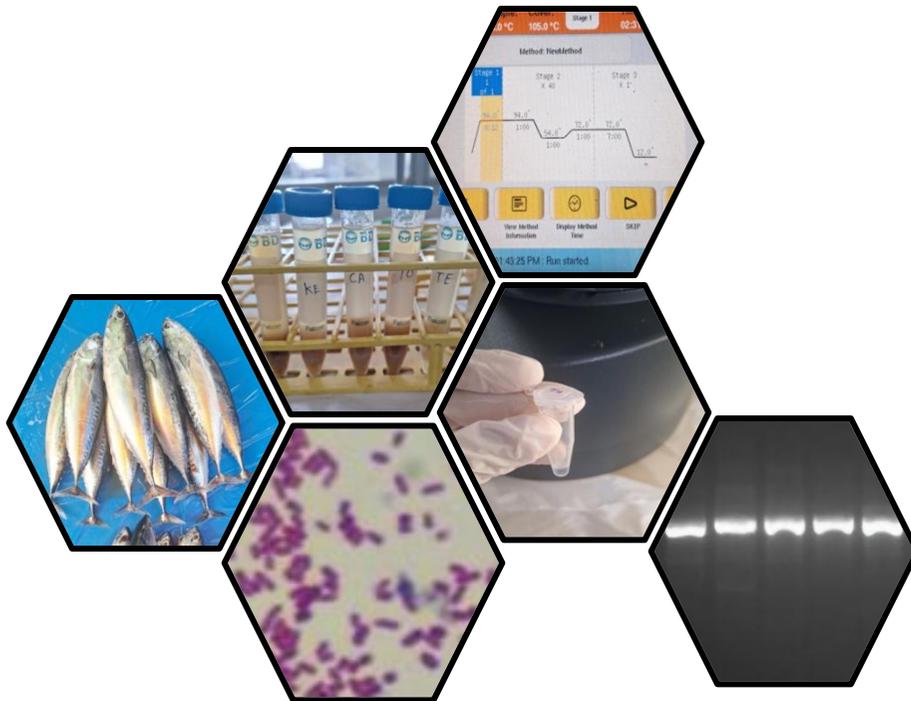


**DETEKSI GEN HISTIDINE DECARBOXYLASE (HDC) DARI BAKTERI
Morganella morganii PADA IKAN FAMILI SCOMBRIDAE**



**NURUL ARDIYAH SARI
H041 20 1073**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**DETEKSI GEN HISTIDINE DECARBOXYLASE (HDC) DARI BAKTERI
Morganella morganii PADA IKAN FAMILI SCOMBRIDAE**

**NURUL ARDIYAH SARI
H041 20 1073**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**DETEKSI GEN HISTIDINE DECARBOXYLASE (HDC) DARI BAKTERI
Morganella morganii PADA IKAN FAMILI SCOMBRIDAE**

NURUL ARDIYAH SARI
H041 20 1073

Skripsi

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Biologi

pada

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

SKRIPSI

**DETEKSI GEN HISTIDINE DECARBOXYLASE (HDC) DARI BAKTERI
Morganella morganii PADA IKAN FAMILI SCOMBRIDAE****NURUL ARDIYAH SARI****H041201073**

Skripsi,

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sarjana Biologi pada 03 Oktober
2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

pada



Program Studi Biologi
Departemen Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan,
Pembimbing Utama



Dr. Rosana Agus, M.Si
NIP. 196509051991032003

Mengetahui,
Ketua Program Studi



Dr. Magdalena Litay, M.Sc
NIP. 196409291989032002

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "Deteksi Gen Histidine Decarboxylase (HDC) dari Bakteri *Morganella morganii* pada Ikan Famili Scombridae" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing Dr. Rosana Agus, M. Si., sebagai Pembimbing utama. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang 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 skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.



NURUL ARDIYAH SARI
H041 20 1073

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmanirrahim.

Segala puji dan syukur kepada Allah *Subhanahu wata'ala* atas segala rahmat, hidayah, dan karunia-Nya yang tidak terhingga kepada setiap hambanya serta shalawat dan salam kepada junjungan Nabi besar Muhammad *Shallahallahu alaihi wassallam* beserta keluarga dan para sahabatnya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Deteksi Gen Histidin Decarboxylase (HDC) dari Bakteri *Morganella morganii* pada Ikan Famili Scombridae". Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana dari Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa dalam penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga penulis mengharapkan kritik dan saran untuk dapat memperbaiki kekurangan penulis dikemudian hari. Selama penelitian sampai dengan tersusunnya skripsi ini, penulis banyak mendapatkan bantuan dari berbagai pihak. Untuk itu, penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada orangtua penulis, Ibunda Kartini dan Ayahanda M. Suyuti terima kasih yang tak terhingga atas doa, dan dukungan kepada penulis. Penulis mengucapkan terima kasih banyak atas segala bantuan yang diberikan baik berupa bimbingan kritik, saran, serta motivasi yang membantu penulis selama proses penulisan skripsi ini hingga selesai, demikian pula penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M. Sc selaku Rektor Universitas Hasanuddin beserta jajarannya.
2. Bapak Dr. Eng Amiruddin Selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar, beserta staf pegawainya.
3. Ibu Dr. Magdalena Litaay, M.Sc. selaku Ketua Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin,
4. Ibu Dr. Rosana Agus, M.Si selaku dosen pembimbing yang telah memberikan arahan, saran, dan masukan selama penyusunan skripsi.
5. Ibu Dr. Zohra Hasyim selaku penasehat akademik yang telah memberikan banyak arahan bagi penulis selama masa perkuliahan.
6. Bapak Ibu dosen Departemen Biologi yang telah memberikan ilmu pengetahuan kepada penulis selama menempuh pendidikan di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.
7. Staf Departemen Biologi, yang telah membantu penulis dalam keperluan akademik selama perkuliahan maupun dalam penyelesaian tugas akhir.
8. Laboran Lab Hum-RC kak Nursamsi, dan Bapak Safri, yang telah membimbing, dan memberikan masukan kepada penulis dalam mengerjakan pebelitian di lab HUM-RC
9. Rekan tim penelitian saya, Nurul Dinza, dan Adiatna yang telah menemani selama proses penelitian dan penyusunan tugas akhir.

10. Sahabat-sahabat seperjuangan Asti Khaerani, Wilda Aulia Febriani, Mutmainnah, Asriyah Irfiana, Vemy Arruanlaya, dan Indira Djiloi yang selalu memberika semangat, memberikan dukungan dan menemani selama proses perkuliahan.
11. Teman-teman BIOTROPIC yang telah banyak membantu penulis selama masa perkuliahan.
12. Serta berbagai pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini, penulis mengucapkan terima kasih banyak.

Ucapan terima kasih yang dapat penulis haturkan kepada semua pihak yang telah membantu. Penulis berharap dari penulisan skripsi inisemoga mendapatkan ridho-Nya dan bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Makassar, 20 Agustus 2024

Penulis

ABSTRAK

NURUL ARDIYAH SARI. **Deteksi Gen Histidin Decarboxylase (HDC) dari Bakteri *Morganella morganii* pada Ikan Famili Scombridae** (dibimbing oleh Rosana Agus)

Latar Belakang. Ikan mengandung asam amino histidin yang terdapat pada daging ikan. Asam amino histidin ini dapat diubah menjadi histamin oleh bakteri penghasil histamin yang bila terkandung pada daging ikan dalam konsentrasi tinggi dapat menyebabkan alergi. Ikan yang banyak mengandung histamin adalah golongan scombridae. Bakteri penghasil histamin yang paling sering ditemukan pada ikan adalah bakteri *Morganella morganii*. Bakteri penghasil histamin mengubah histidin menjadi histamine dengan menghasilkan enzim Histidine Decarboxylase (HDC). **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis hasil kultur bakteri penghasil histamin dan menganalisis hasil deteksi gen histidin dekarboksilase (HDC) dari bakteri penghasil histamin *Morganella morganii* pada famili ikan scombridae. **Metode.** Penelitian ini dilakukan dengan tahapan penghancuran sampel ikan, kultur bakteri penghasil histamin, isolasi dna bakteri, dan deteksi gen hdc menggunakan primer gen HDC untuk bakteri *Morganella morganii*. **Hasil.** Dari hasil kultur bakteri pada media luria broth + L-Histidin didapatkan hasil adanya pertumbuhan bakteri dan dari hasil pewarnaan gram didapatkan bakteri gram negatif berbentuk basil. Kemudian dari hasil amplifikasi didapatkan pita DNA dari lima sampel kultur bakteri penghasil histamin menunjukkan pita yang seragam dan bersih tanpa pengotor. Hasil amplifikasi DNA bakteri yang terdapat pada beberapa ikan sampel dari famili scombridae, didapatkan semua ikan memiliki gen HDC dari bakteri *Morganella morganii* dengan panjang urutan gen 1137 bp. **Kesimpulan.** Diperoleh hasil kultur bakteri penghasil histamin yang didapatkan adalah bakteri gram negatif bentuk basil dan hasil deteksi gen Histidin Decarboxylase (HDC) menunjukkan pita dna yang tebal dan seragam. Data ini diharapkan dapat menjadi informasi untuk merencanakan strategi yang lebih efektif untuk mencegah atau mengendalikan produksi histamin dalam ikan.

Kata Kunci: Deteksi Gen, Histidine Decarboxylase (HDC), *Morganella morganii*, Scombridae

ABSTRACT

NURUL ARDIYAH SARI. **Detection of the Histidine Decarboxylase (HDC) Gene from *Morganella morganii* Bacteria in Fish of the Scombridae Family** (supervised by Rosana Agus)

Background. Fish contain the amino acid histidine, which is present in their muscle tissue. This amino acid can be converted into histamine by histamine-producing bacteria, which, when present in high concentrations in fish muscle, can cause allergic reactions. Fish from the Scombridae family are particularly rich in histamine. The most frequently found histamine-producing bacterium in fish is *Morganella morganii*. These bacteria convert histidine into histamine by producing the enzyme Histidine Decarboxylase (HDC). **Objective.** This study aims to analyze the culture results of histamine-producing bacteria and to detect the histidine decarboxylase (HDC) gene from *Morganella morganii*, a histamine-producing bacterium, in fish from the Scombridae family. **Methods.** This research involved several stages: the homogenization of fish samples, culturing histamine-producing bacteria, bacterial DNA isolation, and the detection of the HDC gene using HDC-specific primers for *Morganella morganii*. **Results.** The bacterial culture in Luria broth media supplemented with L-histidine indicated bacterial growth. Gram staining showed the presence of Gram-negative bacilli. DNA amplification results from five bacterial culture samples revealed uniform and clean DNA bands without impurities. Amplification of bacterial DNA from several fish samples in the Scombridae family showed that all fish samples contained the HDC gene from *Morganella morganii*, with a gene sequence length of 1137 bp. **Conclusion.** The cultured histamine-producing bacteria were identified as Gram-negative bacilli, and the detection of the Histidine Decarboxylase (HDC) gene showed thick and uniform DNA bands. This data is expected to provide valuable information for planning more effective strategies to prevent or control histamine production in fish.

Keywords: Gene Detection, Histidine Decarboxylase (HDC), *Morganella morganii*, Scombridae

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGAJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	.iii
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACK	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Teori	3
1.2.1 Deteksi Gen	3
1.2.2 Histidine Dekarboxylase (HDC)	4
1.2.3 Bakteri Penghasil Histamin <i>Morganella morganii</i>	6
1.2.4 Famili Scombridae	8
1.3 Tujuan Penelitian.....	10
1.4 Manfaat Penelitian.....	10
BAB II METODE PENELITIAN.....	11
2.1 Waktu dan Tempat Penelitian	11
2.2 Alat dan Bahan	11
2.3 Metode Penelitian	12
2.3.1 Persiapan Penelitian	12
2.3.1.1 Kriteria Sampel	12

2.3.1.2 Rancangan Primer	12
2.3.2 Pelaksanaan Penelitian	13
2.3.2.1 Pengambilan Sampel.....	13
2.3.2.2 Pelumatan Sampel Ikan	13
2.3.2.3 Kultur bakteri pembentuk histamin.....	13
2.3.2.4 Ekstraksi dan isolasi DNA kultur bakteri penghasil histamin.....	14
2.3.2.5 Amplifikasi DNA dengan Polymerase Chain Reaction (PCR).....	15
2.3.2.6 Elektroforesis Gel Agarosa	16
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN	17
3.1 Hasil Kultur Bakteri Penghasil Histamin.....	17
3.2 Deteksi Gen Histidine Decarboxylase dari Bakteri <i>Morganella morganii</i>	20
3.2.1 Kecocokan Primer dengan Hasil Blast.....	20
3.2.2 Hasil Amplifikasi Kultur Bakteri Penghasil Histamin dengan Primer Gen HDC	22
BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN	25
4.1 Kesimpulan	25
4.2 Saran	25
DAFTAR PUSTAKA.....	26
LAMPIRAN	32

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Amplifikasi DNA eksponensial dalam PCR.....	3
2. Ikan-ikan di pelelangan.....	8
3. Pewarnaan gram kultur bakteri penghasil histamin	18
4. Pewarnaan gram kultur bakteri penghasil histamin	19
5. Hasil Blast primer gen hdc bakteri <i>Morganella morganii</i>	20
6. Hasil PCR dengan Primer HDC Bakteri <i>Morganella morganii</i>	22
7. Hasil kultur bakteri penghasil histamine	33
8. Ikan Kembung lelaki <i>Rastrelliger kanagurta</i>	33
9. Ikan Tenggiri banci <i>Acanthocybium solandri</i>	33
10. Ikan Cakalang <i>Katsuwonus pelamis</i>	34
11. Ikan Tongkol Lisong <i>Auxis rochei</i>	34
12. Ikan Tuna Mata Besar <i>Thunnus obesus</i>	34
13. Media Luria Broth	35
14. KIT Ekstraksi DNA	35
15. Inkubator.....	35
16. Tahapan PCR.....	35
17. Pengerjaan Isolasi dna	36
18. Pengerjaan tahapan elektroforesis	36
19. Alat Elektroforesis.....	36
20. Primer Gen hdc	36

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja Penelitian Deteksi Gen Histidine Decarboxylase (HDC) dari Bakteri <i>Morganella morgani</i> pada Ikan Famili Scombridae.....	32
2. Hasil Kultur Bakteri penghasil histamin pada media Luria Broth + L- Histidine...	33
3. Sampel Penelitian.....	33
4. Dokumentasi Pelaksanaan Penelitian.....	35

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Ikan laut merupakan sumber pangan yang kaya nutrisi dan telah menjadi bagian makanan manusia selama ribuan tahun (Steneck RS., dan Pauly D., 2019). Dalam beberapa tahun terakhir, konsumsi ikan laut meningkat secara global karena rekomendasi para ahli gizi yang mengamati manfaat kesehatannya. Konsumsi ikan laut telah dikaitkan dengan banyak manfaat kesehatan, termasuk penyediaan unsur makro dan mikro esensial, serta asam lemak omega-3 dan omega-6, yang penting untuk menjaga kesehatan jantung dan mengurangi peradangan (Stojic A., dkk 2021). Meskipun ikan laut merupakan sumber nutrisi yang berharga dan memiliki banyak manfaat kesehatan, ikan laut juga dapat menyebabkan alergi pada beberapa individu. Reaksi alergi terhadap ikan adalah salah satu alergi makanan yang paling umum, dan dapat berkisar dari ringan hingga parah. Reaksi alergi tersebut dipicu oleh histamin yang ditemukan di jaringan otot ikan. Memasak atau membekukan ikan tidak menghilangkan alergen, dan kandungan histamin yang tinggi pada ikan dapat memicu reaksi alergi pada individu (Bircher A., dkk. 2005).

Penelitian menunjukkan bahwa ikan laut memiliki kandungan senyawa histamin tinggi yang dapat memicu reaksi alergi (Visciano P. dkk., 2014). Histamin adalah salah satu senyawa biogenik amin, yang menyebabkan gatal setelah mengkonsumsi ikan laut. Beberapa gejala penyakit ini adalah gatal-gatal pada tubuh bagian atas, penurunan tekanan darah, sakit kepala, pusing, gatal-gatal pada kulit mual, muntah, diare dan gangguan pernapasan. Di Amerika Serikat, FDA mengatur batas maksimum histamin 50 mg/kg (5 mg/100 g) untuk ikan segar dan ikan kaleng. Di Brazil, Kementerian Pertanian dan Peternakan Brazil telah memberikan batas maksimum histamin 100 mg/kg pada otot ikan segar dan ikan beku, serta untuk ikan kaleng. Sedangkan menurut Standar Nasional Indonesia (SNI) nomor 01-2360 tahun 2008, batas maksimum histamin dalam ikan di Indonesia sebesar 100 mg/kg.¹

Menurut Food and Drug Administration (FDA), kadar histamin di atas 200 mg/kg dapat menyebabkan penyakit yang disebut keracunan tipe scombroid atau keracunan histamin dari ikan famili scombridae. Adanya pembusukan ikan akibat aktivitas mikroorganisme dan enzim dalam tubuh ikan akan menghasilkan senyawa biogenik amin yang terbentuk dari proses dekarboksilasi asam amino bebas. Histamin dengan konsentrasi tinggi dalam makanan berkaitan dengan fermentasi mikroba. Dengan demikian, histamin dapat digunakan sebagai indikator kualitas higienis makanan. Keberadaan histamin pada bahan pangan menunjukkan tingkat kebusukan bahan makanan tersebut. Pembentukan histamin terjadi karena dekarboksilasi histidin oleh bakteri penghasil histamin (HPB) yang mengandung enzim histidin dekarboksilase (Wongsariya dkk., 2016). Proses ini dapat dimulai segera setelah ikan mati dan disimpan pada suhu di atas 4°C untuk jangka waktu lama (FAO,2012). Setelah enzim HDC disintesis, enzim tersebut terus memproduksi histamin bahkan jika bakteri dinonaktifkan (FDA, 2011). Hal tersebut menyebabkan histamin stabil terhadap pemanasan dan tahan terhadap proses pengalengan makanan (McLauchin dkk., 2005).

Pada ikan senyawa histamin disintesis oleh bakteri penghasil histamin (Pawul, dkk., 2021). Bakteri penghasil histamin yang diisolasi pada daging ikan sebagian besar adalah bakteri gram negatif, seperti *Morganella morganii*, *M. psychrotolerans*, *Raoultella planticola*, *Photobacterium phosphoreum*, dan *P. damsela*, yang menghasilkan histamine dan dalam daging ikan melalui aksi dekarboksilase histidin (Bjornsdottir-Butler dkk., 2020; Kanki dkk., 2007). Ikan dapat mengandung sejumlah histamin yang bersifat toksik tanpa menampilkan karakteristik pembusukan jika diamati melalui parameter sensorik yang umum digunakan (Codex Alimentarius Commission 2001). Selain itu Histamin stabil terhadap pemanasan dan tahan terhadap proses pengolahan termasuk proses pengalengan (McLauchin dkk. 2005). Suhu rendah dapat mengontrol bakteri pembentuk histamin (Kerr dkk. 2002), tetapi enzim histidin dekarboksilase yang telah terbentuk akan terus menghasilkan histamin sekalipun bakteri pembentuknya tidak aktif. Enzim histidin dekarboksilase aktif pada ataupun mendekati suhu pembekuan (Sea Grant College Programs 2001) (Prasetiawan. N.R, DKK., 2013).

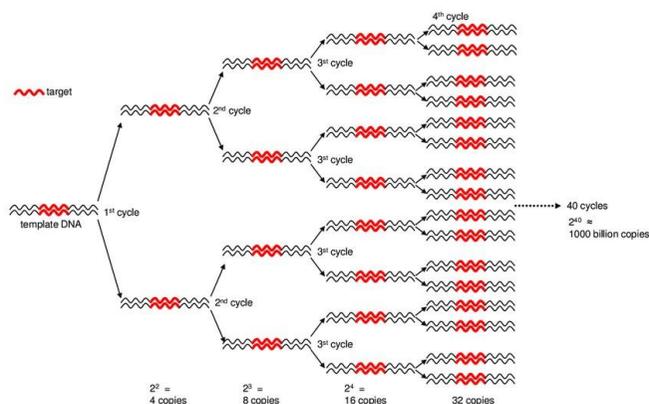
Sejauh ini, hanya sedikit informasi yang tersedia tentang histamin pada ikan di Indonesia khususnya di Provinsi Sulawesi Selatan oleh karena itu, penelitian

ini bertujuan untuk menyelidiki keberadaan gen histidin dekarboksilase (HDC) yang dihasilkan oleh bakteri untuk mengubah histidin menjadi histamin dan mengidentifikasi gen tersebut pada ikan-ikan dari famili scombridae. Oleh karena itu, dari penelitian ini mengumpulkan sampel ikan dari pelelangan ikan, Semua sampel dikultur dan diidentifikasi dengan pewarnaan gram, diikuti dengan deteksi molekuler gen HDC dari bakteri yang telah dikultur.

1.2 Teori

1.2.1 Deteksi Gen

Metode Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik yang digunakan untuk amplifikasi dan deteksi DNA tertentu. Dikembangkan oleh Kary Mullis, PCR bergantung pada penggunaan DNA polimerase termostabil, seperti polimerase Taq, untuk mensintesis untai DNA baru dari cetakan DNA. Proses ini melibatkan penggunaan primer, yang merupakan urutan DNA pendek yang melengkapi daerah target, dan nukleotida (dNTP) sebagai blok penyusun. Reaksi PCR berlangsung melalui serangkaian perubahan suhu: denaturasi pada suhu tinggi untuk memisahkan untai DNA, pemanasan pada suhu rendah untuk memungkinkan primer mengikat urutan target, dan ekstensi pada suhu sedang untuk sintesis DNA. Siklus ini diulang beberapa kali, menghasilkan amplifikasi eksponensial daerah DNA target. Produk yang diperkuat kemudian dapat dianalisis menggunakan teknik seperti elektroforesis gel untuk memvisualisasikan hasil dan mengkonfirmasi keberadaan DNA target (Garibyan L, dkk., 2013).



Gambar 1. Amplifikasi DNA eksponensial dalam PCR.

Polymerase chain reaction (PCR) salah satu metode untuk mendeteksi histamin secara cepat dan akurat walaupun dalam konsentrasi yang rendah, dapat dilakukan dengan target spesifik gen penyandi atau bakteri pembentuknya. Deteksi Histamin dilakukan melalui deteksi enzim yang dihasilkan oleh bakteri. Gen yang menyandikan pembentukan histamin adalah *histidin decarboxylase* (HDC). Deteksi gen *histidin decarboxylase* penyebab terbentuknya histamin pada ikan dilakukan dengan tahapan ekstraksi sampel, kultur bakteri penghasil histamin, isolasi DNA, amplifikasi, dan elektroforesis. Selain tahapan-tahapan tersebut, dilakukan juga pengujian identifikasi bakteri dengan pewarnaan gram, dan pengukuran konsentrasi DNA.

Pengukuran kemurnian dilakukan untuk menguji kemurnian DNA sebelum dilakukan PCR. Keberhasilan PCR dapat bergantung pada kemurnian DNA, tinggi rendahnya nilai kemurnian DNA dapat mempengaruhi hasil PCR. Pengujian kemurnian dapat dilakukan dengan elektroforesis dan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Pengujian kemurnian DNA dengan spektrofotometer dilakukan untuk mengukur rasio serapan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm yang menunjukkan kemurnian dan (Hughes, S.R dkk. 2019). DNA yang murni umumnya berada pada rentang 1,8-2,0 apabila rasio kemurnian DNA kurang dari 1,8 menandakan kontaminasi protein, dan apabila lebih dari 2,0 menandakan ada kontaminasi RNA (Olson dan Morrow. 2012). Rasio kemurnian untuk isolat DNA bakteri pada sampel ikan tuna, tongkol dan cakalang yaitu 2,04-2,11 dan berhasil amplifikasi pada proses PCR (Abdulla dkk. 2020). Dari hasil uji kualitas DNA pada penelitian yang dilakukan oleh (Pertiwi. 2020) memiliki rentang rasio 1,95-2,17 untuk hasil ekstraksi ikan tanpa pre-pengayaan, 1,53-2,02 untuk hasil ekstraksi dengan pre-pengayaan menggunakan Lactose broth dan Marine broth.

1.2.2 Histidine Dexarboxylase (HDC)

Enzim histidin dekarboksilasi merupakan enzim yang memiliki peran untuk mengatalis dekarboksilasi Histidin menjadi Histamine. Enzim ini di dapat dalam bakteri penghasil Histamine, yang merupakan anggota jalur sintesis Histamin yang dapat menghasilkan Histamin dalam reaksi satu langkah (Akirthasary. D., 2021). Enzim Histidin dekarboksilasi merupakan sumber utama Histamin pada mamalia dan eukariota (Shahid, Mohammad. Dkk.2009) Asam amino histidin terdapat pada

ikan yang merupakan komponen utama dari buffer non karbonat yang akan melindungi ikan dari perubahan pH (Abe H. 2000). Histidin dapat ditemukan dalam daging dan ikan merah. Kandungan histidin dalam ikan sangat beragam tergantung dari spesies ikan. Disebutkan bahwa yang tergabung dalam kelompok spesies otot gelap mempunyai kandungan histidin yang tinggi. Selain itu Histidin merupakan senyawa yang terbentuk sebagai perangsang nafsu makan pada ikan (Rahayu, M. 2014). Ikan yang banyak mengandung histamin adalah golongan scombridae, karena pada jaringan daging merahnya mengandung asam amino histidin. Histidin bebas yang terdapat dari daging ikan memiliki kaitan dengan terbentuknya histamin dalam daging ikan.

Enzim histidin dekarboksilase merupakan enzim yang memiliki peran untuk mengatalis dekarboksilasi Histidin menjadi Histamine. Enzim ini di dapat dalam suatu bakteri penghasil Histamine, yang merupakan anggota jalur sintesis Histamine yang dapat menghasilkan Histamin (Akirthasary. 2021). Bakteri penghasil histamin pada ikan memiliki gen histidin dekarboksilase (HDC), yang bertanggung jawab untuk mengubah histidin menjadi histamin. Enzim ini sangat penting dalam sintesis histamin, suatu amina biogenik yang dapat terakumulasi dalam jaringan ikan melalui dekarboksilasi histidin bebas oleh dekarboksilasi eksogen yang dilepaskan oleh mikroorganisme (Visciano, dkk., 2014). Gen HDC ditemukan pada berbagai bakteri, antara lain *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Raoultella planticola*, dan *Photobacterium phosphoreum*, yang diketahui merupakan bakteri penghasil histamin yang umumnya dikaitkan dengan ikan (Yang, dkk., 2020). Bakteri ini memiliki gen HDC yang memungkinkan mereka memproduksi histamin dari histidin yang terkandung dalam ikan, yang dapat menyebabkan keracunan makanan histamin jika ikan yang terkontaminasi tersebut dikonsumsi (Uehara, dkk, 2021).

Histidine decarboxylase (HDC) adalah enzim yang diproduksi oleh bakteri penghasil histamine yang berperan penting dalam produksi histamin. HDC mengkatalisis dekarboksilasi histidin, mengubahnya menjadi histamin. Histidine decarboxylase (HDC) pada bakteri diatur melalui berbagai mekanisme, termasuk faktor lingkungan dan fase pertumbuhan bakteri (Kanki M, dkk., 2007). Ekspresi gen HDC, yang mengkode HDC, dipengaruhi oleh keberadaan histidin dan histamin. Histidin menginduksi ekspresi gen HDC, sementara histamin menyebabkan

penurunan ekspresi HDC (Landete JM, dkk., 2006). Selain itu, fase pertumbuhan bakteri juga memediasi ekspresi HDC, dengan fase pertumbuhan yang berbeda berpotensi mempengaruhi aktivitas HDC.

HDC menjadi komponen utama dalam memahami mekanisme pembentukan Histamin. Histamin merupakan senyawa biogenik amin mempunyai peran yang penting pada fungsi fisiologis tapi jika jumlahnya melebihi standar dapat mengakibatkan keracunan pada konsumen (Chong dkk. 2011). Persyaratan kandungan histamin ikan tuna pada setiap negara berbeda (Evangelista dkk. 2016). Amerika Serikat mensyaratkan kandungan histamine maksimum 50 ppm (FDA, 2011), Uni Eropa mensyaratkan kandungan histamine maksimum 100 ppm (EC, 2005), sedangkan Codex Alimentarius mensyaratkan kandungan histamin maksimum 200 ppm (FAO, 2012). Sementara, mengacu pada Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang persyaratan mutu dan ikan segar (SNI 2729-2013) bahwa standar histamin dipersyaratkan maksimum 100 ppm (Santoso, dkk, 2020).

1.2.3 Bakteri Penghasil Histamin *Morganella morganii*

Bakteri penghasil histamin merupakan jenis bakteri yang dapat mengubah asam amino histidin menjadi histamin melalui kerja enzim histidin dekarboksilase (HDC). Bakteri penghasil histamin dapat ditemukan di berbagai lingkungan, termasuk usus manusia dan makanan laut. Identifikasi bakteri penghasil histamin penting karena histamin dapat menyebabkan gangguan saluran cerna, sakit perut kronis, dan intoleransi histamin (Perez, S. S., dkk. 2022). Beberapa penelitian telah mengidentifikasi berbagai jenis bakteri penghasil histamin, termasuk bakteri enterik seperti *Klebsiella aerogenes*, *Aeromonas spp.*, dan bakteri non-enterik seperti *Staphylococcus*, *Proteus*, dan *Clostridium perfringens*. Identifikasi *Klebsiella aerogenes* sebagai penghasil histamin utama di usus telah menyebabkan pengembangan terapi yang menargetkan bakteri penghasil histamin (Palma, G. D., dkk. 2022).

Bakteri penghasil histamin yang diisolasi pada daging ikan sebagian besar adalah bakteri gram negatif, seperti *Morganella morganii*, *M. psychrotolerans*, *Raoultella planticola*, *Photobacterium phosphoreum*, dan *P. damsela*, yang menghasilkan histamine dalam berbagai kondisi dan dalam daging ikan melalui aksi dekarboksilase histidin (Bjornsdottir-Butler dkk., 2020; Kanki dkk., 2007; dkk, 2020).

Di antara bakteri ini, *M. morganii* adalah penghasil histamin mesofilik yang sering diisolasi dari ikan. Torido dkk. (2014) mengisolasi 96 bakteri penghasil histamin dari homogenat ikan yang terakumulasi histamine yang diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam dan melaporkan bahwa 24,0% dari strain penghasil histamin yang diisolasi adalah *M.morganii*

Bakteri *Morganella morganii* adalah bakteri yang jumlahnya sangat banyak dan sering ditemukan pada ikan, terutama pada tuna, dan dikenal sebagai agen penghasil histamin yang signifikan. Bakteri ini merupakan bagian dari bakteri gram negatif famili Enterobacteriaceae dan dikenal karena kemampuannya untuk mendekarboksilasi asam amino, yang menghasilkan histamin dan amina biogenik lainnya. Genus *Morganella* mencakup dua spesies telah dilaporkan menyebabkan insiden keracunan histamin pada ikan. *Morganella morganii* dan *Morganella psychrotolerans* keduanya merupakan penghasil histamin yang kuat (Podeur Gaetan, dkk., 2015). Bakteri penghasil histamin (HPB) dapat dibagi lagi menjadi penghasil histamin rendah dan tinggi berdasarkan pembentukan histamin dalam medium kultur kaldu yang mengandung histidin. Penghasil histamin tinggi meliputi spesies mesofilik seperti *M. morganii*, *Enterobacter aerogenes*, *Hafnia alvei*, *Raoultella planticola*, dan *Photobacterium damsela*, yang mampu menghasilkan lebih dari 1000 mg/l histamin dalam kaldu kedelai tripton yang ditambah dengan 2% histidin setelah inkubasi 24-48 jam pada suhu di atas 15°C (Bjornsdottir dkk., 2009).

Pertumbuhan dan produksi histamin oleh *M. morganii* sangat bergantung pada suhu dan waktu, dengan kondisi optimal biasanya berkisar antara 20-37°C. Pada suhu ini, *M. morganii* dapat menghasilkan histamin tingkat tinggi, yang menyebabkan keracunan histamin pada ikan, Teknik penanganan terutama suhu dan waktu penyimpanan sangat mempengaruhi kualitas ikan serta mengakibatkan pembentukan amina biogenik pada produk perikanan (Pertwi R. M., dkk. 2020). Penelitian yang dilakukan Norita dkk. (2019) bahwa penyimpanan ikan tongkol abu-abu pada suhu ruang selama 2 hari membentuk histamin melebihi standar Food and Agriculture Organization (FAO 2012) yaitu 15 mg/kg, sedangkan penyimpanan pada suhu dingin (0±3°C) dan suhu beku (-10±4°C) selama 18 hari berada dibawah standar.

1.2.4 Famili Scombridae



Gambar 2. Ikan-Ikan di pevelangan

Famili scombridae dikenal dengan kelompok ikan tuna dan makarel (Graham and Dickson, 2004) dimana terdapat dua sub familinya yaitu Gasterochismatinae dan Scombrinae. Di dalam sub famili scombrinae terdapat rumpun *Acanthocybium*, *Allothunnus*, *Auxis*, *Cybiosarda*, *Euthynnus*, *Grammatorcynus*, *Gymnosarda*, *Katsuwonus*, *Orcynopsis*, *Rastrelliger*, *Sarda*, *Scomber*, *Scomberomorus*, *Thunnus* (itis.gov) Sementara dalam subfamili Gasterochismatinae terdapat jenis ikan dari genus *Gasterochisma* atau dikenal dengan butterfly kingfish *Gasterochisma malampus*. Ikan-ikan dalam Famili Scombridae tersebar pada perairan tropis beriklim sedang (FAO 2018). Ikan-ikan ini banyak terdapat di perairan Indonesia karena tersebar pada samudra atlantik dan samudra pasifik. Contoh diantaranya ikan dari famili scombridae yang banyak ditemukan di perairan Indonesia dari genus *Auxis* (Tongkol), *Katsuwonus* (Cakalang), *Rastrelliger* (Kembung), *Scomberomorus* (Tenggiri), dan *Thunnus* (Tuna). Dalam genus *Thunnus* terdapat 8 spesies ikan tuna yang mempunyai nilai ekonomis penting yaitu Yellowfin Tuna *Thunnus albacares*, Bigeye tuna *Thunnus obesus*, Albacore *Thunnus alalunga*, Southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii*, Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus*, Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*, Blackfin tuna *Thunnus atlanticus*, Longtail tuna *Thunnus tonggol* (Santoso dkk., 2020).

Famili Scombridae, menunjukkan keanekaragaman spesies yang luar biasa di berbagai wilayah. Wilayah Indo-Pasifik menonjol sebagai hotspot bagi keanekaragaman Scombridae, dengan perairan hangat yang mendukung berbagai spesies seperti tuna makarel, bonito. Perairan tropis dan subtropis di seluruh dunia, termasuk Samudra Atlantik, Pasifik, dan Hindia, juga menampung beragam spesies famili makarel (Ollé, J. dkk., 2021). Asia Tenggara, khususnya Indonesia, Malaysia, dan Filipina, terkenal akan keanekaragaman hayati lautnya yang kaya, dengan banyak spesies Scombridae yang tumbuh subur di perairannya (Nepomuceno, L., dkk., 2020). Samudra Hindia merupakan wilayah penting lainnya, yang menjadi tuan rumah bagi spesies seperti tuna sirip biru dan tuna cakalang. Samudra Pasifik bagian barat, meliputi Jepang, Taiwan, dan Cina, juga memiliki beragam spesies Scombridae. Samudra Atlantik bagian timur, yang membentang dari Eropa hingga Afrika, merupakan rumah bagi spesies seperti bonito Atlantik dan tuna sirip biru. Secara kolektif, wilayah-wilayah ini menyediakan lingkungan yang mendukung pertumbuhan dan kelangsungan hidup banyak spesies Scombridae (Rampazzo dkk., 2020)

Ikan famili Scombridae terdiri dari beragam kelompok spesies ikan yang sangat penting baik secara komersial maupun ekologis. Ikan ini dikenal karena tubuhnya yang ramping, yang memungkinkan mereka menjadi perenang yang cepat dan efisien. Tuna, mackerel, dan bonitos adalah beberapa anggota famili yang paling umum dikonsumsi (Karuppiah K, dkk., 2022). Seluruh ikan scombridae memiliki finlet di belakang sirip dorsal dan sirip anal. Ikan tuna mempunyai dua buah sirip punggung (dorsal) terpisah dan sirip kaudal berbentuk bulan sabit. Daging ikan tuna mempunyai warna merah yang berbeda dengan daging jenis ikan lainnya yang umumnya berwarna putih. Warna daging merah ini disebabkan karena ikan tuna banyak mengandung mioglobin. Tuna, khususnya, sangat disukai karena daya tarik kulinernya dan terkenal karena perilaku migrasi dan ukurannya yang besar. Keluarga Scombridae memainkan peran penting dalam ekosistem laut dan merupakan target utama untuk perikanan komersial karena signifikansi ekonominya. Kandungan protein pada ikan tuna merupakan bagian terbesar gizi yang ada pada tuna. Protein ini terdiri dari asam amino, diantaranya adalah asam amino histidin yang mempunyai komposisi paling besar jika dibandingkan dengan jenis ikan lainnya seperti mahi-mahi dan kakap (Antoine dkk., 2001).

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan uraian diatas, maka penelitian ini bertujuan untuk:

- a. Menganalisis hasil kultur bakteri penghasil histamin dari ikan famili scombridae
- b. Menganalisis hasil deteksi gen histidin dekarboksilase (HDC) dari bakteri penghasil histamin *Morganella morganii* pada famill ikan scombridae.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai gen histidin decarboxylase (HDC) dari bakteri-bakteri penghasil histamin pada ikan famili scombridae. Dari hal tersebut diharapkan penelitian selanjutnya dapat merencanakan strategi yang lebih efektif untuk mencegah atau mengendalikan produksi histamin dalam ikan yang dapat menyebabkan keracunan jika dikonsumsi dalam jumlah yang cukup besar.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Hasanuddin University Medical Research Center (HUM-RC) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, dimulai dari bulan Maret 2024- Juni 2024.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya sarung tangan. Inkubator, autoklaf, pipet tetes, plastik sampel steril, tabung reaksi, aluminium foil, *tissue*, kapas, Pisau dan pinset digunakan untuk menangani sampel. Timbangan. container *cool box*, Lampu bunsen, ose bulat, sentrifuse, LAF (Laminar Air Flow), vortex, mikropipet (1000µl, 100µl, 20µl, 200µl), inkubator, tabung eppendorf bersekrup steril 1,5 ml, tabung eppendorf steril 0,5 ml, tip aerosol steril 20µl, tip steril 250µl, tip steril 1000µl, freezer, kulkas, rak tabung eppendorf, tabung valcon 50 ml, tabung vial PCR, therma cycler PCR, transilluminator UV, gel doc, tangki larutan penyangga elektroda, microwave, timbangan digital, Erlenmeyer 250 ml, sisir gel, cetakan gel, tabung ukur 100 ml, sendok tanduk, rak sumur, dan mikrosentrifus .

2.2.2 Bahan

Bahan baku penelitian adalah sampel ikan tuna, ikan tongkol, ikan cakalang, ikan kembung, dan ikan tenggiri, bahan-bahan untuk analisis yang digunakan diantaranya L-Histidine, Luria Broth, gel agarosa, marker PCR, aquades, kristal violet, iodine, etanol, alkohol absolute, safranin, GST Buffer, GSB Buffer, W1 Buffer, Wash Buffer, TBE, Elution Buffer, Proteinase K, My Taq™ HS Red Mix, Nuclease free water (NFW), Ethidium Bromide (EtBr).

2.3 Metode Penelitian

2.3.1 Persiapan Penelitian

2.3.1.1 Kriteria Sampel

Penelitian ini dilakukan dengan 5 sampel ikan dari famili scombridae. Sampel ikan diambil dari pelelangan ikan di kota Makassar. Karakteristik ikan dari famili scombridae adalah memiliki 2-3 lunas pada pangkal ekor, memiliki finlet di belakang sirip punggung dan sirip dubur, dan memiliki sirip ekor yang sangat bercagak (Carpenter K., dkk. 2001). Sampel ikan scombridae yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Ikan Tuna Mata besar *Thunnus obesus*, Ikan Tongkol lisong *Auxis rochei*, Ikan Cakalang *Katsuwonus pelamis*, Ikan Kembung lelaki *Rastrelliger kanagurta*, dan Ikan Tenggiri banci *Acanthocybium solandri*. Ikan dari famili scombridae yang digunakan mewakili 5 genus yang berbeda. Tuna Mata besar *Thunnus obesus* merupakan kelompok genus *Thunnus*, Tongkol lisong *Auxis rochei* dari genus *Auxis*, Cakalang *Katsuwonus pelamis* dari genus *Katsuwonus*, Kembung lelaki *Rastrelliger kanagurta* dari genus *Rastrelliger*, dan Ikan Tenggiri banci *Acanthocybium solandri* dari genus *Acanthocybium*. Ikan-ikan tersebut merupakan jenis ikan kaya histidin yang umum dikonsumsi di Kota Makassar. Sebelum dibawa ke lab sampel disimpan di dalam freezer dalam kondisi beku. Sampel-sampel tersebut diantaranya diberikan kode penanda: Ikan Tuna *Thunnus obesus* (TA), Ikan Tongkol *Auxis rochei* (TO), Ikan Cakalang *Katsuwonus pelamis* (CA), Ikan Kembung *Rastrelliger kanagurta* (KE), dan Ikan Tenggiri *Acanthocybium solandri* (TE),

2.3.1.2 Rancangan Primer

Selain mempersiapkan sampel, dilakukan juga perancangan primer gen Histidine Decarboxylase (HDC) dari Bakteri *Morganella morganii*. Primer dirancang dari primer universal Gen HDC Pasangan primer HDC-F (5'-TCH ATY ARY AAC TGY GGT GAC TGG RG-3') dan HDC-R (5'-CCC ACA KCA TBA RWG GDG TRT GRC C-3'), dengan ukuran gen target 709-bp, berdasarkan penelitian (Takahashi. 2003) dan (Ibrahim. 2017). Primer universal tersebut dirancang ulang menjadi primer spesifik untuk gen HDC bakteri *Morganella morganii*. Perubahan dilakukan dengan mengganti kode-kode IUPAC dari primer universal gen HDC dan menyesuaikan urutan dengan urutan gen HDC pada bakteri *Morganella morganii*.

Penyesuaian urutan gen dilakukan menggunakan blast dari NCBI. Sehingga didapatkan urutan primer gen HDC untuk bakteri *Morganella morganii* F(5' TCC ATC AGC AAC TGC GGTGAC TGG GG-3') dan R (5'- CCC ACA TCA TCA ATG GAG TGT GGC-3').

2.3.2 Pelaksanaan penelitian

2.3.2.1 Pengambilan Sampel

Sampel ikan yang telah diambil dari pelelangan disimpan dengan baik sebelum kemudian akan dibersihkan. Sampel ikan disimpan dengan benar untuk mencegah kontaminasi dan degradasi sampel. Sampel dimasukkan ke dalam freezer. Ikan dikemas dan dibekukan, kemudian dibawa ke laboratorium. Selama pengangkutan ke laboratorium. Sampel disimpan di dalam tabung ependorf dan dimasukkan ke dalam *coolbox*.

2.3.2.2 Penghancuran sampel ikan

Prosedur melumatkan daging ikan mengacu pada Pertiwi, Rizsa, dkk., (2020). Terlebih dahulu membersihkan ikan dengan mengeluarkan jeroan ikan dan memisahkan bagian kulit, tulang, dan daging. Sampel yang diambil yaitu bagian daging saja. Selanjutnya ikan disimpan dalam kemasan plastik klip untuk dibekukan. Sampel ikan beku yang akan diekstraksi kemudian dikeluarkan dari freezer didiamkan selama 1 menit sampai es mencair kemudian digiling menggunakan chopper. Penggilingan sampel ikan beku ditambahkan aquades untuk mempermudah penghancuran daging ikan. Sampel ikan yang telah dihancurkan kemudian disimpan di wadah botol dan dibawa ke lab untuk dilakukan penelitian lebih lanjut.

2.3.2.3 Kultur bakteri pembentuk histamin

a. Pembuatan media kultur bakteri

Media kultur bakteri yang digunakan yaitu Luria broth + L-Histidine. Luria broth memiliki komposisi yang terdiri atas tripton, ekstrak ragi, dan natrium klorida. Pembuatan media kultur bakteri ditambahkan luria broth sebanyak 5g ditambah dengan L-Histidine sebanyak 2g, dan aquades sebanyak 100ml. Sampel ikan yang telah diekstraksi kemudian ditumbuhkan pada media Luria broth + L-Histidine.

Sebanyak 5g Sampel diambil kemudian dipindahkan ke wadah tabung dan ditambahkan media luria broth + L-Histidine. Sampel ikan pada media Luria broth+L-Histidine kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam.

b. Pewarnaan gram hasil kultur bakteri

Metode pewarnaan gram yang dilakukan mengikuti tahapan metode pewarnaan gram yang dilakukan oleh Kong Yang WU. 2020 dengan tahapan Hasil kultur diambil menggunakan ose dan dioleskan ke kaca preparat, Hasil kultur kemudian difiksasi dengan memanaskan kaca preparat pada api hingga cairan menguap, setelah difiksasi hasil kultur ditambahkan beberapa tetes larutan Kristal violet dan didiamkan selama 1 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir, selanjutnya ditambahkan beberapa tetes larutan iodine, dan didiamkan selama 1 menit, hasil kultur dibilas kembali dengan air mengalir, kemudian ditambahkan beberapa tetes etanol, dan didiamkan selama 30 detik, dibilas dengan air mengalir, kemudian ditambahkan beberapa tetes larutan safranin, dan didiamkan selama 30 detik, terakhir dibilas dengan air mengalir.

2.3.2.4 Ekstraksi dan isolasi DNA dari kultur bakteri penghasil histamin

Ekstraksi DNA dilakukan dengan mengikuti protokol ekstraksi DNA yang terdapat dalam kit Geneaid *The Gsync™ DNA Extraction* untuk sampel Culture cell. Ekstraksi DNA dari hasil kultur bakteri dilakukan dengan mengambil sebanyak 25 mikron sampel hasil kultur bakteri dari tube dimasukkan ke dalam 200 MI GST buffer dan diinkubasi selama 1x24 jam Pada suhu 60 °C. .

Pertama dilakukan preparasi sampel kultur sel. Kultur sel dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml, kemudian disentrifuge selama 5 menit pada 300 x g. Supernatan dibuang kemudian resuspensi sel dalam 200 µl PBS dengan pipet. ditambahkan 20 µl Proteinase K lalu campur dengan memipet. Inkubasi pada suhu 60°C selama 5 menit. Kemudian dilakukan tahap Lisis sel. Ditambahkan 200 µl GSB Buffer lalu campur dengan divortex, kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 5 menit, tabung dibalikkan setiap 2 menit. Tabung dibalik setiap 5 menit. Selama inkubasi, pindahkan volume Elution Buffer (200µl/sampel) yang diperlukan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml dan panaskan hingga 60°C (untuk Langkah 5 Elusi DNA).

Selanjutnya tahap pengikatan DNA, ditambahkan 200 μ l etanol absolut ke dalam sampel lisat dan campur segera dengan mengocok kuat-kuat selama 10 detik. Kemudian ditempatkan Kolom GS dalam 2 ml Tabung Koleksi. Dipindahkan seluruh campuran ke Kolom GS. Dientrifugasi pada 13.000 x g selama 1 menit. Setelah sentrifugasi sampai tidak ada cairan tersisa pada membran Kolom GS,. Buang Collection Tube 2 ml yang berisi *flow-through* lalu pindahkan GS Column ke Collection Tube 2 ml yang baru. Lisat dan etanol harus tercampur rata untuk menghasilkan larutan yang homogen.

Tahap pencucian, ditambahkan 400 μ l Buffer W1 ke GS Colom kemudian disentrifuge pada 13.000 rpm selama 30 detik. Kemudian ditempatkan GS Colomn ke dalam collection tube 2ml. ditambahkan 600 μ l Wash Buffer ke dalam GS Colomn kemudian disentrifuge pada 13.000 rpm selama 30 detik lalu dibuang airnya, kemudian ditempatkan kembali GS Colomn kedalam collection tube 2ml dan disentrifugasi kembali Selama 3 menit pada 13.000 rpm untuk mengeringkan matriks kolom. Dilanjutkan dengan tahap Elusi, Hasil sentrifugasi kering. pada GS column dipindahkan ke tabung sentrifugasi 1,5 ml baru lalu ditambahkan 100 μ l elution buffer yang telah dipanaskan dalam inkubator. Didiamkan selama 3 menit kemudian disentrifugasi kembali pada 13.000 rpm selama 30 detik.

2.3.2.5 Amplifikasi DNA dengan Polymerase Chain Reaction (PCR)

Pelaksanaan PCR dilakukan dengan terlebih dahulu merancang Master Mix PCR yang terdiri dari My Taq™ HS Red Mix sebanyak 212,5 μ L, Nuclease free water (NFW) sebanyak 110,5 μ L, Primer Forward 8,5 μ L, Reverse 8,5 μ L dan DNA sebanyak 5 μ L. Deteksi gen HDC menggunakan primer yang telah dirancang (5' TCC ATC AGC AAC TGC GGTGAC TGG GG-3') dan 1492 R (5'- CCC ACA TCA TCA ATG GAG TGT GGC-3'). Sebanyak 25 μ l merupakan campuran dari setiap campuran reaksi. Amplifikasi PCR dijalankan selama 40 siklus dimulai dengan denaturasi awal pada suhu 94°C selama 1 menit, dilanjutkan dengan denaturasi suhu 94°C selama 1 menit, Annealing 54°C selama 1 menit, Ekstensi 72°C selama 1 menit, dengan ekstensi akhir pada 72°C selama 1 menit (Ibrahim,dkk . 2017).

2.3.2.6 Elektroforesis Gel Agarosa

Gel agarosa dibuat dengan mencampurkan 2 g serbuk agarosa ke dalam 100 mL TBE Buffer di Erlenmeyer kemudian dipanaskan ke dalam microwave selama 3 menit hingga homogen, lalu ditambahkan 5 μ L Ethidium Bromida. Cairan gel lalu didinginkan di suhu kamar. Setelah agak dingin, cairan gel dituang ke cetakan gel elektroforesis dengan menggunakan sisir gel dengan jumlah sisir 20 sumur. Masing-masing 5 μ l hasil amplifikasi, marker, dan kontrol negatif dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa yang terendam dalam tangki. Elektroforesis dilakukan selama 90 menit pada tegangan 100 volt.