendah (1,17-1,70) berhasil di amplifikasi pada PCR. Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan amplifikasi dengan PCR pada seluruh sampel.

Konsentrasi isolat DNA daging ikan dan hasil *enrichment* bakteri disajikan pada Tabel 4. Konsentrasi DNA isolat bakteri dari daging ikan berkisar 15,75-157,85 ng/ $\mu$ L, konsentrasi hasil *enrichment* media *lactose broth* yaitu 74,40-326,05 ng/ $\mu$ L, sedangkan media *marine broth* 39,35-461,75 ng/ $\mu$ L. Isolat DNA yang memiliki konsentrasi tertinggi yaitu pada sampel kontrol positif media *enrichment marine broth*, konsentrasi terendah pada daging ikan cakalang beku. Konsentrasi DNA dari daging umumnya lebih rendah dibandingkan dengan isolat hasil *enrichment*. Hasil tersebut seiring dengan terbentuknya pita tipis pada hasil elektroforesis.

Tabel 4 Konsentrasi isolat DNA (ng/ $\mu$ L)

Sampel	Daging ikan	Media <i>enrichment</i>	
		<i>Lactose broth</i>	<i>Marine broth</i>
Kontrol positif (tuna)	52,05	326,05	461,75
Tuna beku	46,30	76,55	90,85
Tongkol beku	47,90	94,85	39,35
Cakalang beku	15,75	101,00	81,40
Tuna loin	157,85	83,70	57,75
Pandang potong	75,90	74,40	89,35
Pandang bumbu kuning	19,45	135,70	65,00

Konsentrasi isolat DNA dipengaruhi juga oleh metode isolasi yang digunakan. Isolasi DNA yang digunakan pada penelitian ini menggunakan kit komersial bakteri, sehingga saat menggunakan sampel daging ikan konsentrasinya cenderung lebih rendah. Abdullah *et al.* (2020) melaporkan bahwa isolasi DNA bakteri menggunakan metode (CTAB) memiliki konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode kit *TIANamp Genomic DNA*, namun kemurniannya lebih rendah.

Konsentrasi DNA pada ikan tuna beku yaitu 46,30-90,85 ng/ $\mu$ L, ikan cakalang beku 15,75-101,00 ng/ $\mu$ L, tuna loin 57,75-157,85 ng/ $\mu$ L, pandang potong 74,40-89,35 ng/ $\mu$ L dan pada pandang bumbu kuning 19,45-135,70 ng/ $\mu$ L. Isolat

DNA pada ikan tuna, tongkol dan cakalang beku memiliki konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan Abdullah *et al.* (2020) yaitu 19,8-58,5 ng/ $\mu$ L namun sama dengan hasil Nurilmala *et al.* (2020) yaitu berkisar 22,7-103,9 ng/ $\mu$ L. Isolat pindang potong lebih tinggi, sedangkan isolat pindang bumbu kuning lebih rendah dari hasil penelitian sebelumnya. Nugraha *et al.* (2020) melaporkan bahwa konsentrasi DNA ikan pindang yaitu 49 ng/ $\mu$ L.

Konsentrasi DNA yang diperoleh merupakan DNA seluruh bakteri yang tumbuh dan terisolasi, bahkan sangat memungkinkan kalau didalamnya terdapat bakteri bukan pembentuk amina biogenik. Oleh sebab itu pada penelitian selanjutnya disarankan gunakan media selektif yang mengandung asam amino prekursor dari amina biogenik target. Kandungan asam amino prekursor dalam media akan menyeleksi pertumbuhan bakteri pembentuk amina biogenik yang sesuai, sehingga isolat bakteri yang dihasilkan spesifik target bakteri pembentuk amina biogenik.

Nurilmala *et al.* (2019) melaporkan bahwa ikan tongkol abu-abu hasil *enrichment lactose broth* dapat mendeteksi gen *hdc* namun proses PCR belum efektif, kemudian Nurilmala *et al.* (2020) bakteri pembentuk histamin berhasil terdeteksi menggunakan primer gen *hdc* dan 16S rRNA pada ikan tuna, tongkol dan cakalang. Abdullah *et al.* (2020) melaporkan bahwa metode kultivasi/*enrichment* pada media *lactose broth* berhasil mengamplifikasi gen target *tdc*. Media *marine broth* dipilih karena diharapkan bakteri yang tumbuh yaitu bakteri yang berasal dari ikan tersebut, bukan dari lingkungan saat penanganan ataupun pengolahan. Björnsdóttir-Butler *et al.* (2011) berhasil mendeteksi bakteri gram negatif penghasil histamin pada media *marine broth*.

Langkah yang dapat digunakan untuk mendapatkan isolat bakteri pembentuk amina biogenik murni harus dilakukan penapisan dengan beberapa media khusus yang mengandung asam amino prekursor. Moreno-Arribas *et al.* (2003) melaporkan bahwa dalam penapisan bakteri pembentuk amina biogenik dapat dilakukan menggunakan media hasil modifikasi dengan penambahan *L-histidine monohydrochloride*, *tyrosine disodium salt*, *L-ornithine monohydrochloride* dan *L-arginine monohydrochloride* untuk mendeteksi histamin, tiramin dan putresin. Media-media yang telah digunakan sebagai penapisan media pertumbuhan bakteri pembentuk histamin di antaranya *histidine decarboxylase broth*/ HDB (Özoğul 2004, Björnsdóttir-Butler *et al.* 2011), media *brain heart infusion* (BHI) selektif untuk pertumbuhan bakteri *Morganella*, BHI dengan penambahan NaCl pada media dapat menjadi penapisan *Photobacterium phosphoreum* (Podeur *et al.* 2015). HDB berupa media yang mengandung asam amino prekursor yaitu *l-histidine* sehingga menumbuhkan bakteri penghasil histamin namun menghambat pertumbuhan bakteri lainnya.

Penapisan *C. divergens* sebagai pembentuk tiramin yaitu menumbuhkan bakteri pada agar *Man Rogosa and Sharpe* (MRS) yang dimodifikasi yaitu mensubstitusi glukosa dengan sukrosa dan penghilangan asam asetat, koloni yang dihasilkan ditumbuhkan pada agar D-MRS dan diperbanyak pada *Tryptone Soya Broth* (Mokrani *et al.* 2018). Urs *et al.* (2019) melaporkan bahwa penapisan bakteri setelah pada media MRS dan BHI juga ditumbuhkan pada *Moller's decarboxylase agar* (MDA) dan *Moller's decarboxylase broth* (MDB) dengan tambahan *L-histidine*, *L-tyrosine*, *L-lysine* dan *L-ornithine* sebagai prekursor.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

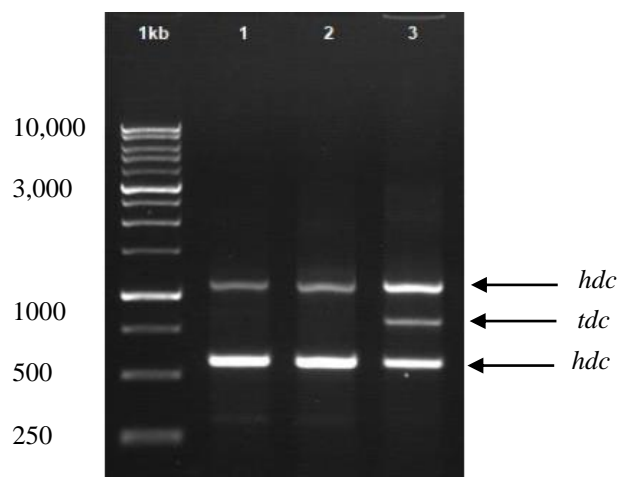
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Asam *sulphosalicylic* dapat digunakan untuk memurnikan kultur bakteri dengan teknik pemisahan menggunakan sentrifugasi dan penyaringan menggunakan kertas (Yazgan 2020). Trevisani *et al.* (2019) mendeteksi bakteri penghasil histamin (*histamine-producing bacteria*/HPB) pada ikan tuna dengan menapis bakteri pada media yang terdiri dari TBS, histidina, pyrodoxal HCl, inkubasi selama 3 hari pada suhu 20 °C. Inokulum ditumbuhkan pada media TSA, media air laut lengkap (pepton, gliserol, agar dan air laut), TCBS dan *iron agar*.

Buňková *et al.* (2011) mendeteksi bakteri pembentuk tirosin dengan media M17 *broth* dengan tambahan tirosin 2%. Kultivasi bakteri disentrifugasi dan filtrasi untuk mendapatkan kultur murni kemudian dikonfirmasi menggunakan kromatografi *ion exchange*. Bakteri yang digunakan yaitu *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* dan *L. lactis* subsp. *cremoris*. Asam amino dan laktosa pada saat dekarboksilasi berfungsi sebagai sumber energi bagi pertumbuhan bakteri, konsentrasi laktosa yang meningkat dapat menurunkan jumlah bakteri namun meningkatkan konsentrasi tiramin yang dihasilkan. Faktor lain yang memengaruhi pembentukan tiramin paling cepat yaitu konsentrasi NaCl yang semakin tinggi. Pereira *et al.* (2009) menjelaskan bahwa Na<sup>+</sup> terlibat dalam pengaturan pH intraseluler yang berperan penting dalam jalur dekarboksilasi tirosina.

### 3.2 Gen Pengkode Amina Biogenik

Gen pengkode amina biogenik yang diamati yaitu *hdc*, *tdc* dan *ldc* menggunakan *multiplex* PCR konvensional pada ikan *scombridae*. Elektroforegram deteksi gen pengkode amina biogenik pada kontrol positif disajikan pada Gambar 3. Metode ini secara kualitatif untuk menentukan keberadaan gen target dalam sampel. Gen target yang telah teramplifikasi saat proses PCR kemudian dipisahkan dan diberi *cybergreen* pada tahap elektroforesis, sehingga gen target yang terpisah dapat terlihat (Settanni dan Corsetti 2007). Tahap PCR ini diharapkan dapat mengamplifikasi ketiga gen target sekaligus.



Gambar 3 Elektroforegram gen pengkode amina biogenik pada daging ikan kontrol (1) hasil *enrichment* pada media *lactose broth* (2) dan *marine broth* (3).

Hasil pada Gambar 3 menunjukkan bahwa gen pengkode amina biogenik yaitu *hdc*, *tdc* dan *ldc* berhasil teramplifikasi menggunakan *multiplex* PCR. Target

gen *hdc* yaitu 571 bp (Wongsariya *et al.* 2015), *tdc* 825 bp dan *ldc* 1098 (de las Rivas *et al.* 2006). Kontrol positif merupakan ikan tuna yang disimpan selama 3 hari pada suhu ruang untuk mendapatkan isolat bakteri karena belum ada isolat murni bakteri pembentuk amina biogenik. Norita *et al.* (2019) melaporkan bahwa ikan tongkol yang disimpan pada suhu ruang pada hari ke 3 mengandung histamin 713,88 mg/kg, sedangkan Nurilmala (2020) melaporkan ikan tuna yang disimpan pada suhu ruang selama 7 hari mengandung histamin  $755,86 \pm 0,09$  mg/kg. Sampel dari daging ikan dan hasil *enrichment* pada media *lactose broth* hanya dapat mengamplifikasi gen *hdc* dan *ldc*, sedangkan hasil *enrichment* pada media *marine broth* dapat mengamplifikasi ketiga gen pembentuk amina biogenik. *Marine broth* selain mengandung sumber energi bakteri juga mengandung mineral yang hanya ditemukan di lingkungan laut, sehingga bakteri yang tumbuh terseleksi berupa bakteri yang berasal dari lingkungan perairan tersebut. Bakteri-bakteri pembentuk amina biogenik dapat tumbuh lebih baik pada media *marine broth* sedangkan bakteri lain mati.

Kondisi yang dipersiapkan dalam tahap *multiplex* PCR adalah suhu *annealing*, karena masing-masing primer memiliki suhu optimum yang berbeda. Suhu optimum *annealing* yang digunakan oleh penelitian sebelumnya yaitu 54 °C gen *hdc*, 53 °C gen *tdc* dan 45 °C gen *ldc*, namun ketika amplifikasi pada masing-masing suhu tersebut ketiga gen target tidak dapat terekspresi sekaligus. Hasil dari percobaan pada penelitian ini suhu *annealing* yang mampu amplifikasi ketiga gen yaitu 50 °C pada waktu 90 detik sebanyak 35 siklus.

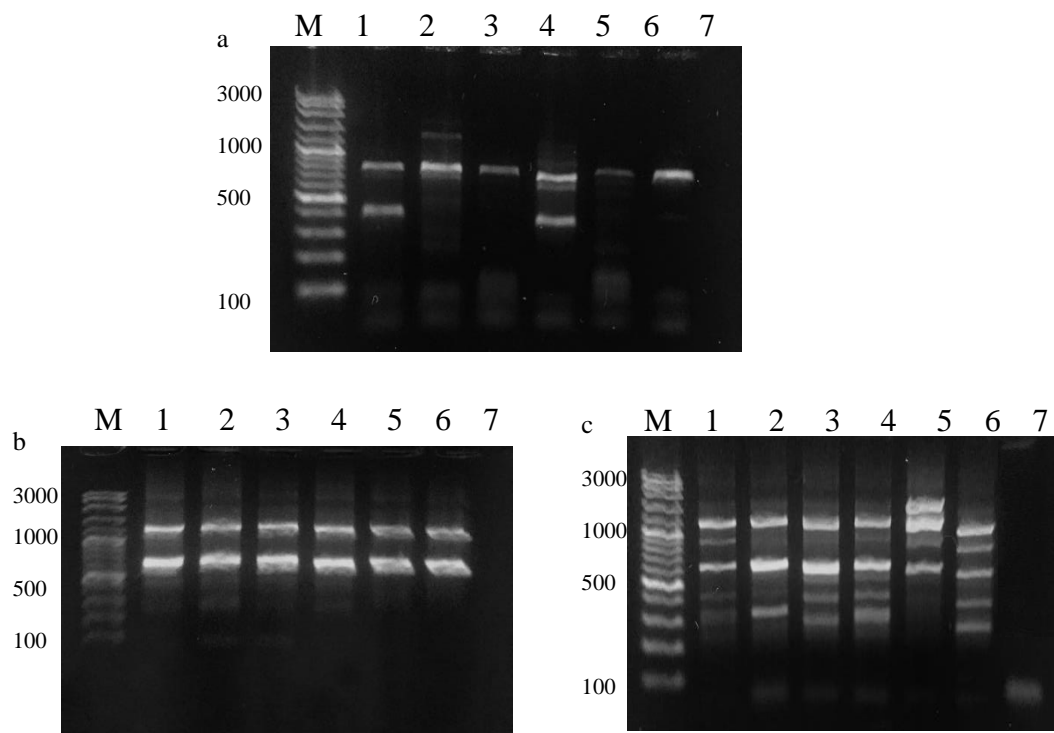
*Annealing* merupakan proses penempelan pada DNA beruntai tunggal dengan primer, biasa dilakukan pada suhu 55-70°C selama 20-40 detik atau 3-5 °C lebih rendah dari suhu denaturasi (Verma *et al.* 2014). Kondisi PCR tersebut digunakan untuk amplifikasi PCR pada sampel ikan tuna beku, tongkol beku, cakalang beku, tuna loin, pindang potong dan pindang bumbu kuning. Elektroforegram hasil PCR disajikan pada Gambar 4.

Gambar 4 menunjukkan bahwa produk PCR dari isolat daging ikan mampu mendeteksi gen *tdc* pada semua sampel, gen ke 2 *hdc* pada sampel tuna beku dan tuna loin, serta *ldc* pada sampel tongkol beku. Pita gen *tdc* dan *ldc* berada pada bobot target 825 bp dan 1098 bp. Hasil amplifikasi sampel pada *enrichment lactose broth* menunjukkan bahwa gen yang terdeteksi yaitu *hdc* dan *ldc*, gen *tdc* tidak teramplifikasi pada media *enrichment lactose broth*. Hasil amplifikasi tersebut sama dengan hasil kontrol yang dianalisis.

Sampel hasil *enrichment* pada media *marine broth* mampu mengamplifikasi 3 gen target (*hdc*, *tdc* dan *ldc*) pada sampel tuna beku, pindang potong dan pindang bumbu kuning. Peluang pembentukan amina biogenik pada sampel tersebut lebih tinggi, dibandingkan ikan tongkol dan cakalang, kadar histidin pada ikan tuna lebih tinggi, sehingga pembentukan histaminnya akan lebih banyak, begitupun dengan kedua biogenik lainnya. Sampel pindang potong dan bumbu kuning mengandung amina biogenik diduga terbentuk dalam proses penanganan yang kurang baik, suhu dan sanitasinya kurang baik sehingga sebelum di olah bakteri tersebut sudah bekerja untuk membentuk amina biogenik. Media *marine broth* berhasil menyeleksi pertumbuhan bakteri yang berasal dari lingkungan perairan dan bertindak sebagai pembentuk amina biogenik. Bakteri-bakteri tersebut telah mendekarboksilasi amina biogenik target sehingga pada saat proses PCR dapat mengamplifikasi ketiga gen target secara bersamaan.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Gambar 4 Elektroforegram multiplex PCR gen pengkode amina biogenik daging ikan (a) hasil *enrichment* pada media *lactose broth* (b) dan *marine broth* (c): 1. tuna beku, 2. tongkol beku, 3. cakalang beku, 4. tuna loin, 5. pindang bumbu kuning, 6. pindang potong, 7. Kontrol negatif.

Identifikasi gen pembentuk amina biogenik pada sampel hasil *enrichment marine broth* terdapat beberapa pita yang bukan target. Pita tersebut teramplifikasi karena memiliki kecocokan dengan daerah primer, tapi pada penelitian ini bukan sebagai target. Yuwono (2006) menyatakan bahwa salah satu penyebab dalam PCR yaitu salah pengenalan DNA cetakan terhadap primernya.

Gen pengkode amina biogenik berhasil diidentifikasi menggunakan *multiplex PCR* hasil *enrichment lactose broth*. Identifikasi bakteri pembentuk amina biogenik dilakukan menggunakan sekuensing, yaitu mengurutkan basa-basa penyusun DNA yang selanjutnya disejajarkan dengan GenBank di *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Teknik bioinformatika yang dilakukan tersebut dapat diperoleh hasil spesifik bakteri pembentuk amina biogenik pada sampel.

de las Rivas *et al.* (2005) melaporkan *hdc* teramplifikasi menggunakan *multiplex PCR* pada 534 bp, bakteri pembentuknya yang terdeteksi yaitu *Klebsiella planticola*, *Proteus vulgaris*, *Photobacterium phosphoreum* dan *M. morgani*, serta *Staphylococcus sp.* pada 367 bp, *odc* teramplifikasi pada 1446 bp dengan terdeteksinya bakteri *M. morgani*, *Escherichia coli* dan *Serratia liquefaciens*. Hwang *et al.* (2010) melaporkan bahwa metode konvensional PCR secara *multiplex*

dapat mendeteksi *Staphylococcus piscifermentans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp. sebagai pembentuk amina biogenik pada produk ikan tuna kayu (*katsuobushi*).

Asam amino prekursor untuk pembentukan histamin yaitu histidina, enzim yang dihasilkan pada proses pembentukan histamin yaitu *histidine decarboxylase (hdc)* oleh bakteri yang terdapat pada produk. Bakteri-bakteri yang teridentifikasi dapat membentuk histamin di antaranya *M. morganii*, *E. hormaechei*, *K. aerogenes*, *E. bugandensis*, dan *E. fergussonii* pada kelompok bakteri gram negatif (Kim *et al.* 2003).

Asam amino prekursor pembentukan tiramin yaitu tirosina yang ditandai dengan adanya enzim *tyrosine decarboxylase (tdc)* dari bakteri. Bakteri yang banyak mendekarboksilasi asam amino tirosina yaitu bakteri asam laktat (BAL) pada strain *Lactococci* dan *Enterococci* (Macrobal *et al.* 2012). Jenis bakteri lain yang terlibat yaitu *S. coehni* subsp. *coehni*, *S. warneri*, *S. lentus*, *S. hominis*, *S. faecalis*, *E. durans*, *E. avium*, *E. faecium*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *P. pentosaceus*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *Leuconostoc* spp. *B. macerans*, *B. licheniformis* pada gram positif serta *H. alvei* dan *Enterobacteriaceae* pada gram negatif (Espinosa-Pesqueira *et al.* 2018).

Kadaverin merupakan amina biogenik yang terbentuk dari asam amino lisina, didekarboksilasi oleh bakteri golongan enterobakteria dan menghasilkan enzim *lysine decarboxylase*. Enterobakteria yang dapat membentuk kadaverin di antaranya *Serratia grimesii*, *S. ficaria*, *Kluyvera intermedia*, *Enterobacter aerogenes* (Curiel *et al.* 2011).

### 3.3 Primer Spesifik *M. morganii* dan *C. divergens*

Primer spesifik bakteri *M. morganii* dan *C. divergens* yang banyak ditemukan sebagai bakteri pembentuk histamin dan tiramin. Primer yang didesain yaitu bagian *forward* dan *reverse* pada masing-masing bakteri. Hasil desain primer di evaluasi menggunakan *oligoevaluator*® dan disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5 Hasil evaluasi primer spesifik bakteri

Sekuen (5'-3')	Panjang primer (bp)	T <sub>m</sub> (°C)	% GC	Primer dimer	Srtuktur sekunder	Panjang Produk
<b><i>M. morganii</i></b>						
<i>Forward</i>						
CAAAGCTGGGGTTATGTG	18	59,1	50	Tidak ada	Tidak ada	196
<i>Reverse</i>						
CGTCATAGTCGATTTTCGC	18	59,4	50	Tidak ada	Tidak ada	
<b><i>C. divergens</i></b>						
<i>Forward</i>						
TGAATGGGATCAAATCGAAG	20	53.4	40	Tidak ada	Tidak ada	143
<i>Reverse</i>						
AACCCATTTTATGAGGATCG	20	53.0	40	Tidak ada	Tidak ada	

Kriteria dalam pemilihan primer di antaranya komposisi GC, suhu leleh (*temperature melting/Tm*). Komposisi guanin dan sitosin (%GC) berkisar 50-60%

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



sedangkan Tm yang dipilih yaitu memiliki kedekatan dari kedua primer yang dipilih. Tm merupakan suhu pada saat setengah dari molekul DNA mengalami denaturasi (Yuwono 2006). Primer yang didesain telah memnuhi kriteria dalam pembuatan primer. Primer *M. morganii* di desain pada *forward* dan *reverse* yaitu panjang basa 18 bp, panjang produk 196 bp, Tm 59,1 °C dan 60,3 °C serta GC 50% dan 40%. Primer *C. divergens* yang dipilih memiliki panjang basa 20 bp, panjang produk 143 bp, Tm 53,4 °C dan 53,0 °C serta GC 40%.

Primer spesifik untuk bakteri pembentuk kadaverin yaitu *Enterobacter* pada penelitian ini belum berhasil didesain baik melalui cara manual ataupun aplikasi online *Primer3Plus.*, Hasil sudah dari sekuen menunjukkan bukan *Enterobacter* tersebut dan menunjukkan *Klebsiella aerogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Pediococcus pentosaceus* dan *P. acidilactici* dengan persentase identitas yang sangat tinggi yaitu 100%. Primer spesifik yang didesain harus menunjukkan hasil penempelan pada 1 jenis bakteri target, apabila tidak spesifik proses PCR akan terhambat. Primer merupakan nukleotida pembatas fragmen DNA yang akan diamplifikasi, terdiri dari primer *forward* sebagai awal amplifikasi dari ujung 5' dan *reverse* dari ujung 3' yang diperlukan untuk proses ekstensi DNA (Lorenz 2012).

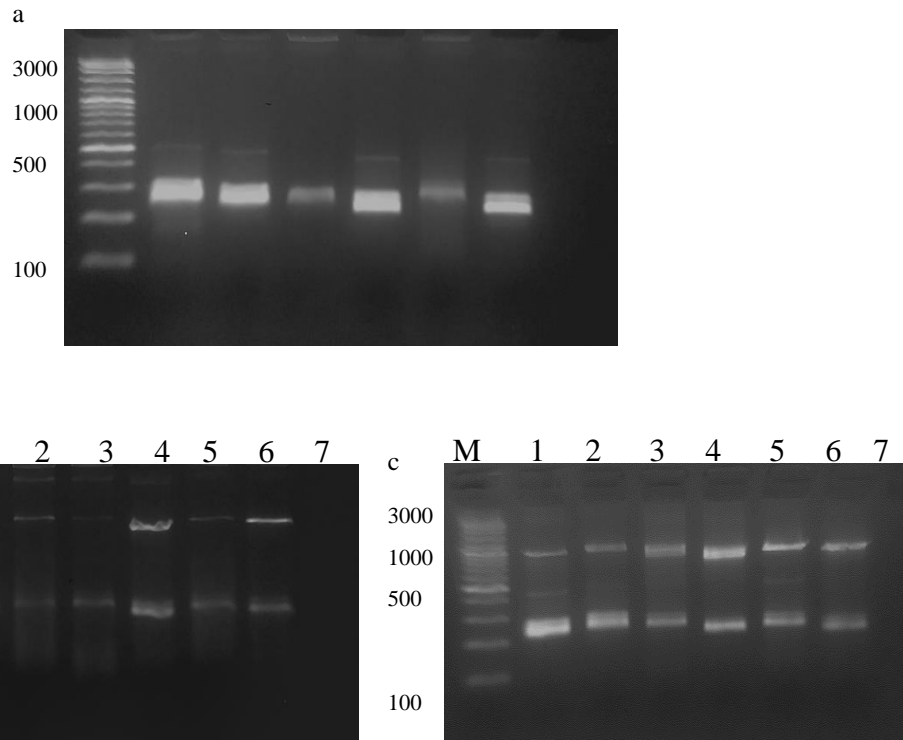
### 3.4 Bakteri Spesifik Pembentuk Amina Biogenik

Bakteri pembentuk amina biogenik ada berbagai jenis, namun yang banyak terdeteksi dan kuat membentuk histamin yaitu *M. morganii* (Björnsdóttir-Butler *et al.* 2010), sedangkan bakteri yang teridentifikasi pembentuk tiramin pada ikan *scombridae* yaitu *C. divergens*. Deteksi keberadaan bakteri *M. morganii* dan *C. divergens* sebagai pembentuk amina biogenik dilakukan secara *singleplex* dan *multiplex* PCR. Hasil amplifikasi *singleplex* PCR bakteri *M. morganii* disajikan pada Gambar 5, bakteri *C. divergens* disajikan pada Gambar 6.

#### 3.4.1 *Singleplex* PCR *M. morganii singleplex*

Hasil *singleplex* PCR untuk *M. morganii* pada Gambar 5 terlihat bahwa pada seluruh sampel teramplifikasi pada panjang produk 200-300 bp, namun target primer *M. morganii* yang di desain yaitu 196 bp. Hasil *enrichment lactose broth* dan *marine broth* juga terbentuk pada kisaran 1000 bp. Hasil non target diduga karena bakteri telah tumbuh lebih banyak dan terdapat daerah yang sesuai dengan primer yang digunakan sehingga terjadi penempelan yang bukan menjadi target.

Terbentuknya pita amplikon yang belum spesifik pada uji DNA bakteri disebabkan beberapa faktor, misalnya ukuran amplikon yang terlalu pendek, suhu penempelan belum optimum, terjadinya kesalahan penempelan pada DNA yang kurang homolog bahkan ekspresi gen dari bakteri *M. morganii*, sehingga terbentuk pita ganda atau pita amplikon yang kurang spesifik. Salah satu penyebab dalam PCR yaitu salah pengenalan DNA cetakan terhadap primernya (Yuwono 2006).



Gambar 5 Elektrofogram *singleplex* PCR bakteri *M. morganii* dari daging ikan (a) hasil *enrichment* pada media *lactose broth* (b) dan *marine broth* (c): 1. tuna beku, 2. tongkol beku, 3. cakalang beku, 4. tuna loin, 5. pindang bumbu kuning, 6. pindang potong, 7. Kontrol negatif.

Ferrario *et al.* (2014) melaporkan bahwa bakteri *M. morganii* melibatkan dua enzim spesifik yang diduga antiproter sehingga mengkatalisis reaksi dekarboksilasi. Media sangat berperan dalam menstimulus dekarboksilasi, kondisi pH media LB yang rendah dapat mengakibatkan peningkatan 40-100 kali lipat ekspresi gen *hdc* dan *hisRS*. *M. morganii* tersebut kemudian berperan resistensi asam pada percobaan kloning, namun kluster gen dari bakteri ini perlu dilakukan studi lebih lanjut.

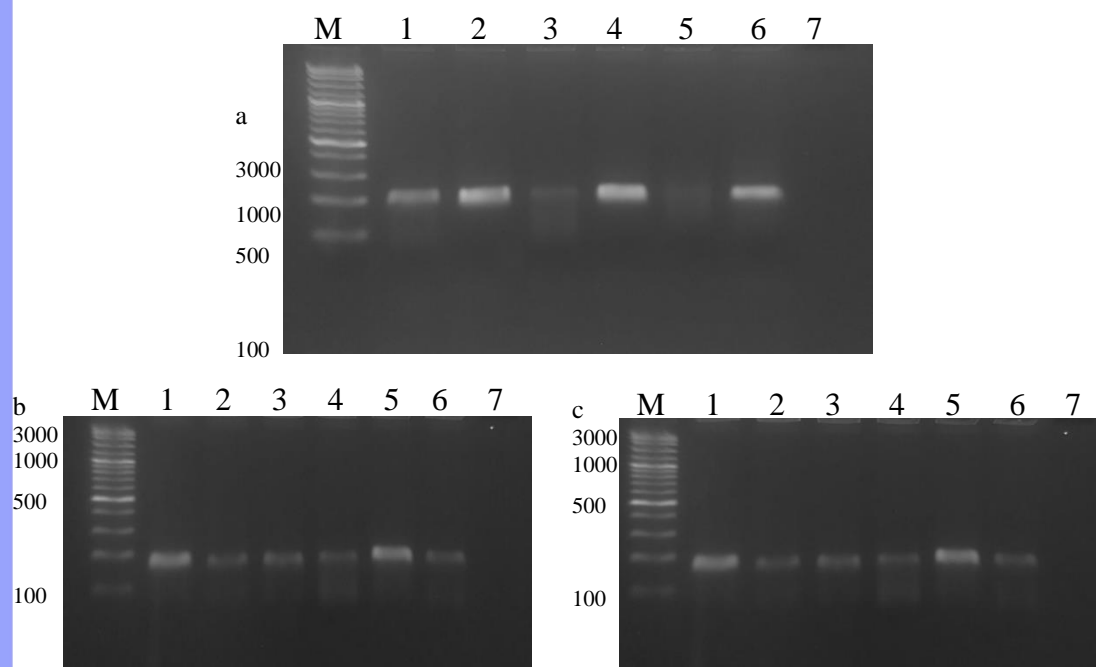
*M. morganii* merupakan kelompok bakteri Gram-negatif, termasuk famili *Enterobacteriaceae*, terdiri dari 2 sub spesies *morganii* dan sub spesies *sibonii* (Emborg 2006). Suhu pertumbuhan *M. morganii* yaitu 4-45 °C (Janda dan Abbott 2005). Bakteri *M. morganii* dan genus *Proteus* dan *Providencia* memiliki banyak kemiripan karakteristik biokimia, menunjukkan sedikit variasi fenotif strain dalam biokimianya sehingga terbentuk menjadi 2 kelompok atas kemampuan memfermentasikan *trehalosa* (O'Hara *et al.* 2000). Bakteri lain yang memiliki kekerabatan yang sama yaitu *Klebsiella* spp. dan *Enterobacter* spp. sebagai produsen histamin, produksinya dapat mencapai 200-1000 ppm pada media spesifik mengandung histidin 1% (Kim *et al.* (2003). Ferrario *et al.* (2012) berhasil mengamplifikasi bakteri pembentuk histamin pada 14 filet ikan tuna sirip kuning yang terdapat dipasar dan supermarket di Milan, Italia. Bakteri yang berhasil diisolasi sebanyak 141 sebagai sampel positif penghasil histamin dan 30,5% terkonfirmasi *M. morganii* menggunakan primer 16S rRNA pada panjang produk 179 bp.

Peran bakteri *M. morganii* dalam pembentukan amina biogenik terbukti signifikan pada percobaan pemberian isolat *M. morganii* dibandingkan terhadap

ikan tuna tanpa pemberian isolat (kontrol) dan pemberian isolat *Proteus mirabilis* selama penyimpanan 2,6 dan 10 serta suhu penyimpanan 4, 25 dan 37 °C. Amina biogenik terutama histamin terbentuk sejak hari pengamatan pertama bahkan pada suhu penyimpanan terendah. Semakin tinggi suhu penyimpanan dan waktu yang semakin lama membuat akumulasi histamin semakin tinggi hingga melebihi batas aman konsumsi (Ahmed 2019).

### 3.4.2 Singleplex PCR *C. divergens* singleplex

Primer *C. divergens* yang didesain pada penelitian ini diharapkan dapat mengamplifikasi pada kisaran 143 bp. Hasil amplifikasi *singleplex* PCR pada Gambar 6 menunjukkan bahwa bakteri *C. divergens* terdeteksi pada kisaran pita  $\pm 200$  bp pada seluruh sampel. Pita pada isolat sampel daging ikan terlihat tipis pada sampel cakalang beku dan pindang potong, namun pada sampel lain terlihat lebih seragam.



Gambar 6 Elektroforegram *singleplex* PCR bakteri *C. divergens* pada daging ikan (a) hasil *enrichment* pada media *lactose broth* (b) dan *marine broth* (c): 1. tuna beku, 2. tongkol beku, 3. cakalang beku, 4. tuna loin, 5. pindang bumbu kuning, 6. pindang potong, 7. Kontrol negatif.

*Carnobacterium* spp. merupakan bakteri asam laktat (BAL), menghasilkan glukosa dari fermentasi karbohidrat, Gram-positif, berbentuk batang, tumbuh pada kisaran 7-9. Bakteri *Carnobacterium* merupakan bakteri dominan pada produk daging dan makanan laut yang dikemas pada vakum penyimpanan suhu dingin, produk susu (Laursen *et al.* 2005). *Carnobacterium* terdiri dari 9 spesies, namun *C. maltaromaticum* dan *C. divergens* yang ditemukan pada produk makanan. Strain yang dapat memproduksi tiramin yaitu *C. divergens*, kadar 5 mg

tiramin dapat menimbulkan efek misalnya sakit kepala migrain apabila terkonsumsi (Leisner *et al.* 2007). Connil *et al.* (2002) melakukan desain uji pertumbuhan *C. divergens* pada suhu, konsentrasi NaCl dan glukosa yang berbeda pada ikan salmon asap terhadap kadar tiramin. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa kandungan NaCl yang paling berpengaruh sedangkan suhu dan glukosa tidak terlalu berpengaruh. Tiramin yang dihasilkan setelah penyimpanan 27 hari yaitu 35 mg namun masih dibawah ambang batas toleransi yaitu 100-800 mg. Gen pengkode *tdc* pada *C. divergens* terhadap bakteri lain *E. faecalis*, *E. faecium* dan *L. brevis* berada pada wilayah 1 875 bp, ini merupakan wilayah yang dapat digunakan sebagai standar deteksi *C. divergens* pada pembentukan tiramin (Coton *et al.* 2004).

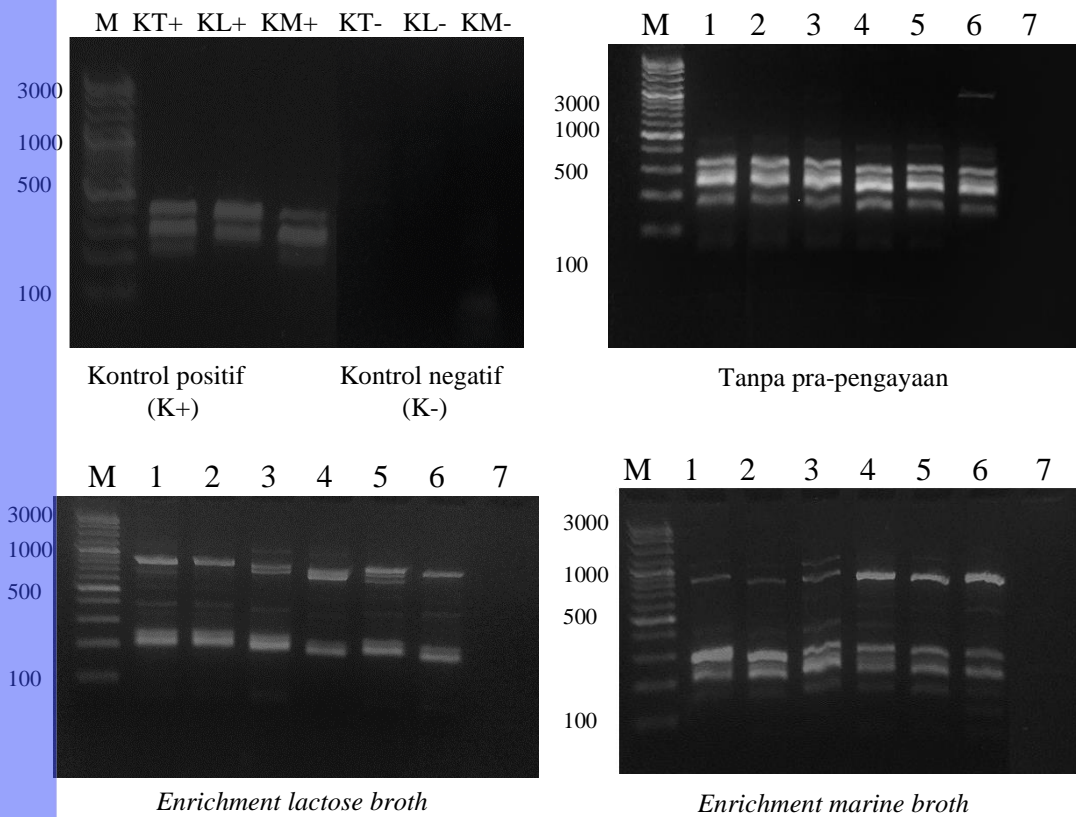
### 3.4.3 Multiplex PCR *M. morganii* dan *C. divergens*

*Multiplex* PCR memiliki keunggulan meningkatkan kecepatan, sensitivitas spesifisitas deteksi dan dilakukan dengan cepat sehingga mengurangi beban kerja, tenaga kerja, sumber daya serta biaya (Mufty 2008). *Multiplex* PCR pada penelitian ini diharapkan dapat mendeteksi 2 pita target spesifik bakteri *M. morganii* dan *C. divergens* sebagai pembentuk amina biogenik. Hasil amplifikasi *multiplex* PCR pada Gambar 7.

@Hak cipta milik IPB University

IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.  
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Gambar 7 Elektroforegram *multiplex* PCR bakteri *M. morganii* dan *C. divergens*. (KT) Kontrol daging ikan, (KL) kontrol *lactose broth*, (KM) kontrol *marine broth*. 1. tuna beku, 2. tongkol beku, 3. cakalang beku, 4. tuna loin, 5. pindang bumbu kuning, 6. pindang potong, 7. Kontrol negatif.

Hasil deteksi *multiplex* PCR pada Gambar 7 berhasil dapat mendeteksi pita-pita yang terdapat pada *singleplex* PCR. Bakteri *M. morgani* dan *C. divergens* terdapat pada seluruh sampel baik isolat dari daging ikan ataupun hasil *enrichment lactose* dan *marine broth*. Amplifikasi dikategorikan berhasil karena pada seluruh kontrol negatif tidak terjadi amplifikasi. Penggunaan teknik *multiplex* PCR menggunakan primer spesifik bakteri *M. morgani* dan *C. divergens* pembentuk amina biogenik pada ikan lainnya dapat dilakukan sebagai salah satu cara deteksi cepat dalam kontrol kesegaran ikan. *Multiplex* PCR juga dapat dilakukan dengan penambahan primer spesifik bakteri lain sehingga lebih cepat deteksi bakteri-bakteri pembentuk amina biogenik, namun masing-masing primer harus memiliki suhu *annealing* yang sesuai. Metode lain yang dapat dikembangkan dari menggunakan primer spesifik bakteri dapat dilakukan pada metode uji kuantitatif *multiplex* qPCR agar dapat analisis *high throughput* pada berbagai jenis olahan yang dapat dikuantitatifkan.

Pengujian secara *multiplex* PCR selain lebih cepat akurat juga memiliki kelemahan. Kekurangan dari *multiplex* PCR yakni kinerja primer dipengaruhi oleh stabilitas internal, suhu pelelehan, struktur sekunder, dan gangguan antar primer (Apte dan Daniel 2003). Pita hasil *enrichment lactose broth* pada pita target tidak terekspresi 2 pita bakteri secara jelas. Boondireke *et al.* (2010) menyatakan bahwa ketika amplifikasi beberapa bakteri dilakukan secara bersamaan, terjadi kompetisi dari komponen dalam reaksi PCR untuk mengamplifikasi setiap target gen. Amplifikasi terjadi untuk satu target gen terlebih dulu sehingga amplifikasi target gen lainnya terhambat.

### 3.5 Bakteri Pembentuk Amina Biogenik Hasil Analisis Bioinformatika

Analisis bioinformatika pada hasil PCR kontrol positif dari daging ikan, *enrichment lactose broth*, *marine broth*, dan yang dapat mengamplifikasi 3 gen target. Sampel yang dapat mengamplifikasi ketiga gen target yaitu sampel tuna beku, pindang bumbu kuning dan pindang potong hasil *enrichment* media *marine broth*. Sekuen yang diperoleh dianalisis menggunakan BLAST untuk mengidentifikasi spesies bakteri pembentuk amina biogenik berdasarkan kemiripan sekuen hasil dengan sekuen pada *genBank*. Bakteri pendekarboksilasi tersebut disajikan pada Tabel 6, sedangkan hasil BLASTnya tersaji pada Lampiran 5.

Bakteri pembentuk histamin berdasarkan analisis melalui gen penyandi *hdc* pada ikan *scombridae* terdeteksi sebagai *M. morgani*, *E. aerogenes* dan *Acinetobacter baumannii*. Bakteri yang terdeteksi melalui gen *hdc* yaitu *A. baumannii* pada ikan tuna beku dan pindang bumbu kuning serta *M. morgani* pindang potong. Nurilmala *et al.* (2020) melaporkan bahwa bakteri yang terdeteksi pembentuk histamin pada ikan tuna dan tongkol yaitu *M. morgani*, bakteri pada cakalang yang terdeteksi yaitu *E. hormaechei*. Björnsdóttir-buter *et al.* (2010) dan Ferrario *et al.* (2012) melaporkan bahwa bakteri *M. morgani* dan *E. hormaechei* merupakan bakteri dominan pengkode gen *hdc* yang tinggi menghasilkan histamin.

Bakteri pembentuk kadaverin melalui identifikasi gen *ldc* yaitu *Citrobacter* sp., *Hafnia paralvei*, *Enterobacter cloacae*, serta *Enterobacter hormaechei*. Bakteri-bakteri pembentuk kadaverin di antaranya *Citrobacter freundii* (Klanian *et al.* 2018) pada gurita merah, *Kluyvera intermedia*, *Enterobacter aerogenes*,

*Yersinia kristensenii*, *Serratia grimesii*, *Serratia ficaria*, *Yersinia rodhei*, *Providencia vermicola* dan *Obesumbacterium proteus* pada sosis sapi (Curiel *et al.* 2011).

Tabel 6 Spesies bakteri pembentuk amina biogenik

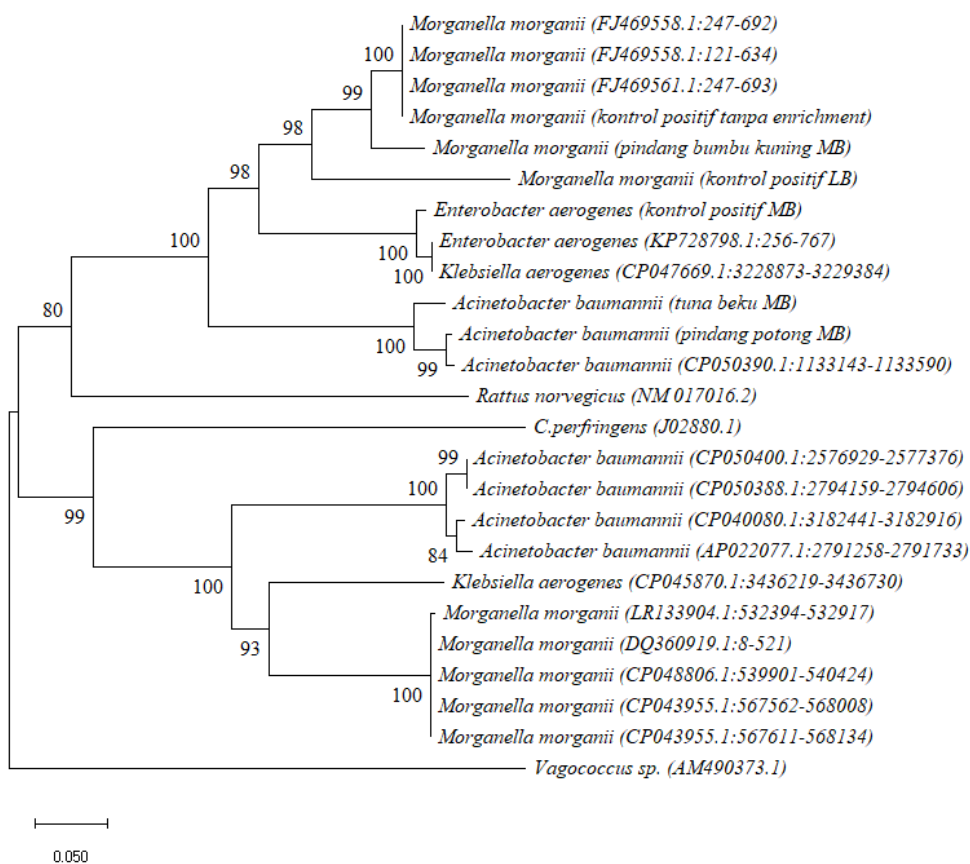
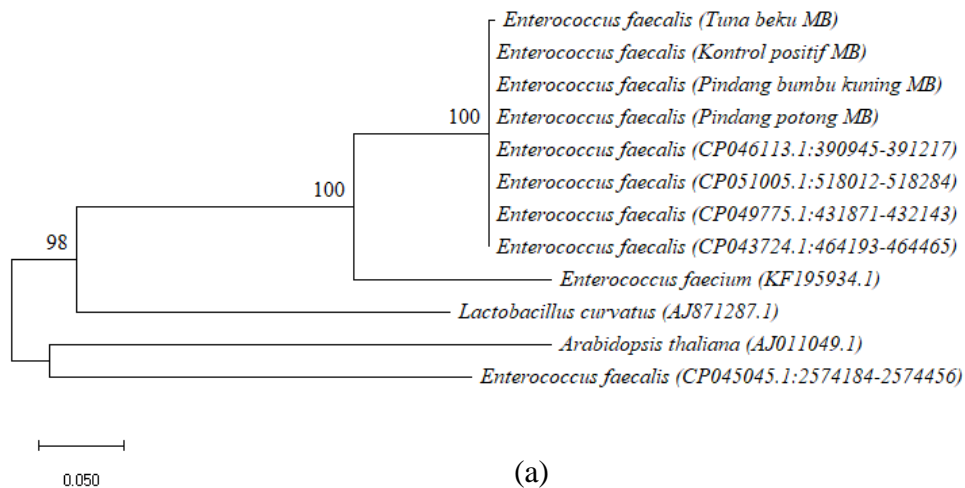
Sampel	Enrichment	Gen	Hasil analisis	% Identitas	Kode akses
Kontrol positif	Tanpa	<i>ldc</i>	<i>Citrobacter</i> sp.	83,50	CP047606.1
	Tanpa	<i>hdc</i>	<i>M. morganii</i>	99,05	CP043955.1
	Lactose broth	<i>ldc</i>	<i>Hafnia paralvei</i>	87,87	CP014031.2
	Lactose broth	<i>hdc</i>	<i>M. morganii</i>	85,75	CP043955.1
	Marine broth	<i>ldc</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	85,45	CP033466.1
	Marine broth	<i>tdc</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	95,00	CP046111.1
	Marine broth	<i>hdc</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	97,00	KP728798.1
	Marine broth	<i>ldc</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	91,03	CP056474.1
Tanpa bumbu	Marine broth	<i>tdc</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	96,04	CP030076.1
	Marine broth	<i>hdc</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	90,72	KJ768338.1
Pandang kuning	Marine broth	<i>ldc</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	89,46	CP020528.1
	Marine broth	<i>tdc</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	88,82	CP049775.1
Pandang potong	Marine broth	<i>hdc</i>	<i>M. morganii</i>	93,20	FJ469561.1
	Marine broth	<i>ldc</i>	<i>Enterobacter hormaechei</i>	96,04	CP030076.1
Pandang potong	Marine broth	<i>tdc</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	95,29	CP046113.1
	Marine broth	<i>hdc</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	94,29	CP040080.1

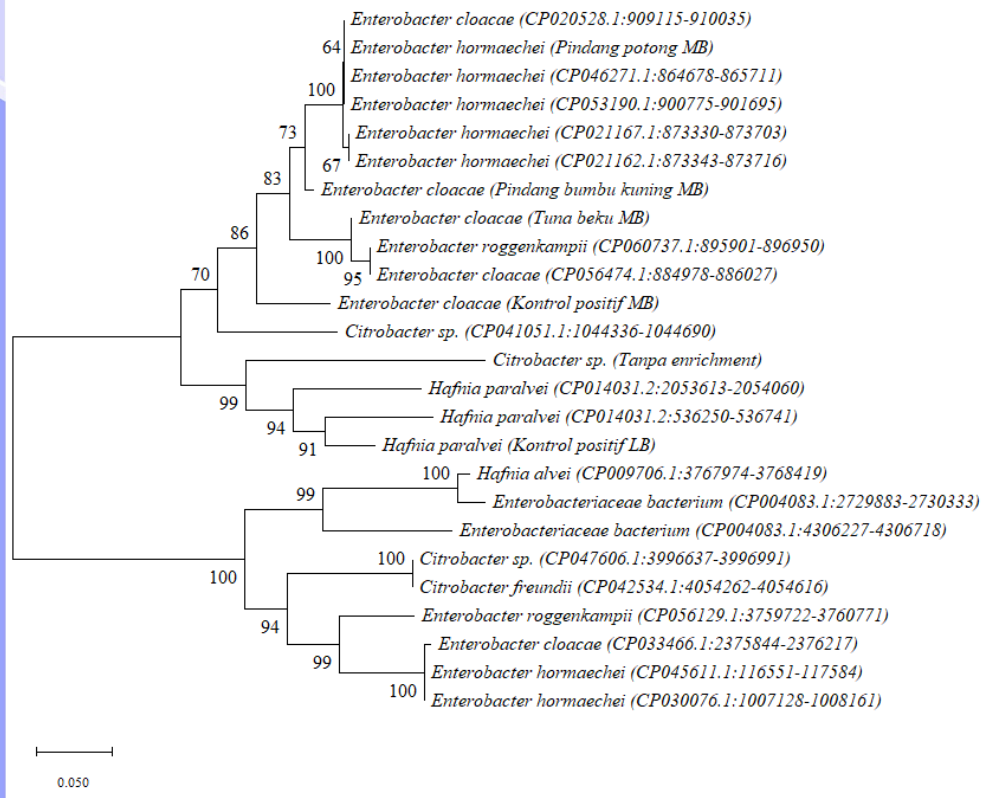
Bakteri pembentuk tiramin (gen *tdc*) pada penelitian ini yaitu teridentifikasi *Enterococcus fecalis*. Abdullah *et al.* (2020) melaporkan pada identifikasi spesies bakteri pembentuk tiramin di antaranya *C. divergens* dan *Enterobacter tabaci*, berbeda dengan yang teridentifikasi pada penelitian, mungkin dikarenakan media yang berhasil menumbuhkannya juga berbeda. Bargossi *et al.* (2015) melaporkan bahwa pengujian bakteri *E. fecalis* dan *E. fecium* merupakan bakteri penghasil tiramin, kedua jenis bakteri tersebut menghasilkan tiramin dalam jumlah yang tinggi sejak fase pertumbuhan eksponensial.

Identifikasi bakteri dapat dipercaya berdasarkan persentase identitas bakteri tersebut dengan urutan nukleotida bakteri yang terdapat pada database *geneBank* dengan kode akses tertentu. Pearson (2013) menyatakan bahwa nilai persentase identitas adalah perbandingan kemiripan sekuen antara spesies yang diujikan dengan data spesies yang ada di *genBank*. Hasil persentase identitas pada penelitian ini berkisar antara 77,93-99,05%, beberapa sampel belum masuk pada kategori identik dengan hasil di database. Bhattacharjee *et al.* (2012) menyatakan bahwa kisaran persentase identitas dikategorikan identik apabila persentase identitas mencapai 97-100%. Persen identitas yang semakin tinggi menunjukkan semakin dekat kekerabatan suatu spesies tersebut.

Sekuen hasil sekuensing yang diperoleh kemudian disejajarkan dengan nukleotida bakteri yang memiliki persentase identitas tinggi serta bakteri *non-group* dari *genBank*. *Non-group* tersebut dipakai sebagai pembandingan, melihat sekuen yang kita miliki seberapa dekat kekerabatan dengan *database*. Hasil penyejajaran nukleotida kemudian disusun membentuk pohon filogenetik untuk melihat kekerabatan bakteri yang teridentifikasi dengan bakteri yang sudah terdapat pada *genBank*. Pohon filogenetik dibuat berdasarkan masing-masing gen yang digunakan, sehingga pada penelitian ini terdapat 3 struktur pohon filogenetik gen

*tdc*, *hdc* dan *ldc* (Gambar 8). Konstruksi pohon dibuat menggunakan metode *Neighbour joining tree* dengan nilai *bootstrap* 1000 karena efektif untuk menghitung tingkat kekerabatan spesies (Ward *et al.* 2005).





(c)  
Gambar 8 Pohon filogenetik: (a) gen *tdc*, (b) *hdc*, (c) *ldc*.

Hasil yang diperoleh berdasarkan Gambar 8 menunjukkan bakteri sampel yang diteliti mengelompok pada bakteri yang memiliki kemiripan spesies. Bakteri-bakteri pembentuk amina biogenik amin mengelompok pada bakteri yang memiliki struktur sekuen sama. Bakteri pembentuk tiramin yang disandikan oleh gen *tdc* mengelompok pada bakteri *Enterococcus faecalis*. Bakteri pembentuk histamin melalui gen *tdc* mengelompok pada bakteri *M. morgani* strain ATC, *Enterobacter aerogenes* strain DI dan *Acinetobacter baumannii* strain VB723. Bakteri pembentuk kadaverin mengelompok pada bakteri *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter* sp. dan *Hafnia alvei*. Nilai yang terdapat pada setiap percabangan pohon menandakan nilai bootstrap, yaitu nilai kepercayaan dari kekerabatan bakteri tersebut. Nilai bootstrap yang semakin tinggi yaitu semakin baik dan dapat dipercaya. Nilai bootstrap pada pohon filogenetik dikatakan stabil jika nilai di atas 95% dan dikatakan tidak stabil jika nilai bootstrap berada di bawah 70% (Nakano & Osawa 2004). Nilai bootstrap mendekati 100% dan atau sama dengan 100% menunjukkan percabangan sangat kuat (Prehadi *et al.* 2015)

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.  
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



## IV SIMPULAN DAN SARAN

### 4.1 Simpulan

Media terpilih yang dapat mengamplifikasi gen target *hdc*, *tdc* dan *ldc* sebagai pembentuk amina biogenik pada ikan *scombridae* yaitu *marine broth*. Gen *tdc*, *hdc* dan *ldc* terdeteksi secara *multiplex* PCR pada ikan tuna beku, pindang potong dan pindang bumbu kuning. Bakteri pembentuk amina biogenik pada ikan tuna beku, berdasar gen *hdc* yaitu *A. baumannii*, gen *tdc* *Enterococcus faecalis* dan gen *ldc* *Enterobacter cloacae*. Bakteri pembentuk amina biogenik pada pindang potong, berdasar gen *hdc* yaitu *A. baumannii*, gen *tdc* *Enterococcus faecalis* dan gen *ldc* *Enterobacter hormaechei*. Bakteri pembentuk amina biogenik pada pindang bumbu kuning, berdasar gen *hdc* yaitu *M. morganii*, gen *tdc* *Enterococcus faecalis* dan gen *ldc* *Enterobacter hormaechei*. Primer spesifik bakteri pembentuk amina biogenik *M. morganii* dan *C. divergens* terdeteksi pada seluruh sampel secara *multiplex* PCR.

### 4.2 Saran

Saran pada penelitian ini yaitu penapisan bakteri menggunakan penambahan asam amino prekursor pada media *enrichment*. Penentuan primer bakteri spesifik pembentuk kadaverin untuk penelitian selanjutnya. Saran lainnya yaitu penggunaan metode deteksi kuantitatif *multiplex* qPCR agar dapat melakukan analisis *high throughput* pada berbagai jenis olahan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah A, Nurilmala M, Budiarti AS. 2020. Application of end-point PCR technique to detect bacteria encoding tyrosine decarboxylase (TDC) gene in scombridae fish. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 404, 012072:1-8.
- Agrawal S. 2008. Techniques in Molecular Biology. Lucknow (IN): International Book Distributing Co.
- Ahmed OB, Asghar AH, Elhassan MM. 2014. Comparison of three DNA extraction methods for polymerase chain reaction (PCR) analysis of bacterial genomic DNA. *AJMR*. 8(6): 598-602.
- Ahmed OM. 2019. Histamine and other biogenic amines formation in canned tuna fish inoculated with *Morganella Morganii* or *Proteus Mirabilis* in determining food safety during temperature abuse. *NUFT*. 3(4): 6990-700.
- Anggraeni D, Nurjanah, Asmara DA, Hidayat T. 2019. Kelayakan industri pengolahan ikan dan mutu produk UMKM pindang tongkol di Kabupaten Banyuwangi. *JPHPI*. 22(1): 14-23.
- Apte A, Daniel S. 2003. *PCR primer design. PCR Primer: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Edition*. Dieffenbach CW, Dveksler GS, editor. New York (US): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Arisanti RR, Indriani C, Wilopo SA. 2018. Kontribusi agen dan faktor penyebab kejadian luar biasa keracunan pangan di Indonesia: kajian sistematis. *Berita Kedokteran Masyarakat*. 34(3): 99-106.
- Arulkumar A, Paramasivam S, Rameshthangam P, Paramithiotis S. Evaluation of psychrophilic, mesophilic, histamine forming bacteria and biogenic amine content in the muscle of mudspiny lobster, *Panulirus polyphagus* (HERBST, 1793) during ice storage. *J Food Saf*. 39:e12582: 1-7.
- Avcı M dan Tuncer BÖ. 2017. Safety Evaluation of enterocin producer *Enterococcus* sp. strains isolated from traditional Turkish cheeses. *PJM*. 66(2): 223-233.
- Björnsdóttir-Butler K, Jones JL, Benner R, Bukhardt W. 2011. Development of a real-time PCR assay with an internal amplification control for detection of Gram-negative histamine-producing bacteria in fish. *Food microbiol*. 28: 356-363.
- Björnsdóttir-Butler K, Bolton GE, Jaykus LA, Green PDM, Green DP. 2010. Development of molecular-based methods for determination of high histamine producing bacteria in fish. *Int J of Food Microbiol*. 139: 161-167.
- Boondireke S, Mungthin M, Tan-ariya P, Boonyongsunchai P, Naaglor T, Wattanatham A, Treewatchareekorn S, Leelayoova S. 2010. Evaluation of sensitivity of multiplex PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Pneumocystis jirovecii* in clinical samples. *J Clin Microbiol*. 48(9):3165-3168.

- Buňková L, Bunka F, Pollaková E, Podešvová T, V Dráb. 2011. The effect of lactose, NaCl and an aero/anaerobic environment on the tyrosine decarboxylase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. *Int J Food Microbiol.* 147: 112-119.
- [BSN] Badan Standarisasi Nasional. 2013. *SNI 2729:2013. Ikan Segar*. Jakarta (ID): Badan Standarisasi Nasional.
- Connil N, Plissoneau L, Onno B, Pilet MF, Prévost H, Dousset X. 2002. Growth of *Carnobacterium divergens* V41 and production of biogenic amines and divercin V41 in sterile cold-smoked salmon extract at varying temperatures, NaCl levels, and glucose concentrations. *J Food Prot.* 65(2): 333-338.
- Coton M, Coton E, Lucas P, Lonvaud A. 2004. Identification of the gene encoding a putative tyrosine decarboxylase of *Carnobacterium divergens* 508. Development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria. *Food microbial.* 21: 125-130.
- Cousin FJ, Guellec RL, Chuat V, Dalmasso M, Laplace J, Cretenet M. 2019. Multiplex PCR for rapid identification of major lactic acid bacteria genera in cider and other fermented foods. *Inst J Food Microbiol.* 291:17-24.
- Curiel JA, Ruiz-Capillas C, de Las Rivas B, Carrascosa AV, Jiménez-Colmenero F, Muñoz R. 2011. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and enterobacteria isolated from fresh pork sausages packaged in different atmospheres and kept under refrigeration. *Meat Science.* 88(3): 368-373.
- de las Rivas B, Marcobal A, Carrascosa AV, Muñoz R. 2006. PCR detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine. *J Food Prot.* 69(10): 2509-2514.
- de las Rivas B, Marcobal A, Muñoz R. 2005. Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines. *FEMS.* 244:367-372.
- Diez-Ozaeta I, Amárita F, Lavilla M, Rainieri S. 2019. Ecology of indigenous lactic acid bacteria from Rioja Alavesa red wines, focusing on biogenic amine production ability. *Food Sci Technol.* 116: 1-8.
- [EFSA] European Food Safety Authority. 2011. Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *EFSA J.* 9: 2393.
- Emborg J. 2005. *Morganella psychotolerans*- Identification, histamine formation and importance for histamine fish poisoning. [PHD thesis]. Denmark (DK): Technical University of Denmark.
- Espinosa-Pesqueira D, Roig-Sagués AX, Hernández-Herrero MM. 2018. Screening method to evaluate amino acid-decarboxylase activity of bacteria present in spanish artisanal ripened cheeses. *Foods.* 182(7): 1-15.
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Public Health Risk of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products*. Rome (IT): Food and Agriculture Organization of the United Nations.



- Fatchiyah, Arumingtyas ES, Widyarti S, Rahayu S. 2011. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta (ID): Penerbit Erlangga.
- [FDA] Food and Drug Administration. 2011. Scombrototoxin (histamine) formation. Didalam: *Fish and Fishery Product Hazards and Control Guide*. Washington (US): Department of Health and Human Service, Center for Food safety and applied nutrition.
- Ferrario C, Borgo F, de las Rivas B, Muñoz R, Ricci G, Fortina MG. 2014. Sequencing, characterization, and gene expression analysis of the histidine decarboxylase gene cluster of *Morganella morganii*. *Curr Microbiol*. 68:404-411.
- Ferrario C, Ricci G, Borgo F, Fortina MG. 2012. Species-specific DNA probe and development of a quantitative PCR assay for the detection of *Morganella morganii*. *Lett Appl Microbiol*. 54:292-298.
- Fadhlaoui-Zid K, Curiel JA, Landeta G, Fattouch S, Reverón I, de las Rivas B, Sadok S, Muñoz R. 2012. Biogenic amine production by bacteria isolated from ice-preserved sardine and mackerel. *Food Control*. 25(1): 89-95.
- Han Z, Sun J, Lv A, Sung YY, Sun X, Shi H, Hu X, Wang A, Xing K. 2018. A modified method for genomic DNA extraction from the fish intestinal microflora. *AMB Expr* 8, 52: 1-8.
- Hariono. 2019. Nilai dan volume ekspor tuna, cakalang, tongkol periode Januari-Maret (Triwulan I) tahun 2019 mengalami kenaikan. *Balai Besar Pengujian Penerapan Hasil Perikanan, Direktorat Jenderal Penguatan Daya Saing Produk Kelautan dan Perikanan*. [Internet]. [diunduh 2020 Jan 18]. Tersedia pada: <https://kkp.go.id/djpdspkp/bbp2hp/artikel/11444-nilai-dan-volume-ekspor-tuna-cakalang-tongkol-periode-januari-maret-triwulan-i-tahun-2019-mengalami-kenaikan>.
- Howe C. 2007. *Gen Cloning and Manipulation. Second Edition*. Cambridge University press. New York (USA).
- Hwang CC, Lee YC, Huang YR, Lin CM, Shiau CY, Hwang DF, Tsai YH. 2010. Biogenic amines content, histamine-forming bacteria and adulteration of bonito in tuna candy products. *Food control*. 21: 845-850.
- Ibrahim HK, Almayah AA, Issa AH. 2017. Molecular detection of environmental *Morganella morganii* as histamine producing bacteria. *DJMMS*. 4(2):8-13.
- Janda JM, Abbott SL. 2006. *The Enterobacteria. 2nd ed*. Washington DC (AS): ASM Pr.
- Kim SH, An H, Field KG, Wei CI, Velazquez JB, Ben GB, Morrissey MT, Price RJ, Pitta TP. 2003. Detection of *Morganella morganii*, a prolific histamine former, by the polymerase chain reaction assay with 16S rDNA-targeted primers. *J Food Prot*. 66(8): 1385-1392.
- Kim DH, Kim KBWR, Ahn DH. 2013. Inhibitory effects of high-hydrostatic-pressure treatments on histamine production in mackerel (*Scomber japonicus*) muscle inoculated with *Morganella morganii* and *Photobacterium phosphoreum*. *Food Control*. 34:307-311.

- Laursen BG, Bay L, Cleenwerck I, Vancanneyt M, Swings J, Dalgaard P, Leisner J. 2005. *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood: Phenotypic and genotypic characterization. *Syst Appl Microbiol*. 28(2):151-164.
- Leisner JJ, Laursen BG, Prévost H, Drider D, Dalgaard P. 2007. *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS*. 31:592-613.
- Liu X, Xu Y, Li Z, Jiang S, Yao S, Wu R, An Y. 2018. A silica sands-based method for faithful analysis of microbial communities and DNA isolation from a wide range of species. *Prep Biochem Biotechnol*. 48(4): 378-382.
- Lorenz TC. 2012. Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*. 63(5): 1-15.
- Mah J, Park YK, Jin YH, Lee J, Hwang H. 2019. Bacterial production and control of biogenic amines in asian fermented soybean foods. *Foods*. 8(2): 1-15.
- Maksimovic AZ, Zunabovic-Pichler M, Kos I, Mayrhofer S, Hulak N, Domig KJ, Fuka MM. 2018. Microbiological hazards and potential of spontaneously fermented game meat sausages: A focus on lactic acid bacteria diversity. *LWT-Food Sci Technol*. 89: 418-426.
- Marcobal A, de Las Rivas B, Landete JM, Tabera M, Munoz R. 2012. Tyramine and Phenylethylamine biosynthetic by food bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 52(5): 448-467.
- Mokrani T, Essid I, Hassouna M, Jihene L, Abdeljalil G, Jouini A. 2018. Phenotypic and genotypic characterization of *Carnobacterium divergens* isolated from refrigerated Tunisian minced raw beef meat. *Gene Technol*. 7(1): 1-5.
- Moreno-Arribas MV, Polo MC, Jorganes F, Muñoz R. 2003. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Int J Food Microbiol*. 84:117-123.
- Mufty MM. 2008. Application of a real time PCR method for detection of *Salmonella* spp. in shrimp and scallop and its partial validation. Fisheries Training Programme. Iceland (EU): The United Nation University.
- Mumpuni FS, Hasibuan S. 2018. Prevalensi mikroba pada produk pindang tongkol skala UKM di Pelabuhan Ratu, Sukabumi. *JPHPI*. 21(3): 480-485.
- Nadya HF. 2019. Pemanfaatan gen pengkode *odc* dan *ldc* untuk deteksi dini pembentukan putresin dan kadaverin pada ikan *scombridae*. [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Nakano T, Ozawa T. 2004. Phylogeny and historical biogeography of limpets of the order Patellogastropoda based on mitochondrial DNA sequences. *J Molluscan Stud*. 70: 31-41.
- Nitta Y, yasukata F, Kitamoto N, Ito M, Sakaue M, Kikuzaki H, Ueno H. 2016. Inhibition of *Morganella morganii* histidine decarboxylase activity and histamine accumulation in mackerel muscle derived from filipendula ulumaria extracts. *J Food Prot*. 79(3): 463-467.

- Nugraha R, Nurilmala M, Nurjanah, Pratama P. 2020. Detection of *Salmonella* sp. in fisheries product using realtime PCR. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 404, 012012: 1-5.
- Nurilmala M, Abdullah A, Matutina VM, Nurjanah, Yusfiandayani R, Sondita MFA, Hizbullah HH. 2019. Perubahan kimia, mikrobiologis dan karakteristik gen *HDC* pengkode histidin dekarboksilase pada ikan tongkol abu-abu *Thunnus tonggol* selama penyimpanan suhu dingin. *JITKT*. 11(2):285-296.
- Nurilmala M, Saputri NN, Abdullah A, Nurjanah, Yusfiandayani R, Sondita MFA. 2020 Nov. Detection of histamine producing bacteria through histidine decarboxylase (*hdc*) gene on tuna, little tuna and skipjack. *Squalen Bull of Mar and Fish Postharvest and Biotech*. 15(3):131-139.
- O'Hara CM, Brenner FW, Miller JM. 2000. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clin Microbiol Rev*. 13:534–546.
- Olson ND, Morrow JB. 2012. DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Research Notes*. 5(668): 1-14.
- Özoğul F. 2004. Production of biogenic amines by *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Hafnia alvei* using a rapid HPLC method. *Eur Food Res Technol*. 219:465–469.
- Pearson WR. 2013. An introduction to sequences similiarity (homology) searching. *Bioinformatics*. 3(1):1-3.
- Podeur G, Dalgaard P, Lero F, Prévost H, Emborg J, Martinussen J, Hansen LH, Pilet MF. Development of a real-time PCR method coupled with a selective pre-enrichment step for quantification of *Morganella morganii* and *Morganella psychrotolerans* in fish products. *Int J Food Microbiol*. 203:55-62.
- Poveda JM, Ruiz P, Seseña S, Palop ML. 2017. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria during a craft brewing process. *LWT-Food Sci Technol*. 85A: 129-136.
- Prehadi, Sembiring A, Kurniasih EM, Rahmad, Arafat D, Subhan B, Madduppa HH. 2015. DNA barcoding and phylogenetic reconstruction of shark species landed in muncar fisheries landing site in comparison with southern java fishing port. *Biodiversitas*. 16(1):55-61.
- Rosiana R. 2015. *Ikan Tuna dan Produk Olahan Tuna (Market Brief)*. London (LDN): Atase Perdagangan London, Kedutaan Besar Republik Indonesia.
- Sambrook J, Russell D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> Edition*. New York (US): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Settanni L, Corsetti A. 2007. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: A review. *J Microbiol Methods*. 69(1):1-22
- Sholeh K. 2018. Kinerja ekspor produk perikanan Indonesia tahun 2018, *Direktorat Jenderal Penguatan Daya Saing Produk Kelautan dan Perikanan*. [Internet].

[2020 Jan 18]. Tersedia pada: <https://kkp.go.id/djpdspkp/artikel/7947-kinerja-ekspor-produk-perikanan-indonesia-tahun-2018>.

- Simora RMC, Peralta EM. 2018. *Occurrence of Histamine and Histamine-forming Bacteria in Philippine Traditional Dried-salted Fish Products*. *Asian Fisheries Sci*. 31: 73-88.
- Sint D, Raso L, Traugott M. 2012. Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *MEE*. 3: 898-905.
- Surzycki. 2000. Rapid Isolation of DNA from *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*. 46(1): 283-285.
- Tamura K, Glen S, Daniel P, Alan F, Sudhir K. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 33(2):11-25.
- Trevisani M, Cecchini M, Fedrizzi G, Corradini A, Mancusi R, Tothi E. 2019. Biosensing the histamine producing potential of bacteria in tuna. *Front Microbiol*. 10: 1-11.
- Urs VSR, Ramlal S, Batra HV, Naika M, Jeyabalaji KJ. 2019. An in-vitro screening for biogenic amines producing microorganisms from fermented foods and its degradation by bacteria from *Canine Saliva*. *J Pure Appl Microbiol*. 13(1):271-280.
- Wahyunik S. 2020. Editor Rachmawati AN. *Warga Jember Keracunan Ikan Tongkol di Malam Tahun Baru, Hasil Lab Ungkap Faktor Penyebab Sebenarnya*. *Tribun Jember.com* [Internet]. [2020 Nov 6]. Tersedia pada: <https://jatim.tribunnews.com/2020/01/24/warga-jember-keracunan-ikan-tongkol-di-malam-tahun-baru-hasil-lab-ungkap-faktor-penyebab-sebenarnya?page=3>.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Herbert PDN. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Sci*. 360: 1847-1857.
- Wongsariya K, Bunyaphatsara N, Yasawong M, Chomnawang MT. 2015. Development of molecular approach based on PCR assay for detection of histamine producing bacteria. *J Food Sci Technol*. 53(1): 640-648.
- Xiong Z, Cao L, Wang G, Xia Y, Yang Y, Bai W, Ai L. 2020. Isolation of biogenic amine-negative lactic acid bacteria for Chinese rice wine fermentation based on molecular marker reverse screening. *J Sci Food Agric*. 100: 3257–3261.
- Yang Q, Meng J, Zhang W, Liu L, He L, Deng L, Zeng X, Ye C. 2020. Effects of amino acid decarboxylase genes and pH on the amine formation of enteric bacteria from Chinese traditional fermented fish (suan yu). *Front Microbiol*. 11: 1-14.
- Yazgan H, Kuley E, Gökmen TG, Regenstein JM, Özogul F. 2020. The antimicrobial properties and biogenic amine production of lactic acid bacteria isolated from various fermented food products. *J Food Process Preserv*. 1-10.
- Yuwono T. 2006. *Teori dan aplikasi polymerase chain reaction*. Yogyakarta (ID): Penerbit Andi Yogyakarta.

## RIWAYAT HIDUP

Penulis merupakan putri ke-2 dari pasangan Kosasih dan Euis Sumartini yang dilahirkan di Sumedang pada Tanggal 21 Juli 1993. Penulis telah menyelesaikan pendidikan di SD Negeri Cikadu (2000-2006), SMP Negeri 2 Situraja (2006-2009), SMA Negeri Situraja (2010-2012). Pendidikan sarjana pada program studi Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor (2012-2017). Tahun 2018 penulis melanjutkan pendidikan pascasarjana di Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.

Penulis merupakan staf administrasi di Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor sejak tahun 2018. Penulis merupakan pengurus kesekretariatan organisasi Masyarakat Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia (MPHPI) dan Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia (JPHPI). Selama masa pendidikan, penulis juga menjadi asisten praktikum Karakteristik Bahan Baku Hasil Perairan (S1 dan S2), Transportasi Hasil Perairan (S1 dan S2), Desain Alat Hasil Perairan Indonesia (S1), Biomolekuler Hasil Perairan Indonesia (S2). Kegiatan lain yang penulis ikuti di antaranya menjadi panitia seminar nasional MPHPI, seminar nasional penyuluhan perikanan dan kelautan (STP Bogor) tahun 2019, seminar Internasional dan *Summer course Enhancing Marine Biodiversity Research in Indonesia* (EMBIO) tahun 2019. Penulis juga menjadi asisten kegiatan penelitian Sistem Inovasi Nasional melalui Peningkatan Sinergi (INSINAS) dari Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi atas nama Dr Mala Nurilmala SPi, MSi, sekaligus menjadi penelitian pada penyusunan tesis ini.

@Hak cipta milik IPB University

IPB University