

DETEKSI BAKTERI PEMBENTUK AMINA BIOGENIK PADA IKAN *SCOMBRIDAE* SECARA *MULTIPLEX* PCR

Rizsa Mustika Pertiwi^{*1}, Mala Nurilmala¹, Asadatun Abdullah¹, Nurjanah¹, Roza Yusfiandayani², M. Fedi A. Sondita²

¹Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB University

²Departemen Pemanfaatan Sumberdaya Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB University
Kampus IPB Darmaga, Jalan Agatis, Bogor 16680 Jawa Barat
Telepon (0251) 8622909-8622906, Faks. (0251) 8622915

*Korespondensi: rizsa_mustikap@apps.ipb.ac.id

Diterima: 22 Juli 2020/ Disetujui: 29 Agustus 2020

Cara sitasi: Pertiwi RM, Nurilmala M, Abdullah A, Nurjanah, Yusfiandayani R, Sondita MFA. 2020. Deteksi bakteri pembentuk amina biogenik pada ikan *Scombridae* secara *multiplex* PCR. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 23(2): 359-371.

Abstrak

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. Gen pengkode dekarboksilasi asam amino tersebut yaitu *histidine decarboxylase (hdc)*, *tyrosine decarboxylase (tdc)* serta *lysine decarboxylase (ldc)*. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat DNA bakteri dengan konsentrasi dan kemurnian yang baik, menyeleksi media pertumbuhan bakteri, menyeleksi media pertumbuhan bakteri yang dapat mengekspresikan gen pembentuk amina biogenik menggunakan teknik *multiplex* PCR serta mengidentifikasi bakteri pembentuk amina biogenik. Sampel yang digunakan yaitu ikan tuna beku, tongkol beku, cakalang beku, tuna loin, pindang potong dan pindang bumbu kuning serta kontrol positif menggunakan ikan tuna yang disimpan pada suhu ruang selama 3 hari. Penelitian terdiri dari tahap pra-pengayaan bakteri pada media *marine broth* dan *lactose broth*, isolasi DNA sampel tanpa dan hasil pra-pengayaan, uji kemurnian dan konsentrasi isolate, amplifikasi gen target *hdc*, *tdc*, *ldc* menggunakan *multiplex* PCR serta sekuensing dan analisis bakteri pembentuk amina biogenik. Hasil yang diperoleh yaitu kualitas isolat DNA bakteri pada umumnya sudah murni (rasio A260/280: 1.49-2.17) dengan konsentrasi isolat 15,75-461,75 ng/ μ L. Teknik *multiplex* PCR berhasil mengekspresikan gen *hdc*, *tdc* dan *ldc* pada ikan *scombridae* pada media pra-pengayaan *marine broth*. Kondisi optimum amplifikasi PCR yaitu *annealing* pada suhu 50°C selama 90 detik. Bakteri pembentuk amina biogenik teridentifikasi yaitu pembentuk histamin *M. morgani*, *E. aerogenes* dan *A. baumannii*, pembentuk cadaverin yaitu *Citrobacter* sp., *Hafnia paralvei*, *Obesumbacterium proteus*, *Enterobacter cloacae* dan *Enterobacter hormaechei*, pembentuk tiramin yaitu *Enterococcus faecalis*.

Kata kunci: *hdc*, *ldc*, *scombridae*, *tdc*.

Detection of Biogenic Amine Producing Bacteria in Scombridae Fish based on Multiplex PCR assay

Abstract

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. The amino acid decarboxylation coding genes are histidine decarboxylase (*hdc*), tyrosine decarboxylase (*tdc*) and lysine decarboxylase (*ldc*). The purpose of this study was to isolate DNA, select pre-enrichment media that can express biogenic amine forming genes using *multiplex* PCR, as well as identify biogenic amine forming bacteria. The specimens used were frozen tuna, little tuna, skipjack, and loin tuna. In addition, Indonesian traditional tuna such as *pindang potong*, *pindang bumbu kuning* were observed. Tuna stored at room temperature for 3 days was used as positive control. 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. The result obtained were generally in a good quality of bacterial DNA isolates, with concentration ranged between 15.75-157.84 ng/ μ L. The *multiplex* PCR was successful in expressing *hdc*, *tdc* and *ldc* genes in *scombridae* fish on *marine*

broth pre-enrichment media. The optimum condition for PCR amplification was annealing at 50°C for 90 seconds. Biogenic amine bacteria were identified, namely histamine forming bacteria were *Morganella morganii*, *Enterobacter aerogenes* and *Acinetobacter baumannii*, cadaverin forming bacteria were *Citrobacter* sp., *Hafnia paralvei*, *Obesumbacterium proteus*, *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter hormachei*, tyramine forming bacteria is *Enterococcus faecalis*.

Keywords: *hdc*, *ldc*, *scombridae*, *tdc*.

PENDAHULUAN

Amina biogenik merupakan komponen basa nitrogen yang terbentuk oleh pemecahan asam amino. Asam amino prekursor terbentuknya biogenik amin yaitu histidina, ornitina, putresina, lisina, tirosina dan arginina yang dapat membentuk amina biogenik histamin, putresin, kadaverin, tiramin, spermin dan spermidin. Amina biogenik banyak ditemukan pada produk perikanan di antaranya pada ikan *scombridae* sering disebut juga dengan *scombrotxin*. Pembentukan amina biogenik terjadi karena dekarboksilasi asam amino oleh bakteri. Bakteri-bakteri yang mampu mendekarboksilasi asam amino antara lain: *Enterobacter*, *Clostridium*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas* dan *Vibrio* spp. (Mahamudin *et al.* 2016), *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., dan *Morganella morganii* (Arulkumar *et al.* 2018).

Teknik penanganan terutama suhu dan waktu penyimpanan sangat memengaruhi kualitas ikan serta mengakibatkan pembentukan amina biogenik pada produk perikanan. Nurjanah *et al.* (2020) melaporkan bahwa asam amino tertinggi yang terdapat pada ikan tuna sirip kuning yaitu leusina dan lisina, asam amino tersebut mengalami perubahan selama penyimpanan suhu dingin. Fatuni *et al.* (2014) melaporkan bahwa histamin pada pindang ikan tongkol selama penyimpanan 32 jam meningkat dari 0,26 mg/100g menjadi 7,54 mg/100 g dan terdeteksi 6 jenis bakteri pembentuk histamin tersebut. Norita *et al.* (2019) melaporkan bahwa penyimpanan ikan tongkol abu-abu pada suhu ruang selama 2 hari membentuk histamin melebihi standar 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 FAO. Nurilmala *et al.* (2019) melaporkan bahwa ikan tongkol pada penyimpanan dingin

(8±3°C) selama 7 hari, menurunkan tingkat penerimaan organoleptik, nilai *total volatile base* (TVB) dan meningkatkan *total plate count* (TPC) dengan kadar histamin yang terukur 1,96 ppm.

Polymerase chain reaction (PCR) salah satu metode untuk mendeteksi amina biogenik secara cepat dan akurat walaupun dalam konsentrasi yang rendah, dapat dilakukan dengan target spesifik gen penyandi atau bakteri pembentuknya. Deteksi amina biogenik melalui gen penyandi yaitu deteksi enzim yang dihasilkan oleh bakteri pendekarboksilasi asam amino. Gen yang dapat menyandikan adanya amina biogenik di antaranya *histidine decarboxylase* (*hdc*) sebagai penyandi pembentukan histamin, *tyrosine decarboxylase* (*tdc*) sebagai penyandi pembentukan tiramin, *lysine decarboxylase* (*ldc*) sebagai penyandi kadaverin dan *ornithine decarboxylase* (*odc*) sebagai penyandi putresin. Nurilmala *et al.* (2019) melaporkan bahwa gen *hdc* terekspresi pada ikan tongkol abu-abu dan bakteri yang teridentifikasi yaitu *Enterobacter* sp.. Deteksi gen pembentuk amina biogenik pada ikan *scombridae* telah dilakukan secara *singleplex* PCR di antaranya Saputri (2019) pada gen *hdc*, Abdullah *et al.* (2020) berhasil mengaplikasikan teknik *end-point* PCR untuk mendeteksi gen *tdc*, serta Nadya (2019) pada gen *ldc* dan *odc*, namun *odc* tidak terdeteksi pada ikan *scombridae* tersebut. Deteksi *multiplex* PCR diharapkan dapat dilakukan untuk mendeteksi ketiga gen target.

Multiplex PCR dapat mendeteksi multi target dalam 1 reaksi yang dapat menghemat waktu kerja di laboratorium. De las Rivas *et al.* (2005) melaporkan gen *hdc*, *tdc* dan *odc* terekspresi menggunakan *multiplex* PCR dengan bakteri yang terdeteksi yaitu *K. planticola*, *Proteus vulgaris*, *P. phosphoreum* *M. morganii* serta *Staphylococcus* sp. *Escherichia coli* dan *Serratia liquefaciens*. Deteksi gen *hdc*, *tdc* dan *ldc* pada ikan *scombridae* dari perairan

Indonesia perlu dilakukan secara *multiplex* untuk deteksi cepat secara molekuler. Tujuan penelitian ini yaitu mendapatkan isolat DNA bakteri dengan konsentrasi dan kemurnian baik, menyeleksi media pertumbuhan bakteri yang dapat mengekspresikan gen pembentuk amina biogenik menggunakan teknik *multiplex* PCR serta identifikasi bakteri pembentuk amina biogenik.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan yaitu ikan tuna beku, tongkol beku, cakalang beku yang ditangkap dari Perairan Binuangeun Banten pada bulan Juli 2018, tuna loin diperoleh dari pasar swalayan di Bogor, pindang bumbu kuning dan pindang potong diperoleh dari warung sayur yang berada di sekitar kampus IPB Dramaga. Kontrol positif menggunakan ikan tuna yang disimpan pada suhu ruang selama 3 hari serta kontrol negatif ddH₂O, media *lactose broth* dan *marine broth*. Bahan kimia untuk analisis yaitu media *marine broth* (MB), *lactose broth* (LB) (Difco™, Becton, Dickinson and Company AS), kit isolasi DNA yang terdiri dari proteinase K, *buffer* GA, GB, GD, PW dan TE (TIANamp Genomic DNA Kit, TianGen Biotech, Beijing), ddH₂O, *TBE Buffer* (AccuGENET™ 10X TBE Buffer, Lonza, Rockland, ME AS), *marker* (VC 100 bp plus DNA ladder (VIVANTIS, Selangor Darul Ehsan, Malaysia), agaros (SeaKem® LE Agarose, Lonza, Rockland, ME AS), *cybergreen*, *kapa Taq PCR* (Qiagen).

Alat yang digunakan yaitu *coolbox*, *freezer* (GEA), mikro *sentrifuge* (Corning, AS), *vortex* (Biosan, Latvia), *spindown* (Corning, New York, AS), *UV Transilluminator* (Uvitec, Cambridge, Inggris), *microwave* (Sharp, Osaka, Jepang), spektrofotometer UV-Vis, PCR konvensional (Analytic Jena, AS), elektroforesis (HU6, SCIE-PLAS, Cambridge, Inggris).

Metode Penelitian

Penelitian yang dilakukan terdiri dari preparasi sampel, pra-pengayaan bakteri, isolasi DNA, uji kualitas dan kuantitas isolat kemudian amplifikasi menggunakan *multiplex* PCR. Sampel beku dilelehkan pada

suhu ruang kemudian dipisahkan bagian daging dari tulang, kulit dan jeroannya, daging ikan yang diperoleh dilumatkan menggunakan blender. Daging lumat yang digunakan masing-masing dari 1 ekor ikan beku utuh dan pindang bumbu kuning sedangkan pindang potong menggunakan 3 potong. Kontrol positif menggunakan ikan tuna yang disimpan pada suhu ruang selama 3 hari. Lumatan daging ikan disiapkan untuk isolasi (tanpa pra-pengayaan) ataupun pra-pengayaan pada media pertumbuhan bakteri yaitu *lactose broth* dan *marine broth*. Daging halus sebanyak 2 gram dalam 50 mL media *lactose broth* ataupun *marine broth*, diinkubasi selama 16 jam pada suhu 37°C kemudian disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 3 menit. Endapan yang dihasilkan merupakan biomassa yang akan digunakan selanjutnya dalam tahap isolasi DNA.

Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan 1 kali ulangan pada daging ikan tanpa pra-pengayaan dilakukan sebanyak 25 mg, sedangkan pada biomassa bakteri hasil pra-pengayaan sebanyak endapan yang terdapat pada *tube* 2 mL hasil sentrifugasi. Isolasi DNA dilakukan sesuai dengan prosedur TIANamp Genomic DNA Kit. Sampel dicampur dengan 200 µL *buffer* GA dalam *tube* 2 mL, ditambahkan proteinase K 20 µL *divortex*, ditambahkan *buffer* GB 220 µL *vortex* 15 detik. Campuran sampel diinkubasi pada 70°C selama 10 menit, *spindown* untuk memisahkan kotoran atau sisa sampel sedangkan filtrat dipindahkan dalam *tube* baru. Filtrat ditambahkan etanol sebanyak 220 µL, *vortex* kemudian dipindahkan ke dalam *spin column* dan sentrifugasi pada 13.400 g (±12.000 rpm) selama 30 detik, cairan yang terpisah dari kolom dibuang. *Buffer* GD sebanyak 500 µL ditambahkan ke dalam *spin column* kemudian sentrifugasi kembali pada 13.400 g (±12.000 rpm) selama 30 detik. Penambahan *buffer* PW ke dalam *spin column* sebanyak 600 µL, sentrifugasi kembali pada 13.400 g (±12.000 rpm) selama 30 detik, proses penambahan *buffer* PW dilakukan sebanyak 2 kali. *Spin column* disentrifugasi kembali pada 13.400 g (±12.000 rpm) selama 2 menit, kemudian

tampungannya diganti dengan *tube* baru. *Buffer TE* ditambahkan sebanyak 200 µL, inkubasi selama 5 menit, kemudian sentrifugasi 13.400 g (±12.000 rpm) selama 2 menit. Filtrat yang terkumpul pada *tube* merupakan isolat DNA.

Elektroforesis, pengukuran konsentrasi dan kemurnian isolat

Elektroforesis ditujukan untuk menentukan keberhasilan isolasi DNA secara visual dilakukan mengacu pada Nurilmala *et al.* (2020). Elektroforesis yang digunakan yaitu elektroforesis horizontal dengan gel agaros 1,2% (0,6 g agaros dalam 50 mL *buffer TBE*), pembuatan agaros dididihkan pada suhu 130°C selama 20 menit kemudian didiamkan pada suhu ruang hingga suhu 50-60°C baru dituangkan dalam cetakan. Sisir dipasang saat penuangan agar sebagai sumur yang akan digunakan untuk sampel. Gel ditunggu hingga mengeras kurang lebih 20 menit, kemudian direndam dengan *buffer TBE*.

Isolat DNA sebanyak 3 µL dicampurkan dengan 3 µL *cybergreen* dan 3 µL *loading dye*, kemudian dimasukkan ke dalam sumur. Elektroforesis dijalankan pada 100 Volt dan 60 mA selama 30 menit. Hasil elektroforesis diamati pada sinar UV, keberhasilan isolasi akan terbentuk pita yang berpendar. *Marker* ditambahkan pada saat elektroforesis dengan penambahan *cybergreen* dan *loading dye* masing-masing 3 µL, keberadaan *marker* berfungsi sebagai indikator.

Pengukuran kuantitas isolat DNA yaitu kemurnian dan konsentrasinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis nanodrop pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (Fatchiyah *et al.* 2011). Kemurnian diukur

berdasarkan perbandingan nilai absorbansi 260 nm terhadap 280 nm. Konsentrasi DNA diukur menggunakan rumus perkalian tanara nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm terhadap 50 dan faktor pengencer, 50 merupakan nilai koreksi larutan dengan nilai absorbansi 1.0 sebanding dengan 50 µg untai ganda DNA per mil, sedangkan faktor pengencer pada penelitian ini 1 karena tidak ada pengenceran.

Amplifikasi DNA pada *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Amplifikasi DNA bakteri pembentuk amina biogenik menggunakan PCR konvensional metode *multiplex* dengan spesifik primer gen *hdc*, *tdc* dan *ldc* (Table 1). Bahan dalam reaksi PCR terdiri dari ddH₂O (4,5 µL), DNA *multiplex PCR kit* (12,5 µL), *primer forward hdc* (1 µL), *primer reverse hdc* (1 µL), *primer forward tdc* (1 µL), *primer reverse tdc* (1 µL), *primer forward ldc* (1 µL), *primer reverse ldc* (1 µL) dan isolat DNA (2 µL).

Proses PCR dijalankan sesuai protokol *Quick-Star Protocol* (Qiagen Multiplex PCR kit) dengan modifikasi. Suhu *annealing* optimum primer *hdc* yaitu 54°C, *tdc* 53°C dan *ldc* 45°C, namun setelah melalui percobaan pendahuluan diperoleh suhu 50°C yang mampu mengekspresikan ketiga gen target tersebut. *Initial heat activation* dijalankan pada suhu 95°C selama 15 menit, denaturasi 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 15 menit. Siklus amplifikasi sebanyak 35 kali dari tahap denaturasi hingga *extention*. Produk PCR yang

Table 1 Specific primer PCR

Gene	Primer	Sequence	Size product (bp)	Source
<i>hdc</i>	HDC2-F	TGGGGTTATGTSACCAATGG	571	Wongsariya <i>et al.</i> (2015)
	HDC2-R	GTRTGGCCGTTACGYGARCC		
<i>ldc</i>	CAD1-F	TTYGAYWCNGCNTGGGTNCCNTAYAC	1,098	de las Rivas <i>et al.</i> (2006)
	CAD1-R	CCRTGDATRTCNGTYTCRAANCCNGG		
<i>tdc</i>	TDC-F	TGGYTNGTNCNCARACNAARCAYTA	825	
	TDC-R	ACRTARTCNACCATRTTRAARTCNGG		

diperoleh kemudian divisualisasikan kembali menggunakan elektroforesis pada konsentrasi agaros 1,2%. Sampel yang dilakukan sekuensing dilakukan juga pemurnian dan elektroforesis pada 0,8%.

Analisis bioinformatika

Pita DNA kontrol positif tanpa dan dengan pra-pengayaan serta isolat hasil pra-pengayaan terpilih yang mampu mengekspresikan ketiga gen target di sekuensing untuk menerjemahkan urutan DNA menjadi untaian basa nukleotida. Sekuensing menggunakan prinsip (Sanger dan Culson 1975) di PT Genetika Science dan hasil yang diperoleh berupa kromatogram untaian basa nukleotida. Sekuen yang diperoleh kemudian dianalisis bioinformatika menggunakan perangkat lunak MEGA X (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) dan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) untuk menentukan spesies bakteri

pembentuk amina biogenik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas dan Kuantitas Isolat DNA

Isolasi merupakan tahap awal dalam identifikasi berbasis DNA Dengan prinsip perusakan dinding sel (lisis), pemisahan DNA dari bahan padat seperti 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 terpisah molekul-molekul berdasarkan ukurannya (Agrawal 2008). Visualisasi DNA menggunakan marker sebagai standar atau tolak ukur pita sampel yang kita gunakan. Elektroforegram isolat DNA tanpa pra-pengayaan dan hasil pra-pengayaan media *lactose broth* dan *marine broth* disajikan pada *Figure 1*.

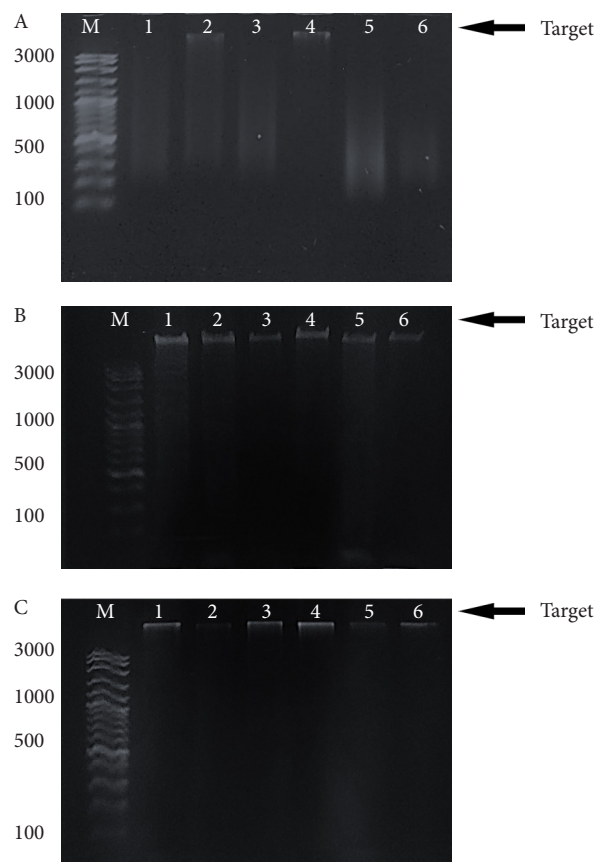


Figure 1 Electroforegram isolate DNA non pre-enrichment (A), with enrichment lactose broth medium (B), marine broth medium (C). M: marker, 1: frozen tuna, 2: little tuna frozen, 3: frozen skipjack, 4: loin tuna, 5: *pindang potong*, 6: *pindang bumbu kuning*.

Table 2 Ratio A260/A280 of bacterial DNA

Sample	Non pre-enrichment	Medium pre-enrichment	
		Lactose broth	Marine broth
Frozen tuna	2.17	1.65	1.49
Frozen little tuna	2.06	1.97	1.53
Frozen skipjack	2.09	2.02	1.90
Loin tuna	2.11	1.89	1.93
<i>Pindang potong</i>	2.10	1.70	1.69
<i>Pindang bumbu kuning</i>	1.95	1.92	1.59
Positive control	2.12	2.12	1.51

DNA bakteri dapat diisolasi pada sampel daging ikan ataupun dengan pra-pengayaan bakteri terlebih dulu. Isolat DNA menunjukkan pita pada area bobot molekul diatas 3000 bp, namun pita pada sampel tanpa pra-pengayaan yaitu tuna beku, cakalang beku dan pindang bumbu kuning terlihat sangat tipis, sedangkan pada pindang potong pita di aera bawah terlihat lebih jelas hal ini dapat terjadi karena adanya pengotor. Pita-pita DNA hasil pra-pengayaan menunjukkan pita yang bersih tanpa ada pengotor atau *smear*. Hasil pra-pengayaan media *lactose broth* pitanya cenderung lebih seragam dan tebal. Pita DNA hasil pra-pengayaan media *marine broth* pada sampel tongkol beku dan pindang potong terlihat lebih tipis dibandingkan dengan pita sampel lainnya. Hasil pra-pengayaan media *marine broth* secara visual pita terlihat jelas, tanpa pengotor atau *smear* memiliki konsentrasi dan kemurnian yang baik.

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 dapat dilihat pada *Table 2*.

Rasio A260 dan A280 menunjukkan kemurnian isolat DNA bakteri tanpa dan hasil pra-pengayaan. Kisaran rasio isolat yaitu 1,49-2,12. DNA yang murni pada umumnya berada pada kisaran 1,8-2,0, apabila kurang kurang dari 1,8 menandakan kontaminasi protein, sedangkan apabila lebih dari 2,0 ada kontaminasi RNA (Olson dan Morrow

2012). Terdapat sampel yang memiliki kemurnian dibawah dan di atas nilai pada umumnya diduga disebabkan oleh adanya komponen pengotor. Komponen-komponen yang biasanya dianggap sebagai pengotor pada isolat DNA di antaranya yaitu protein. Kandungan media pra-pengayaan bakteri mengandung protein yaitu pepton yang diduga masih terbawa pada isolat DNA sehingga memengaruhi kemurniannya, namun pada penelitian ini tidak dilakukan pengkajian komponen pengotor 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, oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan amplifikasi dengan PCR pada seluruh sampel.

Konsentrasi isolat DNA tanpa dan hasil pra-pengayaan bakteri disajikan pada *Table 3*. Konsentrasi DNA isolat bakteri tanpa pra-pengayaan berkisar 15,75-157,85 ng/ μ L, hasil pra-pengayaan *lactose broth* yaitu 74,40-326,05 ng/ μ L, hasil pengayaan *marine broth* 39,35-461,75 ng/ μ L. Konsentrasi DNA tanpa pra-pengayaan lebih rendah dibandingkan dengan isolat yang lainnya, hal tersebut seiring dengan terbentuknya pita tipis pada hasil visualisasi. Konsentrasi bakteri sampel dan hasil pre-enrichment pada penelitian ini tidak di amati, sehingga diduga menjadi salah satu faktor yang menyebabkan konsentrasi isolat tidak sama. Konsentrasi DNA tersebut merupakan DNA seluruh bakteri yang tumbuh dan dapat terekstrak, bahkan sangat memungkinkan kalau didalamnya terdapat bakteri bukan pembentuk amina biogenik. Oleh sebab itu pada penelitian selanjutnya disarankan

Table 3 Concentration of bacterial DNA

Sample	Non pre-enrichment	Medium pre-enrichment	
		Lactose broth (ng/ μ L)	Marine broth (ng/ μ L)
Frozen tuna	46.30	76.55	90.85
Frozen little tuna	47.90	94.85	39.35
Frozen skipjack	15.75	101.00	81.40
Loin tuna	157.85	83.70	57.75
<i>Pindang potong</i>	75.90	74.40	89.35
<i>Pindang bumbu kuning</i>	19.45	135.70	65.00
Positive control	52.05	326.05	461.75

gunakan media selektif yang mengandung asam amino prekursor dari amina biogenik yang menjadi target, sehingga yang diisolasi spesifik target bakteri pembentuk amina biogenik.

Nurilmala *et al.* (2019) melaporkan bahwa ikan tongkol abu-abu hasil kultivasi *lactose broth* dapat mendeteksi gen *hdc* namun proses belum efektif, sedangkan Abdullah *et al.* (2020) melaporkan bahwa metode kultivasi *lactose broth* berhasil mengekspresikan gen target *tdc*. Media *marine broth* dipilih karena diharapkan dapat selektif menumbuhkan bakteri yang berasal dari ikan tersebut, bukan dari lingkungan. Bjornsdottir-Butler *et al.* (2011) berhasil menyeleksi bakteri gram negatif penghasil histamin pada media seleksi *marine broth*.

Buňková *et al.* (2011) melaporkan bahwa saat dekarboksilasi asam amino berfungsi sebagai sumber energi bagi bakteri, penambahan berbagai konsentrasi laktosa sebagai sumber energi dapat menurunkan jumlah bakteri namun meningkatkan konsentrasi tiramin, faktor lain yang memengaruhi pembentukan tiramin paling cepat yaitu konsentrasi NaCl yang semakin meningkat. Pereira *et al.* (2009) menjelaskan bahwa Na⁺ terlibat dalam pengaturan pH intraseluler yang berperan penting dalam jalur dekarboksilasi tirosin.

Pengayaan bakteri penghasil amina biogenik pada deteksi berbasis PCR lebih banyak digunakan. Media selektif yang dapat digunakan di antaranya *histidine decarboxylase broth* yang terdiri dari pepton, *hampshire*, NaCl, L-histidine HCl dan air destilasi, 10 mL

media digunakan untuk 0,5 mL kultur bakteri, diinkubasi selama 72 jam pada 30°C. Asam *sulphosalicylic* 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 menumbuhkan bakteri pada media yang terdiri dari TBS 1%, histidin 2%, pyrodoxal HCl 0,0005% dan 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 pengayaan pada media M17 *broth* dengan tambahan tirosin 2%, 5 mL media untuk menumbuhkan inokulum bakteri 25 μ L. 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*.

Gen Pengkode Amina Biogenik

Gen pengkode amina biogenik yang diamati di antaranya *histidine decarboxylase* (*hdc*) sebagai indikator terbentuknya histamin, *tyrosine decarboxylase* (*tdc*) sebagai indikator terbentuknya tiramin, serta *lysine decarboxylase* (*ldc*) sebagai indikator pembentukan *cadaverine*. Pengamatan menggunakan *multiplex* PCR konvensional, metode ini diharapkan dapat mengekspresikan ketiga gen sekaligus. Elektroforegram deteksi

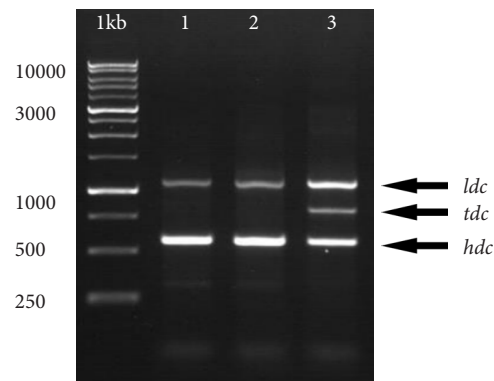


Figure 2 Electrophoregram control of biogenic amine coding gene non pre-enrichment (1) pre-enrichment lactose broth medium (2) and marine broth medium (3).

gen pengkode amina biogenik pada kontrol positif disajikan pada *Figure 2*.

Figure 2 menunjukkan bahwa gen pengkode amina biogenik yaitu *hdc*, *tdc* dan *ldc* berhasil terekspresi menggunakan *multiplex PCR*. Target gen *hdc* yaitu 571 bp (Wongsariya *et al.* 2015), *tdc* 825 bp dan *ldc* 1.098 (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 mengandung histamin 1713,88 mg/kg, sedangkan Saputri (2019) melaporkan ikan tuna yang disimpan pada suhu ruang selama 7 hari mengandung histamin 755.86 ± 0.09 mg// kg. Sampel tanpa pra-pengayaan dan pra-pengayaan pada media *lactose broth* hanya dapat mengekspresikan gen *hdc* dan *ldc*, sedangkan hasil pra-pengayaan pada media *marine broth* dapat mengekspresikan 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 bakteri yang berasal dari lingkungan perairan tersebut, oleh karena itu bakteri-bakteri pembentuk amina biogenik dapat tumbuh lebih baik pada media pra-pengayaan tersebut sehingga pada saat di PCR dapat terekspresikan.

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. 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 *Figure 3*.

Sampel yang tidak melalui tahap pra-pengayaan terdeteksi 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 pra-pengayaan *lactose broth* menunjukkan bahwa gen yang terdeteksi yaitu *hdc* dan *ldc*, *tdc* tidak teramplifikasi pada media pra-pengayaan *lactose broth* sama dengan kontrol yang dianalisis. Amplifikasi sampel yang diperkaya pada media *marine broth* terdeteksi 3 gen target (*hdc*, *tdc* dan *ldc*) pada sampel tuna beku, pindang potong dan pindang kuning. Identifikasi gen pada sampel yang ditumbuhkan pada media *marine broth* terdapat pita-pita yang bukan target yang teramplifikasi karena memiliki kecocokan dengan daerah primer tapi bukan target.

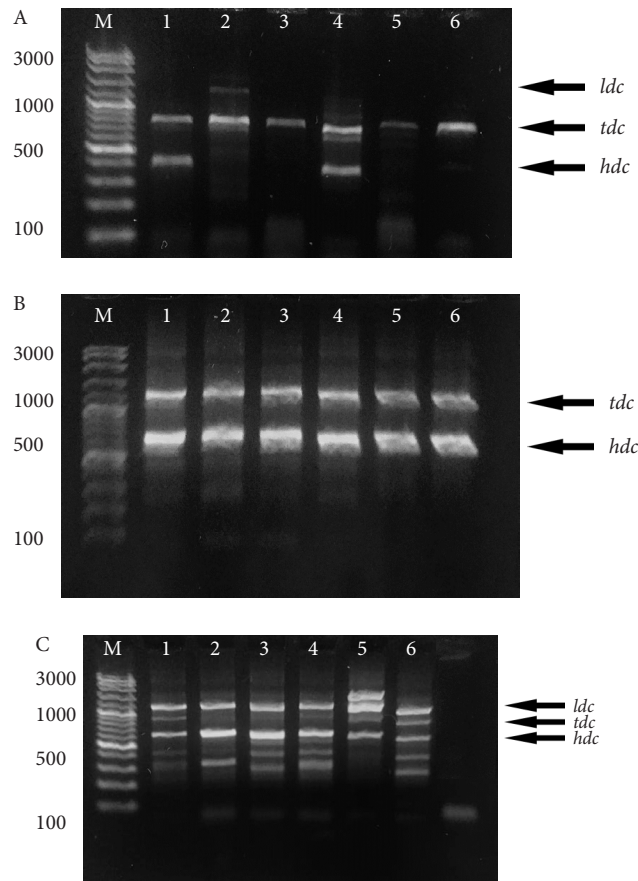


Figure 3 Electrophoregram of biogenic amine coding genes non pre-enrichment (A), with enrichment lactose broth medium (B), marine broth medium (C). M: marker, 1: frozen tuna, 2: frozen little tuna, 3: frozen skipjack, 4: loin tuna, 5: *pindang potong*, 6: *pindang bumbu kuning*, 7: negative control.

Yuwono (2006) menyatakan bahwa salah satu penyebab dalam PCR yaitu salah pengenalan DNA cetakan terhadap primernya. Ketiga sampel yang mampu mengekspresikan gen target selanjutnya di sekuensing untuk mengidentifikasi bakteri yang menghasilkan gen tersebut sehingga dapat menyandikan pembentukan amina biogenik.

Gen pengkode amina biogenik berhasil diidentifikasi menggunakan *multiplex* PCR. 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). De las Rivas *et al.* (2005) melaporkan *hdc* terekspresi 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* terekspresi pada 1.446 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*).

Analisis Bioinformatika

Sekuen DNA sampel control tanpa pra-pengayaan, pra-pengayaan *lactose broth* dan *marine broth*, tuna beku, *pindang potong* dan *pindang kuning* hasil pra-pengayaan *marine broth*. Sekuen dianalisis menggunakan BLAST sehingga dapat mengidentifikasi spesies bakteri pembentuk amina biogenik, hasil disajikan pada *Table 4*. Bakteri yang teridentifikasi pada sampel merupakan bakteri-bakteri pendekarboksilasi amina biogenik.

Table 4 Species identification with BLAST analysis

Sample	Pre-enrichment	Gene	Analytical results	% Identity	Accession numbers
Positive control	Non	<i>ldc</i>	<i>Citrobacter</i> sp.	83.50	CP047606.1
	Non	<i>hdc</i>	<i>M. morgani</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. morgani</i>	85.75	CP043955.1
	Marine broth	<i>ldc</i>	<i>Obesumbacterium proteus</i>	77.93	CP014608.1
	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
Frozen tuna	Marine broth	<i>ldc</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	91.03	CP056474.1
	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
Pindang bumbu 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
	Marine broth	<i>hdc</i>	<i>M. morgani</i>	93.20	FJ469561.1
Pindang potong	Marine broth	<i>ldc</i>	<i>Enterobacter hormaechei</i>	96.04	CP030076.1
	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 histamin (gen *hdc*) yang terdeteksi yaitu *M. morgani*, *E. aerogenes* dan *A. baumannii*. Ferrario *et al.* (2012) melaporkan bahwa bakteri *M. morgani* dan *E. hormaechei* merupakan bakteri dominan menghasilkan *hdc*, sedangkan Saputri (2019) melaporkan bahwa bakteri tersebut juga terdeteksi pada ikan tuna, tongkol dan cakalang. Bjornsdottir-buter *et al.* (2009) melaporkan bahwa bakteri *M. morgani*, dan *Enterobacter* sp. merupakan kelompok bakteri penghasil histamin tinggi. *A. baumannii* juga merupakan bakteri penghasil histamin sesuai dengan hasil deteksi Wongsariya *et al.* (2015) pada primer 571 bp.

Bakteri pembentuk cadaverin (gen *ldc*) yaitu *Citrobacter* sp., *Hafnia paralvei*, *Obesumbacterium proteus*, *Enterobacter cloacae* dan *Enterobacter hormaechei*. Bakteri-bakteri pembentuk cadaverin di antaranya *Enterobacter* dan *Proteus mirabilis* pada ikan tuna, tongkol dan cakalang (Nadya 2019), *Citrobacter freundii* pada gurita merah (Klanian *et al.* 2018), *Kluyvera intermedia*, *Enterobacter aerogenes*, *Yersinia kristensenii*, *Serratia grimesii*, *Serratia ficaria*, *Yersinia rodheii*, *Providencia vermicola* dan

Obesumbacterium proteus pada sosis sapi (Curiel *et al.* 2011).

Bakteri pembentuk tiramin (gen *tdc*) pada penelitian ini yaitu teridentifikasi *Enterococcus faecalis*. 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. faecalis* dan *E. faecium* merupakan bakteri penghasil tiramin, kedua jenis bakteri tersebut menghasilkan tiramin dalam jumlah yang tinggi sejak fase pertumbuhan eksponensial. Aktivitas tiraminogenik melambat pada fase diam hingga 72 jam inkubasi.

Identifikasi bakteri tersebut dapat dipercaya berdasarkan %identity bakteri tersebut dengan urutan nukleotida bakteri yang terdapat pada database geneBank dengan kode akses tertentu. Persen identitas yang semakin tinggi menunjukkan kemiripan spesies tersebut juga semakin dekat kekerabatan suatu spesies tersebut.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih kepada Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah mendanai penelitian ini pada program Insentif Riset Sistem Inovasi Nasional (INSINAS) a.n Dr. Mala Nurilmala SPi, MSi dengan judul Pengembangan Teknologi Rumpon dan Penjaminan Mutu Terintegrasi pada Perikanan Tuna Tongkol Cakalang Berkelanjutan pada nomor kontrak 12/INS-1/PPK/E4/2019.

KESIMPULAN

Isolat DNA bakteri memiliki kemurnian 1,49-2,17 dan konsentrasi 19,45-461,75 ng/ μ L. Media yang mampu mengekspresikan ketiga gen target yaitu *marine broth* pada kondisi PCR yaitu *initial heat activation* pada suhu 95°C selama 15 menit, *denaturasi* 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 15 menit. Bakteri pembentuk amina biogenik histamin yaitu *M. morgani*, *E. aerogenes* dan *A. baumannii*, pembentuk cadaverin yaitu *Citrobacter* sp., *Hafnia paralvei*, *Obesumbacterium proteus*, *Enterobacter cloacae* dan *Enterobacter hormaechei*, pembentuk tiramin yaitu *Enterococcus faecalis*. Saran pada penelitian ini yaitu penambahan asam amino prekursor pada media pra-pengayaan bakteri serta pemurnian isolat bakteri pembentuk amina biogenik.

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*. 404:1-8.
- 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. *Journal of Food Safety*. 39: 1-7.
- Agrawal S. 2008. Techniques in Molecular Biology. Lucknow (IN): International Book Distributing Co.
- Bargossi E, Tabanelli G, Montanari C, Lanciotti R, Gatto V, Gardini F, Torriani S. 2015. Tyrosine decarboxylase activity of enterococci grown in media with different nutritional potential: Tyramine and 2-phenylethylamine accumulation and tyrDC gene expression. *Frontiers in Microbiology*. 6: 1-10.
- Bjornsdottir-Buter K, Bolton GE, McClellan-Green PD, Jaykus LA, Green DP. 2009. Detection of Gram-negative histamine-producing bacteria in fish: a comparative study. *Journal of Food Protection*. 72(9):1987-1991.
- Bjornsdottir-Buter 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 microbiology*. 28: 356-363.
- 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*. *International of Journal of Food Microbiology*. 147: 112-119.
- 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: 268-373.
- 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. *Journal of Food Protection*. 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. *Federation of European Microbiology Societies*. 244:367-372.
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2012. *Public Health Risk of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products*. Rome (IT): Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Fatuni YS, Suwandi R, Jacob AM. 2014. Identifikasi kadar histamin dan bakteri pembentuk histamin dari pindang badeng tongkol. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 17(2): 112-118.
- Fatchiyah, Arumingtyas ES, Widyarti S, Rahayu S. 2011. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta (ID): Penerbit Erlangga.
- 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*. *Letters in Applied Microbiology*. 54:292-298.
- 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.
- Klanian MG, Díaz MD, Solís MJS. 2018. Molecular characterization of histamine-producing psychrotrophic bacteria isolated from red octopus (*Octopus maya*) in refrigerated storage. *High-Throughput*. 7(25): 1-14.
- Mahamudin M, Mohtar SH, Alias R. 2016. Effect of different storage conditions towards the formation of histamine producing bacteria in canned tuna (*Thunnus spp.*). *Food control*. 6(1): 82-87.
- 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.
- 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. *Jurnal Ilmu Teknologi Kelautan Tropis*. 11(2):285-296.
- Nurjanah, Abdullah A, Naibaho I, Kartikayani D, Nurilmala M, Yusfiandayani R, Sondita MFA. 2020. Fish quality and nutritional assessment of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) during low temperature storage. *Earth and Environmental Science*. 404: 1-15.
- Norita, Nurilmala M, Abdullah A. 2019. Kualitas ikan tongkol abu-abu (*Thunnus tonggol*) pada kondisi penyimpanan berbeda. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 22(3): 490-497.
- Olson ND, Morrow JB. 2012. DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Research Notes*. 5(668): 1-14.
- Pereira CI, Matos D, San Romão MV, Crespo MTB. 2009. Dual role for the tyrosine decarboxylation pathway in *Enterococcus faecium* E17: response to an acid challenge and generation of a proton motive force. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 345-352.
- Sambrook J, Russell D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition. New York (US): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saputri NN. 2019. Deteksi bakteri penghasil histamin melalui gen histidin dekarboksilase (*hdc*) pada ikan tuna, tongkol, dan cakalang. [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Surzycki. 2000. Rapid Isolation of DNA from *Staphylococcus aureus*. *Applied Environmental Microbiology*. 46(1): 283-285.
- Trevisani M, Cecchini M, Fedrizzi G, Corradini A, Mancusi R, Tothi E. 2019. Biosensing the histamine producing potential of bacteria in tuna. *Frontiers in Microbiology*. 10: 1-11.
- Verma P, Yadav AN, Kazy SK, Saxena AK,

- Suman A. 2014. Evaluating the diversity and phylogeny of plant growth promoting bacteria associated with wheat (*Triticum aestivum*) growing in central zone of India. *International Journal off Current Microbiology Applied Science*. 3(5): 432-447.
- Wongsariya K, Bunyaphatsara N, Yasawong M, Chomnawang MT. 2015. Development of molecular approach based on PCR assay for detection of histamine producing bacteria. *Journal of Food Science Technology*. 53(1): 640-648.
- Yazgan H. 2020. Biogenic amine production in histidine decarboxylase broth by selected lactic acid bacteria strains. *GIDA the Journal of Food*. 45(1): 31-38.
- Yuwono T. 2006. *Teori dan aplikasi polymerase chain reaction*. Yogyakarta (ID): Penerbit Andi Yogyakarta.