

**IDENTIFIKASI BAKTERI (*Nitrococcus* sp dan *Acinetobacter* sp) DALAM
MENGURAIKAN HISTIDIN MURNI MENJADI HISTAMIN SECARA *IN VITRO***

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

Oleh:

**RIKHY APRILLO WOWOR
NIM. 0710833005**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



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

**IDENTIFIKASI BAKTERI (*Nitrococcus* sp dan *Acinetobacter* sp) DALAM
MENGURAIKAN HISTIDIN MURNI MENJADI HISTAMIN SECARA *IN VITRO***

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

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Meraih Gelar Sarjana

Oleh:

**RIKHY APRILLO WOWOR
NIM. 0710833005**



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

repository.ub.ac

**IDENTIFIKASI BAKTERI (*Nitrococcus* sp dan *Acinetobacter* sp) DALAM
MENGURAIKAN HISTIDIN MURNI MENJADI HISTAMIN SECARA *IN VITRO***

Oleh:
RIKHY APRILLO WOWOR
0710833005

**MENGETAHUI
KETUA JURUSAN**

(Dr. Ir. HAPPY NURSYAM, MS)
NIP. 19600322 198601 1 001
Tanggal :

**MENYETUJUI
DOSEN PEMBIMBING I**

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

DOSEN PEMBIMBING II

(Dr. Ir. HAPPY NURSYAM, MS)
NIP. 19600322 198601 1 001
Tanggal :

LAPORAN SKRIPSI

IDENTIFIKASI BAKTERI (*Nitrococcus* sp, *Acinetobacter* sp) DALAM MENGURAIKAN HISTIDIN MURNI MENJADI HISTAMIN SECARA IN VITRO

Oleh :

RIKHY APRILLO WOWOR
NIM. 0710833005

telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 31 Januari 2012
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Mengetahui,

Dosen Pembimbing I

Ir. Yahya, MP

NIP. 19630706 199003 1 003

Tanggal :

Dosen Pembimbing II

Dr. Ir. Happy Nursyam, MS

NIP. 19600322 198601 1 001

Tanggal :

Menyetujui,

Dosen Penguji I

Prof. Ir. Sukoso, M.sc. Ph.d

NIP. 19640919 198903 1 002

Tanggal :

Dosen Penguji II

Eko Waluyo, S.pi, M.sc

NIP. 19800424 2005001 1 001

Tanggal :

Mengetahui,
Ketua Jurusan

Dr. Ir. Happy Nursyam, MS

NIP. 19600322 198601 1 001

Tanggal :

RINGKASAN

RIKHY APRILLO WOWOR. Laporan Skripsi dengan judul Identifikasi Bakteri (*Acinetobacter* sp.; *Nitrococcus* sp) Dalam Menguraikan Histidin Menjadi Histamin Secara In-vitro (dibawah bimbingan **Ir. Yahya, MP** dan **Dr. Ir. Happy Nursyam, MS**)

Histidin merupakan satu dari 20 asam amino dasar yang ada dalam protein. Bagi manusia histidin merupakan asam amino yang esensial bagi anak-anak. Rantai samping imidazol dan nilai pK_a yang relative netral (yaitu 6,0) berarti bahwa perubahan sedikit saja pada pH sel akan mengubah muatannya. Sifat ini menjadikan histidin sering menjadi bagian dari gugus katalitik pada enzim maupun ligan koordinasi pada metaloprotein. Histidin menjadi prekursor histamin, suatu amina yang berperan dalam system saraf dan karnosin suatu asam amino. Terdapat dua enantioner histidin yaitu D-histidin dan L-histidin, namun yang lebih dominan adalah L-histidin (Agustiana, 2010).

Histamin adalah senyawa amina biogenik yang terbentuk dari asam amino histidin akibat reaksi dengan enzim dekarboksilase. Amina biogenik diproduksi pada jaringan ikan oleh bakteri dari famili Enterobacteriaceae, seperti Morganella, Klebsiella, dan Hafnia yang menghasilkan enzim histidin dekarboksilase. Bakteri yang secara alami terdapat pada insang dan usus ikan akan menyebar ke seluruh bagian tubuh selama proses penanganan (Sumner et al., 2004 dalam Wicaksono, 2009).

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Dasar Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang dan Laboratorium Pengujian dan Pengawasan Mutu Hasil Perikanan (LPPMHP) Surabaya pada bulan Agustus-November 2011.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif. Metode eksploratif bertujuan untuk memperoleh pengetahuan tentang suatu gejala, sehingga setelah melalui tahap observasi, masalah serta hipotesisnya dapat dirumuskan (Singarimbun dan Effendi, 1989). Untuk uji biogenik amin itu sendiri, terutama histamin menggunakan Spektrofluorometri. Analisis pengujian histamin secara kuantitatif ini menggunakan metode Spektrofluorometri sesuai SNI 2354. 10 tahun 2009.

Berbagai jenis bakteri yang mampu menghasilkan enzim histidin dekarboksilasi (HDC) termasuk famili Enterobacteriaceae dan Bacillaceae. Umumnya spesies *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Pedococcus*, *Photobacterium*, *Salmonella*, *Shigella*, dan *Streptococcus* menunjukkan aktivitas dekarboksilasi asam amino (Allen 2004).

Berdasarkan pengujian histamin menggunakan metode spektrofotometri secara kuantitatif, perlakuan histidin murni + bakteri B1 didapati hasilnya berdasarkan lamanya waktu yang digunakan selama 6, 12, 18 dan 24 jam yaitu kontrol awal sebanyak 0,05 mg/kg mengalami kenaikan sebanyak 0,12 mg/kg; 1,19; 33,55 mg/kg; 0,23 mg/kg. untuk penambahan bakteri B2 kadar histamin yang semula 0,05 mg/kg mengalami kenaikan sebanyak 6,18 mg/kg; 8,68 mg/kg; 0,31 mg/kg; 4,21 mg/kg. Sedangkan campuran antara B1 dan B2 sebanyak 2,89 mg/kg; 6,90 mg/kg; 3,26 mg/kg; 2,43 mg/kg. Dari hasil diatas dapat disimpulkan secara garis besar bahwa bakteri *Nitrococcus* sp dan *Acinetobacter* sp tidak dapat menurunkan kadar histamin melainkan menaikkan kadar histamin.

KATA PENGANTAR

Puji Syukur penyusun panjatkan atas kehadiran Tuhan yang maha esa, yang hanya dengan izin-Nyalah penyusun dapat menyelesaikan laporan skripsi. Laporan Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

Ucapan terimakasih sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada :

1. Ir. Yahya, Mp sebagai dosen pembimbing I Skripsi atas segala petunjuk, kesabaran dan bimbingan mulai penyusunan usulan Skripsi sampai dengan selesainya laporan Skripsi.
2. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS sebagai dosen pembimbing II Skripsi atas segala petunjuk, kesabaran dan bimbingan mulai penyusunan usulan Skripsi sampai dengan selesainya laporan Skripsi.
3. Pak Slamet terima kasih banyak untuk bantuannya, untuk ilmunya sehingga semua bisa berjalan dengan sangat baik.

Penulis menyadari laporan ini jauh dari kesempurnaan. Karena itu penulis mengharapkan saran, kritik yang membangun dari pembaca. Harapan kami, semoga laporan ini bisa bermanfaat bagi semua pihak.

Malang, Februari 2012

Penulis

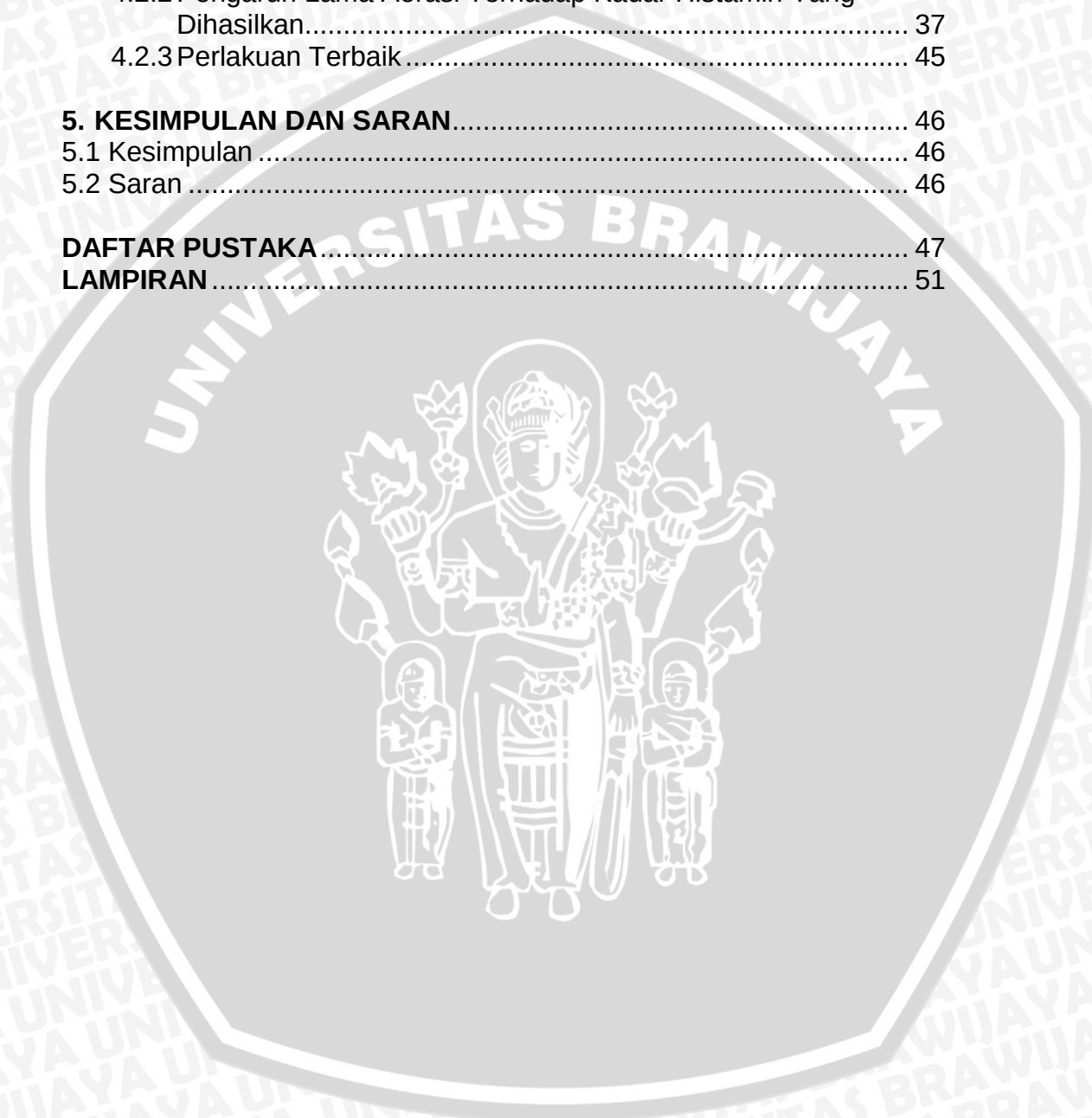
Kupersembahkan Skripsi ini kepada:

- ⑥ Tuhan Yesus Yang selalu Menolong dan Membimbing aku
- ⑥ Ayah,mama dan adeku atas doa dan seluruh dukungannya, love you all.
- ⑥ Bwt ayuku yg selalu memberi semangat sampai semuanya terselesaikan.
- ⑥ Teman-teman solid timku tersayang, Wila,Tika,Pay,Tulus terima kasih untuk kerja timnya,yg gk bisa diungkapkan dengan kata2 dan Sudah susah-susah bersama buat penelitian ini sampai laporan akhirnya bisa terselesaikan,selalu memberiku kekompakan, pengalaman, perjuangan dan kekeluargaan yang tercipta sehingga semakin mendewasakan penulis dalam bersikap dan mengambil keputusan.
- ⑥ Teman2 THP angkatan 2007 yang telah membantu memberi sumbangan pikiran, semangat dan dorongan.

DAFTAR ISI

	Hal
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSEMBAHAN	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
 1. PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Hipotesis	3
1.5 Kegunaan Penelitian	4
1.6 Waktu dan Tempat	4
 2. TINJAUAN PUSTAKA	 5
2.1 Histidin	5
2.2 Histamin	7
2.3 Bakteri Penghasil Histamin	10
2.3.1 <i>Acinetobacter</i> sp	11
2.3.2 <i>Nitrococcus</i> sp	13
2.4 In vitro	14
2.5 Spektrofotometri	15
 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	 18
3.1 Bahan Penelitian	18
3.2 Alat Penelitian	18
3.3 Metode Penelitian	19
3.3.1 Penelitian Pendahuluan	19
3.3.1.1 Analisis Uji Histamin	20
3.3.1.2 Prosedur Penelitian	24
3.3.2 Penelitian Utama	26
3.3.2.2 Rancangan Percobaan	29
3.4 Prosedur Penelitian	31
3.4.1 Penelitian Tahap I (Pembiakan Bakteri)	31
3.4.2 Pembuatan Media TSB (Tryptone Soya Broth)	34
3.4.3 Penelitian Tahap II (Pengenceran Bakteri)	35
3.4.4 Penelitian Tahap III (Pembuatan Larutan Histidin)	39
3.4.5 Penelitian Tahap IV (Aerasi)	39

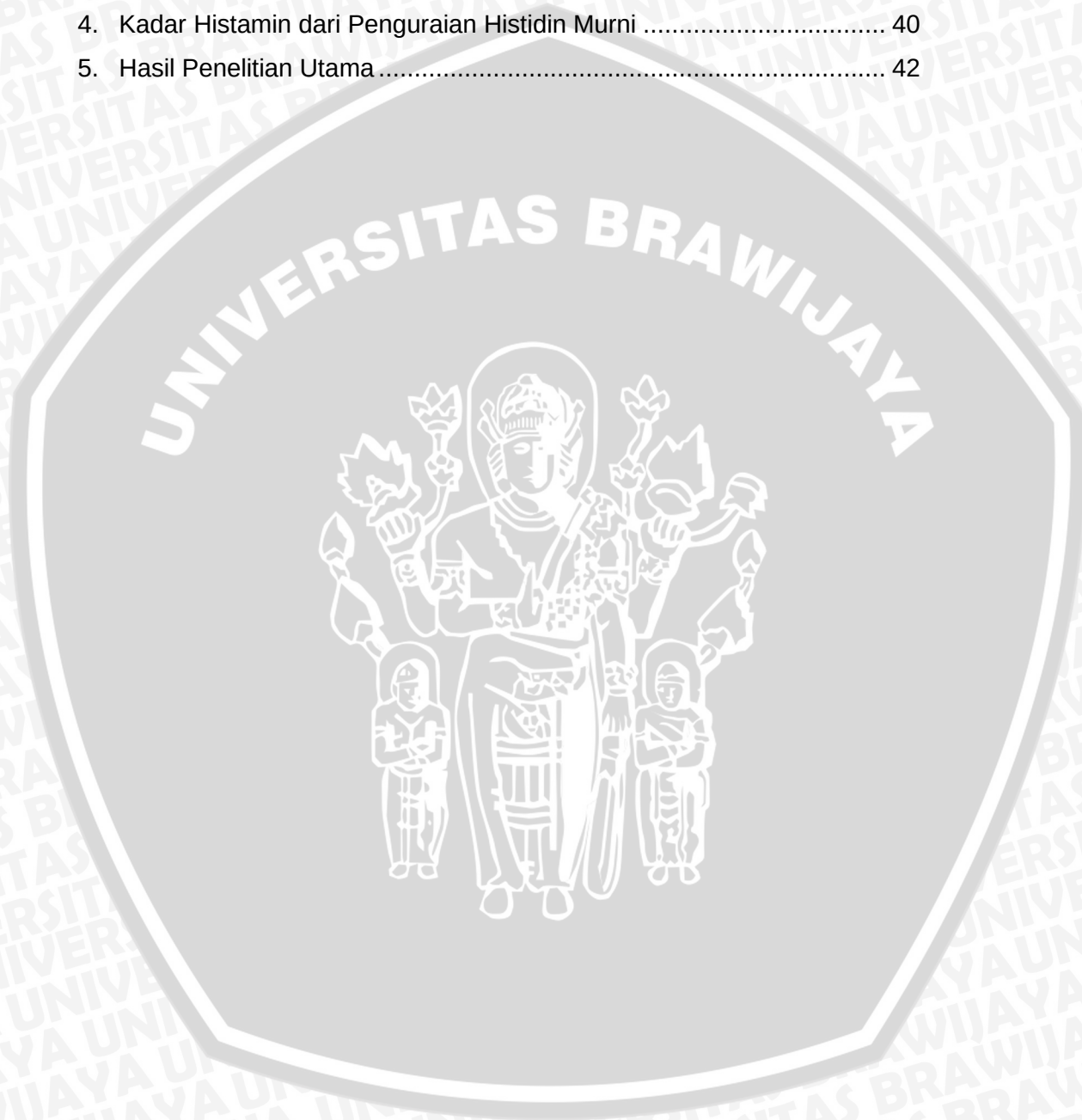
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	40
4.1 Hasil Penelitian	40
4.1.1 Penelitian Pendahuluan	40
4.2 Penelitian Utama.....	42
4.2.1 Pengaruh Penambahan Bakteri Terhadap Kadar Histamin	43
4.2.2 Pengaruh Lama Aerasi Terhadap Kadar Histamin Yang Dihasilkan.....	37
4.2.3 Perlakuan Terbaik	45
5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	46
5.1 Kesimpulan	46
5.2 Saran	46
DAFTAR PUSTAKA.....	47
LAMPIRAN	51



DAFTAR TABEL

Tabel

1. Rancangan Percobaan Bentuk RAL Factorial	22
2. Tabel Sidik Ragam Pada Rancangan acak Lengkap RAL Factorial ...	34
3. Komposisi TSB Per liter.....	34
4. Kadar Histamin dari Penguraian Histidin Murni	40
5. Hasil Penelitian Utama	42



DAFTAR GAMBAR

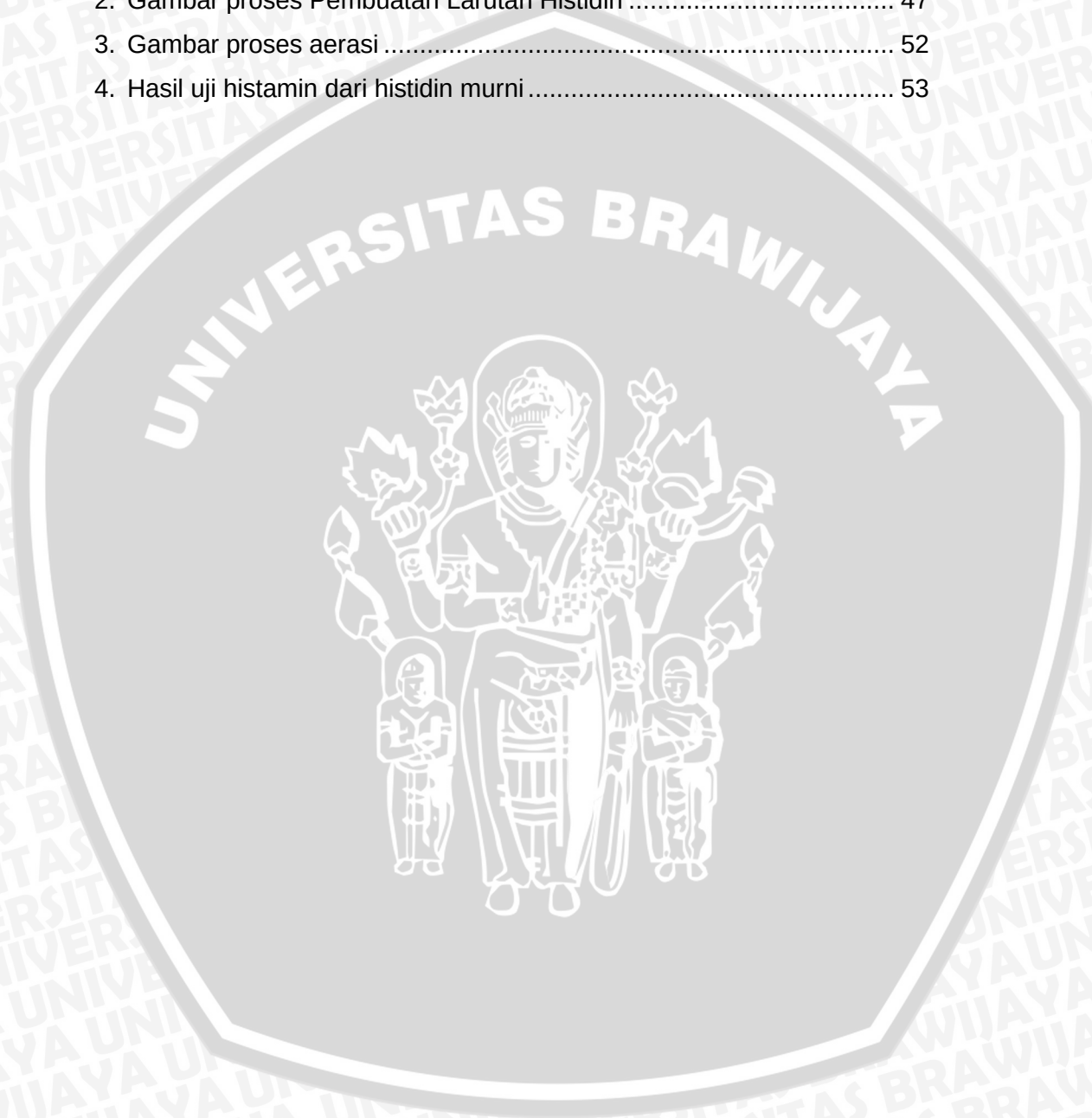
Gambar

1. Perubahan Histidin Menjadi Histamin	6
2. Proses katabolisme histamin pada tubuh manusia	9
3. <i>Acinetobacter</i> sp.....	12
4. <i>Nitrococcus</i> sp.....	14
5. Diagram optik fluorometer	16
6. Alat spektrofotometri	17
7. <i>Waterbath</i>	21
8. <i>Stirrer-plate</i>	22
9. Resin	22
10. <i>Glasswool</i>	23
11. Skema Kerja Aerasi Histidin Murni.	25
12. Skema Kerja Aerasi Larutan Histidin Murni Dengan Ulangan	28
13. Prosedur Kerja Sterilisasi Alat	33
14. Prosedur Kerja Pembuatan Media Cair	35
15. Prosedur Kerja Peremajaan Bakteri	35
16. Prosedur Kerja Pembuatan Larutan Pengenceran	38
17. Prosedur Kerja Pengenceran Bakteri	38
18. Proses Pembuatan Histidin	39
19. Grafik Hasil Kadar Histamin Dari Histidin Murni.....	41
20. Grafik Pengaruh Jenis Bakteri Terhadap Kadar Histamin.....	43
21. Pengaruh Lama Aerasi Terhadap Kadar Histamin Yang Dihasilkan.....	44

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

1. Kurva pertumbuhan bakteri.....	45
2. Gambar proses Pembuatan Larutan Histidin	47
3. Gambar proses aerasi	52
4. Hasil uji histamin dari histidin murni	53



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Histidin merupakan satu dari 20 asam amino dasar yang ada dalam protein. Bagi manusia histidin merupakan asam amino yang esensial bagi anak-anak. Rantai samping imidazol dan nilai pK_a yang relative netral (yaitu 6,0) berarti bahwa perubahan sedikit saja pada pH sel akan mengubah muatannya. Sifat ini menjadikan histidin sering menjadi bagian dari gugus katalitik pada enzim maupun ligan koordinasi pada metaloprotein. Histidin menjadi prekursor histamin, suatu amina yang berperan dalam system saraf dan karnosin suatu asam amino. Terdapat dua enantioner histidin yaitu D-histidin dan L-histidin, namun yang lebih dominan adalah L-histidin (Agustiana, 2010).

Histamin adalah senyawa amina biogenik yang terbentuk dari asam amino histidin akibat reaksi dengan enzim dekarboksilase. Amina biogenik diproduksi pada jaringan ikan oleh bakteri dari famili Enterobacteriaceae, seperti Morganella, Klebsiella, dan Hafnia yang menghasilkan enzim histidin dekarboksilase. Bakteri yang secara alami terdapat pada insang dan usus ikan akan menyebar ke seluruh bagian tubuh selama proses penanganan (Sumner et al., 2004 dalam Wicaksono, 2009).

Bakteri penghasil histamin adalah bakteri yang dapat menghasilkan enzim histidin dekarboksilase, suatu enzim yang diperlukan dalam proses dekarboksilasi, perubahan dari histidin menjadi histamin. Pada ikan-ikan Scombroidae, adanya bakteri penghasil histamin akan menyebabkan terbentuknya histamin karena histidin bebas yang terdapat dalam daging ikan diubah menjadi histamine (Kusmarwati, 2008).

Acinetobacter sp. adalah bakteri yang hidup di tanah dan air. Bakteri ini juga dapat ditemukan pada kulit orang sehat. Pasien yang sakit di rumah sakit

mendapatkan tularan oleh infeksi *Acinetobacter*. Orang yang sehat biasanya juga dapat tertular bakteri *Acinetobacter*. *Acinetobacter* dapat menyebar dari orang ke orang dengan menyentuh cairan tubuh (darah, urin) atau item yang telah di kontak dengan pasien (stetoskop, manset tekanan darah, dan lain-lain). Biasanya pasien yang tertular terdapat bakteri *Acinetobacter* sp. diparu-parunya, yang dapat menyebar melalui batuk, bersin, atau penyedotan. *Acinetobacter* sp. dapat dihilangkan dari tangan dengan pembersih tangan yang benar (Center for disease control, 2005).

Nitrococcus sp. adalah bakteri yang berguna pada pengolahan limbah pada proses bioremediasi. Bakteri ini penting pada siklus nitrogen dengan meningkat availability dari nitrogen. Jenis bakteri ini ditemukan di tanah, limbah, air tawar, dan pada permukaan bangunan, terutama pada area kotor yang mengandung senyawa nitrogen dalam jumlah besar. *Nitrococcus* mampu bertahan pH dari 6.0- suhu 9.0 dan pada suhu antara 20 – 30° C (Wikipedia, 2010).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh dari penguraian histidin menjadi histamin oleh bakteri *Nitrococcus* sp. dan *Acinetobacter* sp. dengan teknik *in vitro* karena dengan teknik *in vitro* ini cenderung untuk memfokuskan pada organ, jaringan, sel, komponen sel, protein dan biomolekul. Sehingga teknik ini lebih sesuai digunakan pada penelitian ini dari pada teknik yang lain. *In vitro* (bahasa Latin : dalam kaca) dilakukan tidak dalam hidup organisme tetapi dalam lingkungan terkontrol, misalnya di dalam tabung reaksi atau cawan petri (Putera, 2010). Salah satu jenis metode yang termasuk teknik *in vitro* yaitu metode spektrofotometri, dimana metode ini mempunyai prinsip mengekstrak kadar histamin dari sampel contoh dengan menggunakan metanol, sekaligus mengkonversinya kedalam bentuk OH, selanjutnya zat-zat histamin tersebut dimurnikan menggunakan resin penukar ion dan diubah kebentuk

derivatnya dengan senyawa OPT, lalu diukur besar *fluororesensi* histamin secara fluorometri pada panjang gelombang excitasi 350 nm dan emisi 444 nm (SNI, 2009).

1.2 Rumusan Masalah

Saat ini usaha dalam penurunan histamin telah banyak dilakukan salah satunya adalah dengan cara bioaugmentasi, Tetapi cara tersebut belum banyak dilakukan dan diketahui manfaatnya oleh masyarakat. Oleh karena itu, dilakukan penelitian mengenai penguraian kadar histamin dengan penambahan bakteri *Nitrococcus* sp. dan *Acinetobacter* sp. Dalam larutan histidin murni secara *in vitro*, sehingga dari uraian di atas dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah bakteri *Nitrococcus* sp. dan *Acinetobacter* sp. berpengaruh terhadap kadar histamin?
2. Bagaimana pengaruh lama waktu terhadap penguraian histidin menjadi histamin oleh bakteri *Nitrococcus* sp. dan *Acinetobacter* sp.?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui besarnya pengaruh penambahan histidin menjadi histamin oleh bakteri *Nitrococcus* sp. dan *Acinetobacter* sp. terhadap penguraian kadar histamin.
2. Untuk mengetahui pengaruh lama waktu terhadap penguraian histidin menjadi histamin oleh bakteri *Nitrococcus* sp. dan *Acinetobacter* sp.

1.4 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah :

1. Bakteri *Nitrococcus* sp. dan *Acinetobacter* sp. berpengaruh terhadap kadar histamin.
2. Lama waktu tertentu proses penguraian histidin menjadi histamin oleh bakteri *Nitrococcus* sp. dan *Acinetobacter* sp.

1.5 Kegunaan

Kegunaan dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi kepada pihak-pihak yang berkepentingan tentang manfaat dari bakteri (*Nitrococcus* sp. dan *Acinetobacter* sp.) dengan histidin murni terhadap penurunan kadar histamin secara *in vitro*.

1.6 Waktu dan Tempat

Penelitian pendahuluan dilaksanakan pada hari Selasa–Kamis tanggal 16–18 Agustus 2011 dan dilanjutkan dengan penelitian inti pada hari Selasa–Jumat tanggal 15–25 November di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan hari Selasa–Rabu tanggal 29–30 November 2011 di Laboratorium Mikrobiologi Dasar Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Pengendalian dan Pengujian Mutu Hasil Perikanan (LPPMHP) Surabaya.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Histidin

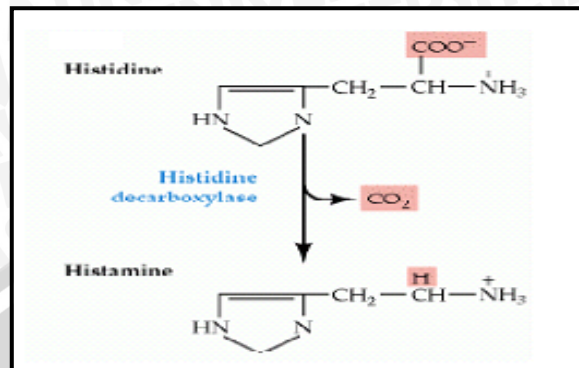
Histidin merupakan prekursor dari histamin, yaitu suatu amina yang berperan dalam system saraf dan karnosin suatu asam amino (Agustiana, 2010). Histidin dapat diubah menjadi histamin selama proses pembusukan oleh bakteri pembentuk histamin yang mengandung enzim histidin dekarboksilase (Sumner *et al.*, 2004).

Histidin dapat diubah menjadi histamin selama proses pembusukan oleh bakteri pembentuk histamin yang mengandung enzim histidin dekarboksilase. Pembentukan histamin sering disebabkan oleh suhu ikan yang tinggi setelah penangkapan (Guizani *et al.*, 2005). Senyawa yang bersifat racun tersebut adalah histamin, yang merupakan suatu senyawa hasil perombakan asam amino bebas histidin. Histidin diubah menjadi histamin oleh enzim *histidine decarboxylase* yang dihasilkan oleh bakteri-bakteri pembentuk histamin (Rawles *et al.*, 1995).

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

Ditambahkan pula oleh Taylor dan Behling (1982), bahwa histamin merupakan perubahan dari histidin yang terbentuk di dalam makanan karena aktivitas bakteri penghasil enzim histidin dekarboksilase.

Perubahan histidin menjadi histamin dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Perubahan histidin menjadi histamin
(Purves et al., 2001 dalam Widiatusti 2004)

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

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

2.2 Histamin

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

Histamin merupakan senyawa yang penting dalam racun scromboid (racun yang ada di dalam ikan jenis scromboidae), tetapi gejalanya tidak tampak ketika diaplikasikan dengan obat anti-histamin. Histamin bukan hanya senyawa yang responsive untuk racun scromboid, karena tidak begitu beracun bila ikan tersebut dimakan secara langsung atau dalam keadaan segar. Racun histamin akan bertambah ketika bersama dengan senyawa amin yang lain, seperti putrescine dan cadaverin (Rodriguez *et al.*, 1994).

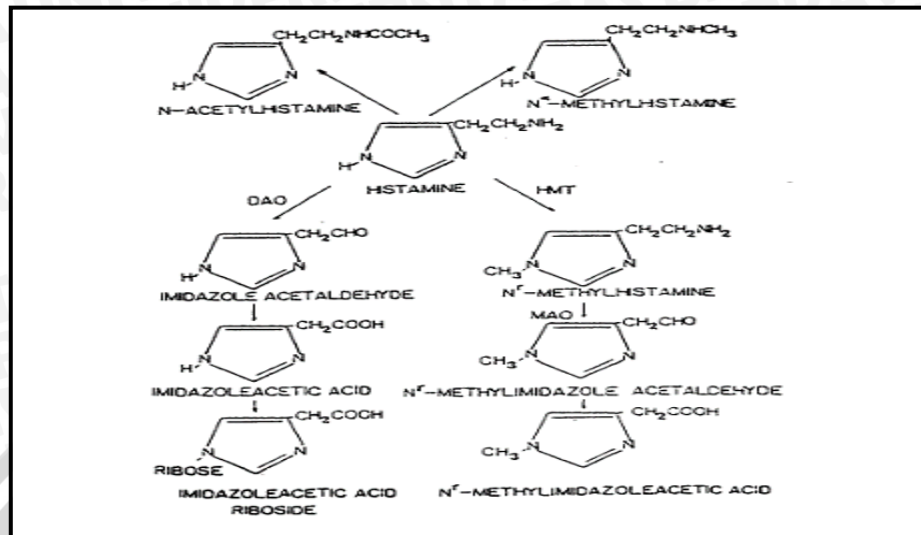
Histamin dihasilkan dari perombakan histidin yang merupakan prekursor histamin. Ada dua macam histidin dalam daging ikan, yaitu histidin bebas yang akan diubah menjadi histamin dan histidin terikat dalam protein (Sims *et al.* 1992). Histidin dapat diubah menjadi histamin selama proses pembusukan oleh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

Histamin umumnya terbentuk dari fraksi protein yang bereaksi dengan enzim-enzim dan merupakan hasil metabolisme *anaerob post mortem*, yakni terjadi setelah

kematian makhluk hidup. Sehingga kasus alergi hanya terjadi bila makanan hasil laut yang dikonsumsi kadaluarsa atau kualitas tidak lagi baik. Karena komposisi kimiawi berubah oleh aktivitas enzim-enzim atau oleh aktivitas mikroorganisme pembusuk (Agustina, 2010). Menurut Taylor dan Behling (1982), histamin merupakan perubahan dari histidin yang terbentuk di dalam makanan karena aktivitas bakteri penghasil enzim histidin dekarboksilase.

Pembentukan histamin dipengaruhi oleh beberapa faktor. Terdapat 3 faktor yang mempengaruhi kandungan histamin pada ikan, yaitu keberadaan bakteri histidin dekarboksilase, kandungan histidin bebas pada ikan, dan faktor lingkungan (suhu dan waktu penanganan) (Lehane dan Olley, 1999). Ditambahkan oleh Taylor (1983), selain itu peningkatan kadar histamin dalam tubuh ikan juga dipengaruhi oleh waktu dan penanganan sehingga akan menyebabkan pertumbuhan bakteri yang akan merubah histidin bebas menjadi histamin melalui reaksi dekarboksilase.

Keberadaan histamin dalam jumlah besar dapat menyebabkan keracunan bahkan kematian bagi manusia yang mengkonsumsinya. Konsumsi makanan yang mengandung kadar histamin yang kecil akan memberikan efek yang kecil pula bagi tubuh manusia. Hal tersebut karena sistem intestinal tubuh manusia mengandung enzim DAO (diamine oxidase) dan HMT (histamin N-methyl transferase) dimana akan mendegradasi histamin menjadi produk yang tidak berbahaya seperti : *imidazoleacetic acid*, *methylhistamine*, *methylimidazole acetic acid*, *imidazoleacetic acid riboside*, dan *acethylhistamine*. Kemampuan enzim DAO dan HMT di dalam tubuh manusia juga dapat dihambat oleh putresin dan kadaverin. Proses katabolisme histamin pada tubuh manusia dengan adanya enzim DAO dan HMT dapat ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Proses katabolisme histamin pada tubuh manusia (Taylor dalam Lehane dan Olley, 1999)

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

Tingginya kadar histamin dalam makanan ini merupakan dampak aktivitas bakteri pada asam amino histidin. Histamin sesungguhnya bukan zat yang asing pada tubuh manusia. Dalam takaran fisiologis, histamin memikul tugas sebagai

substansi yang berperan dalam sekresi asam lambung, tetapi dengan dosis tinggi, zat ini berubah sifat menjadi racun (Arisman, 2009).

2.3. Bakteri Penghasil Histamin

Bakteri penghasil histamin adalah bakteri yang dapat menghasilkan enzim histidin dekarboksilase, suatu enzim yang diperlukan dalam proses dekarboksilasi, perubahan dari histidin menjadi histamin. Pada ikan-ikan Scombroidea, adanya bakteri penghasil histamin akan menyebabkan terbentuknya histamin karena histidin bebas yang terdapat dalam daging ikan diubah menjadi histamin (Indriati *et al.*, 2006).

Menurut Huss (1994), bakteri penghasil histamin termasuk pada golongan *Enterobacteriaceae*, beberapa *Vibrio* sp, *Clostridium* dan *Lactobacillus* sp. Penghasil histamin paling banyak ialah *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumonia* dan *Hafnia alvei*. Bakteri utama yang merupakan bakteri histidin dekarboksilase, yang dapat meningkatkan kandungan histamin pada ikan, yaitu *Proteus morganii*, *Klebsiella pneumonia* dan *Hafnia alvei* (Taylor 1983). Keer *et al.* (2002) menambahkan jenis bakteri yang mampu memproduksi histamin dari histidin dalam jumlah tinggi yaitu *Proteus morganii* (bigeye, skipjack), *Enterobacter aerogenes* (skipjack), *Clostridium perfringens* (skipjack).

Bakteri yang memiliki enzim histidin dekarboksilase atau biasa disebut bakteri penghasil histamin, sebagian besar termasuk ke dalam famili *Enterobacteriaceae*. Bakteri yang memiliki enzim histidin dekarboksilase, atau biasa disebut bakteri penghasil histamin, sebagian besar termasuk ke dalam famili *Enterobacteriaceae*. Diketahui banyak jenis bakteri yang mampu menghasilkan histidin dekarboksilase seperti *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumonia*, *Hafnia*

alvei, *Clostridium perfringens*, *Lactobacillus* spp., *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella* spp., *Aeromonas* spp., *Escherichia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Photobacterium* spp., dan *Vibrio* Wei et al., (1990) dalam Kusmarwati (2008).

2.3.1 *Acinetobacter* sp.

Genus *Acinetobacter* berbentuk batang dengan diameter 0,9-1,6 μm dan panjang 1,5-2,5 μm menjadi bola dalam fase pertumbuhan stasioner. Sel tidak membentuk spora. Genus ini tumbuh dengan baik pada semua media yang kompleks umum. Kebanyakan koloni tumbuh dalam media yang mengandung karbon tunggal dan sumber energi nitrogen. Bakteri ini secara alami ada di dalam tanah, air, dan limbah (Holt et al., 2000).

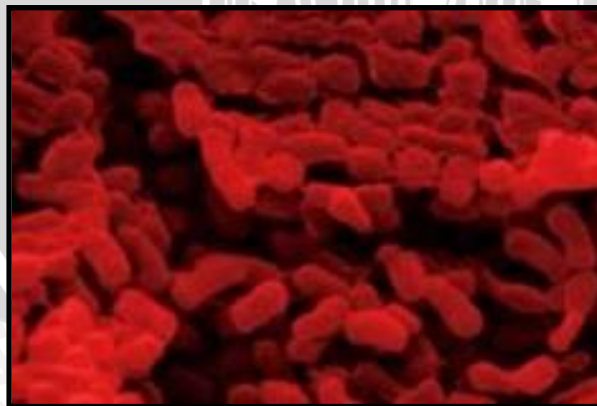
Acinetobacter memasuki tubuh lewat luka terbuka, kateter, dan tabung pernapasan. Infeksinya bisa terjadi pada sistem kekebalan yang kurang mencukupi pada luka yang merebak, orang tua, anak-anak atau penderita penyakit yang berhubungan dengan kekebalan tubuh. Invasinya pada umumnya tidak menjadi ancaman pada orang-orang yang belum sakit, tetapi petugas kesehatan dan pengunjung rumah sakit dapat membawa bakteri ke pasien yang ada dan fasilitas medis lainnya. Jumlah infeksi *nosocomial* (infeksi yang didapat saat di rumah sakit) yang disebabkan oleh *Acinetobacter* sp. meningkat dalam beberapa tahun terakhir (Pisang kipas, 2009).

Acinetobacter sp. adalah bakteri yang hidup di tanah dan air. Bakteri ini juga dapat ditemukan pada kulit orang sehat. Pasien yang sakit di rumah sakit mendapatkan tularan oleh infeksi *Acinetobacter*. Orang yang sehat biasanya juga dapat tertular bakteri *Acinetobacter*. *Acinetobacter* dapat menyebar dari orang ke orang dengan menyentuh cairan tubuh (darah, urin) atau item yang telah di kontak dengan pasien (stetoskop, manset tekanan darah, dll). Biasanya pasien yang tertular

terdapat bakteri *Acinetobacter* sp. di paru-parunya, yang dapat menyebar melalui batuk, bersin, atau penyedotan. *Acinetobacter* sp. dapat dihilangkan dari tangan dengan pembersih tangan yang benar (Center for disease control, 2005).

Dalam dua dekade terakhir ini telah muncul bakteri *Acinetobacter* sp. yang merupakan nosokomial utama dunia yang relevan patogen. *Acinetobacter* sp. dapat menjadi agen penyebab penyakit seperti pneumonia, bakteremia, meningitis, lembut jaringan dan infeksi saluran kemih, yang rentan akan kematian tinggi. Beberapa berita nasional dan asing mengungkapkan isolasi dari *Acinetobacter* sp. hampir semua resisten terhadap yang tersedia secara komersial agen antimikroba. Kebutuhan pengembangan agen antibakteri baru dibesarkan sebagai kebangkitan tertentu senyawa terlupakan, sebagai *polymyxins* (Diomedi, 2005).

Bakteri dari genus *Acinetobacter* gram negatif basil atau coccobacilli, sering digunakan, fermentasi glukosa dan aerob ketat, bergerak, katalase positif dan oksidase negatif. Mereka tumbuh dengan baik di semua media, dan suhu pertumbuhan optimal 33-35 °C (Angeles, 1993). Bakteri *Acinetobacter* sp. dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. *Acinetobacter* sp.

Adapun klasifikasi bakteri *Acinetobacter* sp. adalah sebagai berikut

Kerajaan	: Bacteria
Filum	: Protobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Pseudomonadales
Famili	: Moraxellaceae
Genus	: <i>Acinetobacter</i>
Spesies	: <i>Acinetobacter</i> sp.

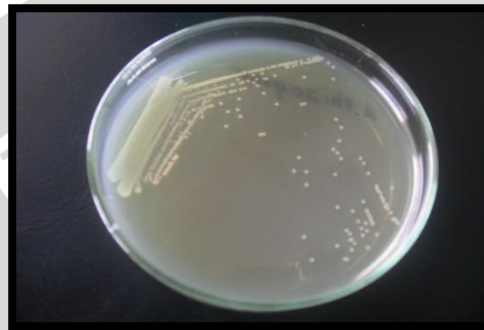
2.3.2 *Nitrococcus* sp.

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

Nitrococcus sp. adalah bakteri yang berguna pada pengolahan limbah pada proses bioremediasi. Bakteri ini penting pada siklus nitrogen dengan meningkatkan *availability* dari nitrogen. Jenis bakteri ini ditemukan di tanah, limbah, air tawar, dan pada permukaan bangunan, terutama pada area kotor yang mengandung senyawa nitrogen dalam jumlah besar. *Nitrococcus* sp. mampu bertahan pH dari 6.0 - suhu 9.0 dan pada suhu antara 20⁰ C - 30⁰ C (Wikipedia, 2010).

Pertumbuhan pada bakteri mempunyai arti perbanyakan sel dan peningkatan ukuran populasi. Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri atau kondisi untuk pertumbuhan optimum adalah: suhu, derajat keasaman atau pH, konsentrasi garam, sumber nutrisi, zat-zat sisa metabolisme, dan zat kimia. Hal tersebut diatas bervariasi menurut spesies bakterinya (Adhie, 2007).

Menurut Rompas (1998), bakteri autotrofi (bakteri nitrifikasi) dapat menggunakan N–anorganik untuk melakukan nitrifikasi, seperti genus *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio*, dan *Nitrosobolus*. Pada tahap pertama reaksi berjalan berlangsung dari amonium ke nitrit yang melibatkan bakteri *Nitrosomonas* dan *Nitroccoccus* sp.



Gambar 4. *Nitroccoccus* sp.

2.4 In Vitro

In vitro (bahasa Latin : dalam kaca) dilakukan tidak dalam hidup organisme tetapi dalam lingkungan terkontrol, misalnya di dalam tabung reaksi atau cawan petri. Banyak percobaan biologi seluler dilakukan di luar organisme atau sel, karena kondisi pengujian mungkin tidak sesuai dengan kondisi di dalam organisme. Dapat mengakibatkan hasil yang tidak sesuai dengan situasi yang muncul dalam organisme hidup. Akibatnya, hasil eksperimen tersebut sering dijelaskan dengan *in vitro* (Putera, 2010).

Jenis penelitian ini bertujuan untuk menjelaskan pengaruh dari variabel eksperimental pada subset dari bagian pokok suatu organisme. Hal ini cenderung untuk memfokuskan pada organ, jaringan, sel, komponen sel, protein ,dan

biomolekul. Dalam penelitian *in vitro* yang lebih cocok dibandingkan *in vivo* penelitian untuk menyimpulkan mekanisme tindakan biologis (Veterine, 2010).

Kultur *In vitro* adalah suatu teknik untuk mengisolasi, sel, protoplasma, jaringan, dan organ dan menumbuhkan bagian tersebut pada nutrisi yang mengandung zat pengatur tumbuh tanaman pada kondisi aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman sempurna kembali (Hamdan, 2008).

in vitro (bahasa Latin : dalam kaca) dilakukan tidak dalam hidup organisme tetapi dalam lingkungan terkontrol, misalnya di dalam tabung reaksi atau cawan petri. Banyak percobaan biologi seluler dilakukan di luar organisme atau sel, karena kondisi pengujian mungkin tidak sesuai dengan kondisi di dalam organisme, ini dapat mengakibatkan hasil yang tidak sesuai dengan situasi yang muncul dalam organisme hidup. Akibatnya, hasil eksperimen tersebut sering dijelaskan dengan *in vitro* (Pharmacy, 2011).

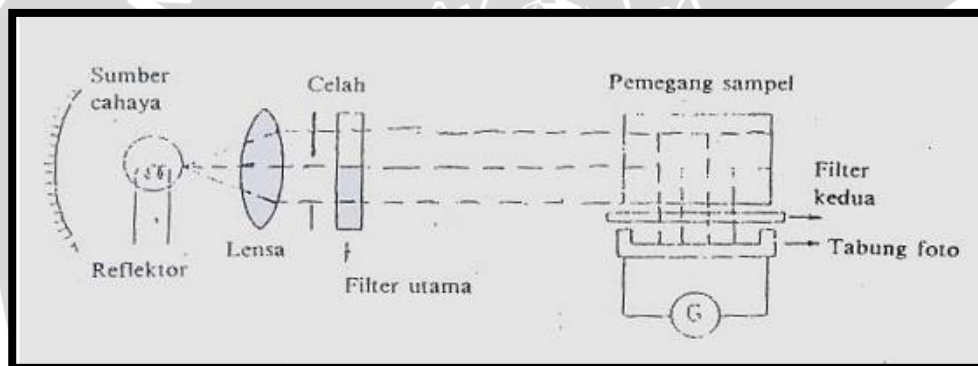
2.5 Spektrofluorometri

Spektrofluorometri adalah metode analisis kimia kuantitatif yang berdasarkan *flourecence*. *Flourecence* dan *phosporecence* adalah bagian dari *photoluminence*, yaitu tipe spektroskopi optik dimana sebuah molekul tereksitasi dengan mengabsorpsi ultraviolet, sinar tampak dan radiasi inframerah dekat. Molekul tereksitasi akan kembali kepada keadaan dasar atau ke tingkat eksitasi lebih rendah, dengan mengemisikan sinar. Sinar yang diemisikan inilah yang akan diukur (Widodo, 2010).

Dalam Modul kuliah Spektroskopi (2007), spektrofotometri fluoresensi merupakan suatu prosedur yang menggunakan pengukuran intensitas cahaya

fluoresensi yang dipancarkan oleh zat uji dibandingkan dengan yang dipancarkan oleh suatu baku tertentu. Pada umumnya cahaya yang diemisikan oleh larutan berfluoresensi mempunyai intensitas maksimum pada panjang gelombang yang biasanya 20 nm hingga 30 nm lebih panjang dari panjang gelombang radiasi eksitasi (gelombang pita penyerapan sinar yang membangkitkannya). Pengukuran intensitas fluoresensi dapat dilakukan dengan suatu fluorometer filter sederhana. Instrumen yang dipergunakan bermacam-macam mulai dari yang paling sederhana (filter fluorometer) sampai ke yang sangat kompleks yaitu spektrofotometer.

Komponen-komponen utama dari masing-masing instrument ini yaitu:



Gambar 5. Diagram Optik Fluorometer

Menurut Wanenoor (2010), peralatan pokok spektrofotometer adalah :

- Sumber spektrum yang kontinyu misalnya dari jenis lampu merkuri atau xenon.
- Monokromator (M1) untuk menyinari sampel dengan panjang gelombang tertentu.
- Monokromator kedua (M2) yang pada iradiasi konstan dapat dipakai menentukan panjang gelombang spectrum fluoresensi sampel.

- Detector berupa fotosel yang sangat peka misalnya fotomultiplier merah untuk panjang gelombang lebih besar dari pada 500 nm.
- Amplifier untuk mengandakan radiasi dan meneruskan ke pembacaan.

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



Gambar 6. Alat Spektroflorometri (Perkin; Elmer,1981)

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan utama dan isolat bakteri murni bakteri dekarboksilasi. Bahan utama yang digunakan adalah serbuk histidin murni. Bahan lain yang digunakan adalah biakan murni bakteri didapat dari lingkungan perairan limbah pemukiman yaitu *Acinetobacter* sp. yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Dan bakteri endogenous mangrove yaitu bakteri *Nitrococcus* sp. Media TSB untuk pertumbuhan *Acinetobacter* sp. dan *Nitrococcus* sp., larutan NaCl, aquades, air ledeng, kertas saring, *tissue*, sarung tangan, masker, sabun cair, dan waring.

3.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari peralatan pembiakan bakteri dan peralatan analisa. Peralatan pembiakan dan pengenceran bakteri, antara lain : kulkas, laminar flow, tabung reaksi, rak tabung reaksi bertutup, erlenmeyer, pipet volum, *beaker glass*, timbangan digital, gelas arloji, jarum osse, laminaran, gelas ukur, spatula, bunsen, botol semprot, nampan, inkubator, autoklaf. Peralatan aerasi larutan histidin yang digunakan adalah botol plastik dan seperangkat aerator. Sedangkan untuk pengujian kadar histamin, antara lain: corong dan botol *filtrat* contoh, kertas saring kasar, plastik, karet pengikat; kolom resin 20 cm x 0,8 cm, *reservoir* 2 cm x 5 cm; labu takar 25 ml, 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml; pipet *volumetric*, spektrofotometer, *stirer-plate*, tabung reaksi 5 ml bertutup, timbangan analitis, *waterbath*.

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan yaitu eksperimen. Menurut Surachman (1994), penelitian eksperimen adalah melakukan kegiatan percobaan untuk melihat suatu hasil yang menegaskan hubungan kausal antara variable-variabel yang diselidiki. Ditambahkan oleh Nazir (1998), bahwa secara umum tujuan diadakannya suatu percobaan eksperimen adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat serta seberapa besar hubungan sebab akibat tersebut dengan cara memberikan perlakuan-perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimen dan menyelidiki control untuk perbandingan. Dalam suatu percobaan keadaan tertentu ini sengaja diciptakan atau ditimbulkan yaitu melalui pemberian perlakuan dan pengaturan keadaan lingkungan.

Eksperimen adalah penelitian dilakukan menjadi 2 tahap, yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan yang dilakukan terdiri yaitu mencari lama waktu aerasi yang terbaik dari histidin murni. Penelitian utama adalah untuk mengetahui perlakuan penambahan bakteri dalam larutan histidin murni yang terbaik dan keefektifan dari kadar histamin yang dihasilkan.

3.3.1 Penelitian Pendahuluan

Pada penelitian ini perlakuan yang diberikan adalah lama waktu aerasi yang berbeda. Perlakuan ini terdiri dari 4 level yaitu :

- 1 = lama waktu aerasi 6 jam
- 2 = lama waktu aerasi 12 jam
- 3 = lama waktu aerasi 18 jam
- 4 = lama waktu aerasi 24 jam

Perlakuan dalam penelitian ini yaitu histidin murni dengan penambahan *Acinetobacter* sp. dan *Nitrococcus* sp. masing-masing sebanyak 0,6 ml dan

gabungan antar 2 bakteri tersebut masing-masing sebanyak 0,3 ml. Perlakuan tanpa penambahan bakteri digunakan sebagai kontrol dan merupakan pembandingan da percobaan ini menggunakan tiga kali ulangan. Sedangkan proses penyimpanan selama 24 jam tidak bisa dikatakan sebagai perlakuan, karena digunakan sebagai faktor pengamatan saja.

3.3.1.1 Analisis Uji Histamin

Sampel larutan histidin yang telah diaerasi selama 6 jam, 12 jam, 18 jam, dan 24 jam diuji kadar histaminnya secara kuantitatif menggunakan metode spektrofotometri. Analisis pengujian histamin secara kuantitatif ini menggunakan metode spektrofotometri sesuai SNI 2354. 10 tahun 2009. Dimana menurut Wanenoor (2010), metode spektrofotometri adalah suatu metode pengukuran berdasarkan sinar yang berfluoresensi. Fluoresensi adalah gejala dari suatu molekul setelah radiasi cahaya, melepas kembali radiasi tadi dengan panjang gelombang yang lebih panjang. Fluoresensi akan nampak jelas apabila penyerapan sinar pada daerah ultraviolet dan melepaskannya dalam daerah gelombang nampak.

Prinsip metode pengujian histamin secara spektrofotometri menurut SNI 2354.10:2009, histamin diukur secara fluorometri pada panjang gelombang exitasi 350 nm dan emisi 444 nm. Alat spektrofotometri dapat dilihat pada Gambar 6.

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

Prosedur Analisis

- Timbang ± 10 ml sampel dalam *beaker glass* 250 ml dan tambahkan 50 ml metanol, blender hingga homogen

- Panaskan di atas *waterbath* selama 15 menit pada suhu 60°C dijaga sampel dalam kondisi tertutup, dinginkan hingga suhu kamar.
 - Tuangkan sampel ke dalam labu takar 100 ml dan tepatkan hingga volume labu dengan metanol
 - Saring menggunakan kertas saring dan filtratnya ditampung dalam botol sampel. Pada tahap ini *filtrate* sampel dapat disimpan dalam refrigerator.
- Waterbath* dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Waterbath

Persiapan Resin

- Timbang 3 gr resin untuk setiap kolom dalam *beaker glass* 250 ml
 - Tambahkan 15 ml NaOH 2 N/gr resin untuk mengubah resin menjadi bentuk OH
 - Aduk menggunakan *stirrer-plate* selama 30 menit
 - Tuang cairan pada bagian atas dan ulangi penambahan NaOH 2 N dengan jumlah yang sama
 - Cuci/bilas resin dengan aquades sebanyak 3 kali
 - Saring melalui kertas saring No. 588 atau yang setara dan cuci kembali dengan aquades. Siapkan resin setiap minggu dan simpan dalam aquades.
- Stirrer-plate* dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. *Stirrer-plate*

Persiapan Kolom Resin

- Masukkan *glasswool* ke dalam kolom resin setinggi $\pm 1,5$ cm
- Masukkan resin dalam medium air ke kolom resin setinggi ± 8 cm, pertahankan volume air yang berada di atas resin ± 1 cm, jangan dibiarkan kering. Resin dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Resin

- Letakkan labu takar 50 ml yang sudah berisi 5 ml HCl 1 N di bawah kolom resin guna menampung elusi sampel yang dilewatkan pada kolom resin. *Glasswool* dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Glasswool

Pemurnian Sampel

- Pipet 1 ml *filtrate* contoh , masukkan dalam kolom resin, kran kolom resin dalam posisi terbuka biarkan aliran menetes (hasil elusi) ditampung dalam labu takar 50 ml
- Tambahkan aquades pada saat tinggi cairan ± 1 cm di atas resin dan biarkan cairan terelusi. Lakukan seterusnya hingga hasil elusi dalam labu takar tepat 50 ml. Hasil elusi (contoh) dapat disimpan dalam refrigerator

Pembentukan Senyawa Turunan (derivatisasi)

- Siapkan tabung reaksi 50 ml masing-masing untuk contoh, standar dan blanko.
- Pipet masing-masing 5 ml *filtrate* contoh, larutan standar kerja dan blanko (HCl 0,1 N)
- Tambahkan ke dalam tabung reaksi diatas berturut-turut :
 - 10 ml HCl 0,1 N, kocok
 - 3 ml NaOH 1 N, kocok, dalam waktu 5 menit harus sudah ditambah 1 ml OPT 0,1% kocok dan biarkan selama 4 menit
 - 3 ml H_3PO_4 3,57 N, kocok

Lakukan pengukuran *fluorescence* terhadap sampel, standar dan blanko sesegera mungkin dengan alat spektrofлуorometer pada panjang gelombang exitasi : 350 nm dan emisi : 444 nm dalam jangka waktu 90 menit.

Perhitungan

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

$$y = a + bx$$

keterangan :

y = fluoresensi sampel;

a = intersep;

b = slope;

x = konsentrasi sampel yang akan dihitung

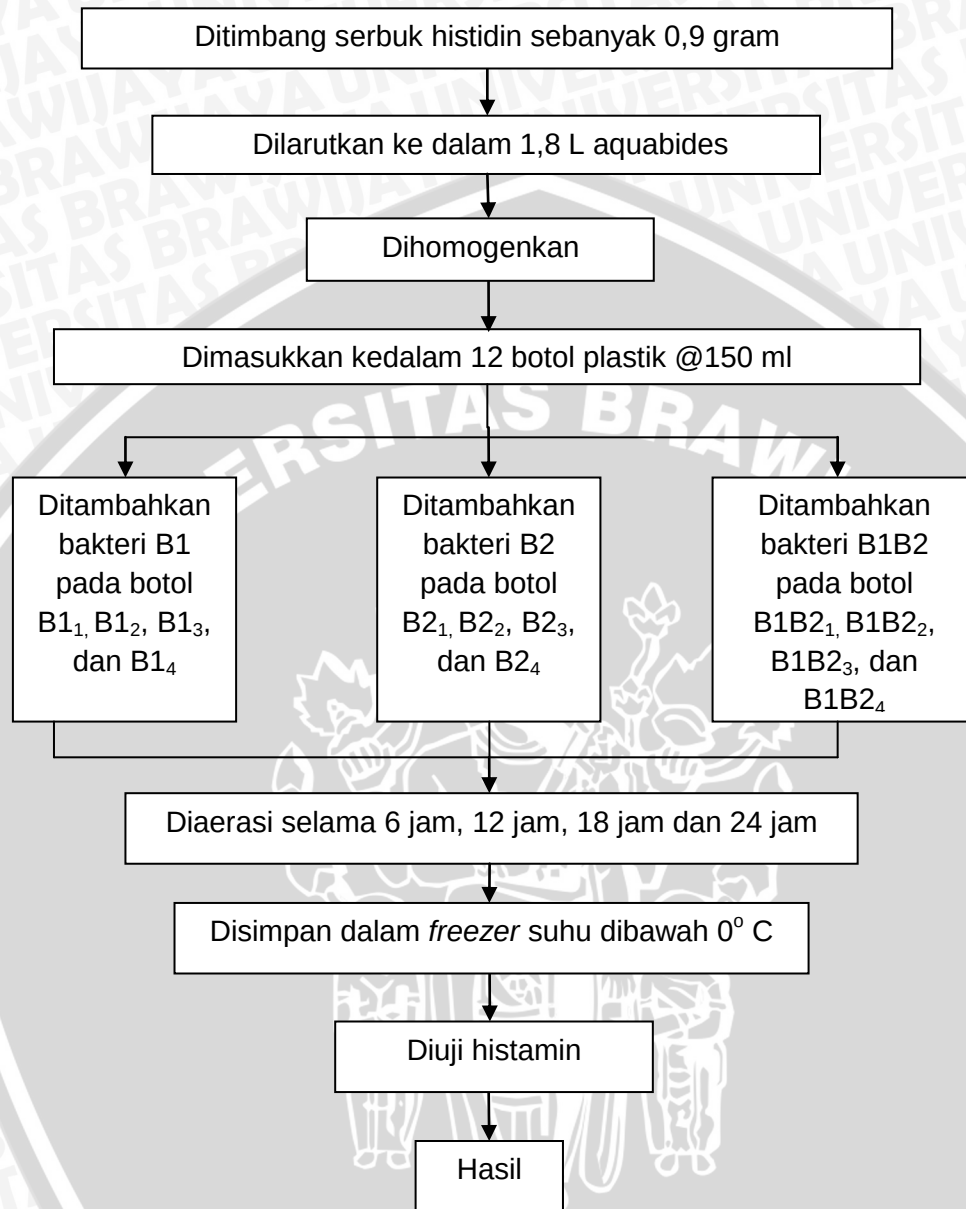
- Setelah didapat harga x , kalikan dengan faktor pengenceran dan kembalikan ke berat sampel. Nyatakan kandungan histamin dalam ($\mu\text{g/g}$) atau mg/kg sampel.
- Konsentrasi histamin ($\mu\text{g/g}$) sampel = $A \times \frac{(\text{volume akhir (ml)} \times \text{fp})}{\text{gram contoh}}$

Keterangan :

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

3.3.1.2 Prosedur Penelitian

Secara garis besar penelitian pendahuluan tahap dapat dilihat pada Gambar 11 dibawah ini.

Gambar 11. Skema Kerja Aerasi Histidin Murni

Keterangan :

B1 = *Acinetobacter* sp.

B2 = *Nitrococcus* sp.

1 = Perlakuan 6 jam

2 = Perlakuan 12 jam

3 = Perlakuan 18 jam

4 = Perlakuan 24 jam

3.3.2 Penelitian Utama

Penelitian utama ini bertujuan untuk mengetahui perlakuan penambahan bakteri dalam larutan histidin murni yang terbaik dan keefektifan dari kadar histamin yang dihasilkan. Penelitian utama ini merupakan lanjutan dari penelitian pendahuluan tentang penambahan bakteri dalam larutan histidin. Berdasarkan penelitian pendahuluan didapatkan hasil bahwa perlakuan lama waktu aerasi yang akan dilakukan pada penelitian utama adalah 6 jam, 12 jam, 18 jam, dan 24 jam. Sedangkan penambahan bakteri yang digunakan, yakni penambahan bakteri *Acinetobacter* sp. dan *Nitrococcus* sp. serta, gabungan antar kedua bakteri tersebut.

Metode penelitian ini menggunakan uji t tidak berpasangan dengan 3 kali ulangan. Menurut Muhammad (1992), uji t digunakan untuk membedakan 2 macam perlakuan, yaitu apabila n kurang dari 30. Dalam menentukan kriteria perbedaan tersebut kita menggunakan hipotesa sebagai berikut :

$$H_0 : H_1 = U_2 \text{ lawan } H_1 : U_1 \neq U_2$$

Perlakuan dalam penelitian ini yaitu histidin murni dengan penambahan *Acinetobacter* sp. dan *Nitrococcus* sp. masing-masing sebanyak 0,6 ml dan gabungan antar 2 bakteri tersebut masing-masing sebanyak 0,3 ml. Perlakuan tanpa penambahan bakteri digunakan sebagai kontrol dan merupakan pembanding dan percobaan ini menggunakan tiga kali ulangan. Sedangkan proses penyimpanan selama 24 jam tidak bisa dikatakan sebagai perlakuan, karena digunakan sebagai faktor pengamatan saja.

Analisa data pada penelitian ini menggunakan uji t tidak berpasangan :

$$JK(A) = \sum X_A^2 - \frac{(\sum XB)^2}{n}$$

$$JK (B) = \sum X_B^2 - \frac{(\sum XA)^2}{n}$$

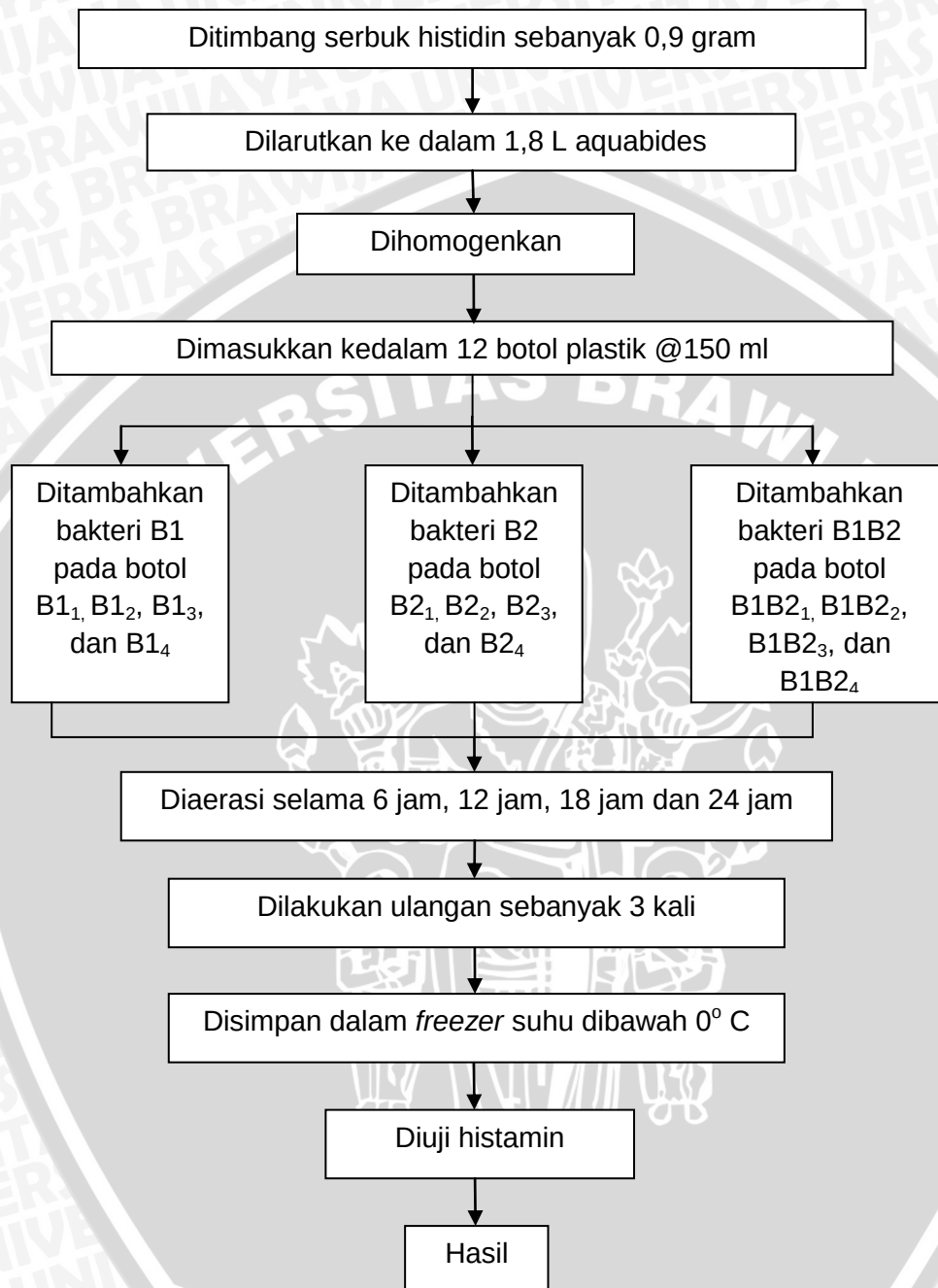
$$t \text{ hitung} = |A - B| \sqrt{\frac{n(n-1)}{JKA - JKB}}$$

Membandingkan t hitung dengan t tabel :

- Tingkat t hitung > t 5%, tetapi lebih kecil dari t 1%, maka perbedaan tersebut dinyatakan nyata; artinya 95% dari perbedaan yang terjadi memang benar, sedangkan yang 5% karena pengaruh kebetulan.
- Jika t hitung > t 1%, maka dikatakan bahwa perbedaan yang terjadi memang benar, sedangkan yang 1% karena pengaruh kebetulan.
- Jika t hitung < t 5%, maka dikatakan bahwa perbedaan tersebut tidak nyata, karena lebih dari 5% pengaruh kebetulan.

3.3.2.1 Prosedur Penelitian

Secara garis besar prosedur penelitian utama dapat dilihat pada Gambar 12 dibawah ini adapun analisa yang digunakan, yakni analisa uji histamin dengan menggunakan metode spektrofotometri.

Gambar 12. Skema Kerja Aerasi Larutan Histidin Murni Dengan Ulangan

Keterangan :

B1 = *Acinetobacter* sp.

B2 = *Nitrococcus* sp.

1 = Perlakuan 6 jam

2 = Perlakuan 12 jam

3 = Perlakuan 18 jam

4 = Perlakuan 24 jam

3.3.2.2 Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian tahap ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) yang disusun secara faktorial dengan tiga kali ulangan. Pemilihan rancangan tersebut berdasarkan pada materi penelitian dan faktor yang mempengaruhinya. RAL digunakan karena factor yang menjadi perlakuan dianggap homogen (Sugandi dan Sugiarto, 1994). Menurut Hanafiah (1995) percobaan faktorial mempunyai beberapa keuntungan jika dibandingkan dengan percobaan tunggal yaitu :

1. Oleh karena percobaan faktorial seolah-olah merangkum beberapa percobaan faktor tunggal sekaligus, maka percobaan faktorial akan lebih efektif dan efisien waktu, bahan, alat, tenaga kerja dan modal yang tersedia dalam mencapai semua sasaran percobaan-percobaan faktor tunggal sekaligus.
2. Adanya ulangan pada setiap perlakuan A atau B dan pada AB. Hal ini jelas akan meningkatkan derajat ketelitian pengamatan terhadap pengaruh-pengaruh faktor perlakuan dalam percobaan.
3. Jika pada percobaan faktor tunggal tidak akan diketahui bagaimana pengaruh faktor-faktor utama yang dikombinasikan, maka dalam percobaan faktorial akan diketahui pengaruh bersama (interaksi) terhadap data hasil percobaan.

Adapun denah rancangan percobaan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rancangan percobaan bentuk RAL factorial

Perlakuan		Ulangan		
Bakteri 0,4 % (B)	Lama Aerasi (jam) (P)	1	2	3
B1	P1	B1P1	B1P1	B1P1
	P2	B1P2	B1P2	B1P2
	P3	B1P3	B1P3	B1P3
	P4	B1P4	B1P4	B1P4
B2	P1	B2P1	B2P1	B2P1
	P2	B2P2	B2P2	B2P2
	P3	B2P3	B2P3	B2P3
	P4	B2P4	B2P4	B2P4
B3	P1	B3P1	B3P1	B3P1
	P2	B3P2	B3P2	B3P2
	P3	B3P3	B3P3	B3P3
	P4	B3P4	B3P4	B3P4

Keterangan :

- P (1, 2, 3) = Jenis bakteri yang digunakan dengan penambahan sebanyak 0,4% (ml)
- P (1, 2, 3, 4) = Lama aerasi 6 jam, 12 jam, 18 jam, dan 24 jam

Model matematika yang digunakan pada penelitian tahap ini adalah sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Dimana :

Y_{ijk} = hasil pengamatan perlakuan ke-1 dan ulangan ke-...

μ = nilai rata-rata umum

α_i = pengaruh faktor perlakuan utama

β_j = pengaruh faktor perlakuan kedua

$(\alpha\beta)_{ij}$ = pengaruh interaksi perlakuan pertama dan kedua

ε_{ijk} = kesalahan percobaan

Hasil dari analisa dilanjutkan dengan analisa sidik ragam (ANOVA).

Bentuk analisa sidik ragam dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Tabel sidik ragam pada rancangan acak legkap (RAL) faktorial

Sumber keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
Ulangan						
Perlakuan						
Galat						
Jumlah						

Jika hasil analisa sidik ragam menunjukkan hasil yang nyata atau sangat nyata, maka dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT). Uji BNT dapat dilakukan dengan rumus :

$$BNT = t_{\alpha/2} \times Sd$$

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Penelitian Tahap I (Pembiakan Bakteri)

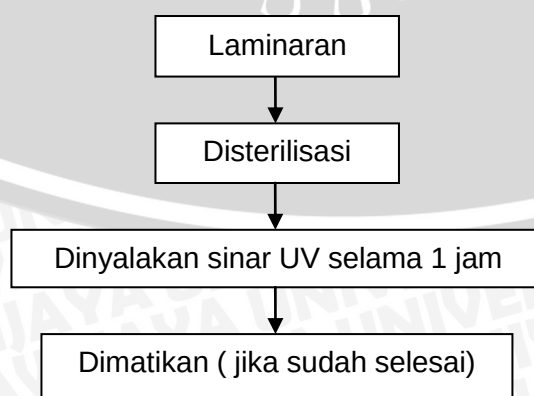
Sebelum melakukan pembiakan bakteri terlebih dahulu dilakukan sterilisasi alat. Sterilisasi adalah suatu proses penguapan yang digunakan untuk beberapa produk dalam situasi dimana produk-produk tersebut terhindar dari infeksi (Dart, 2003). Karena stabilitas panas dari bakteri yang tidak bisa dihilangkan dengan cara direbus, sterilisasi menggunakan uap panas dilakukan

pada suhu dan tekanan yang tinggi di dalam autoklaf. Mesin ini beroperasi pada suhu 121°C dan dapat membunuh mikroba (Nicklin *et.,al*, 1999). Selain itu alat yang harus disterilkan yaitu laminaran, dengan cara menyemprot bagian dalamnya dengan cairan aseptis (alkohol 70%), kemudian dikeringkan semua bagiannya menggunakan serbet bersih agar aseptis, ditutup kaca laminaran dan menekan tombol UV untuk menghidupkan sinar UV pada alat yang berfungsi sebagai pensteril laminaran selama 1 jam. Sambil menunggu laminaran selesai disterilkan, kemudian membuat larutan untuk perkembangbiakan bakteri *endogenous* limbah *Acinetobacter* sp. dan *endogenous* mangrove *Nitrococcus* sp. yaitu media TSB. Pertama yaitu menimbang media TSB sebanyak 18 gram menggunakan timbangan digital. Kemudian media TSB dimasukkan kedalam beaker glass 1000 ml dan diberi aquadest sebanyak 600 ml, lalu diaduk dengan spatula sampai homogen. Kemudian didapatkan media cair, lalu dimasukkan kedalam erlenmeyer, masing-masing erlenmeyer sebanyak 100 ml media cair. Setelah itu disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit dengan tujuan menghilangkan kontaminan yang ada pada media. Setelah disterilisasi, media cair didiamkan sampai dingin agar botol tidak pecah ketika diberi perlakuan lebih lanjut.

Setelah 1 jam, sinar UV pada laminaran dimatikan lalu lampu laminaran dinyalakan untuk memudahkan penglihatan pada saat penanaman bakteri. Laminaran bagian dalam disemprot dengan alkohol agar aseptis. kemudian tangan yang telah dipasang dengan sarung tangan disemprot juga agar tidak ada kontaminasi saat penanaman bakteri. Kemudian bunsen dinyalakan dan diletakkan ke dalam laminaran beserta isolat murni bakteri *Acinotobacter* sp. dan *Nitrococcus* sp. dan media cair yang diletakkan di rak tabung reaksi. Lalu ose pada bagian ujungnya disemprot dengan alkohol dan dipanaskan diatas bunsen sampai osse menyala. Hal tersebut dilakukan untuk menghindari kontaminasi

alat pada saat penanaman bakteri. Kemudian diambil sampel bakteri yang akan dibiakkan, dibuka tutup tabung sambil dipanaskan diatas bunsen untuk menjaga kondisi tetap aseptis. Ose disentuhkan di media isolat bakteri untuk mengurangi panas dari ose sehingga bakteri yang diambil tidak mati. Selanjutnya yaitu mengambil sebanyak 1 ose bakteri dengan cara menggores isolat dan dimasukkan kedalam media cair baru yang telah disiapkan (ose dimasukkan di permukaan saja agar tidak terjadi kontaminasi, karena hanya bagian ujung ose yang disterilkan). Bakteri yang telah diinokulasi pada media baru, dipanaskan lagi diatas bunsen bagian permukaan erlenmeyer dan segera ditutup. Ose dipanaskan diatas bunsen lagi bagian ujungnya agar kembali steril saat digunakan untuk membiakkan bakteri yang lain. Erlenmeyer dihomogenkan agar bakteri dapat bercampur dengan media, setelah itu diinkubator dalam suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubator, dilihat ada atau tidak endapan pada media, jika terdapat endapan berarti pembiakan telah berhasil dilakukan. Tabung reaksi diberi label nama bakteri yang telah dibiakkan agar tidak terjadi kesalahan pada saat pengamatan perlakuan. Prosedur kerja sterilisasi alat, pembuatan media cair dan peremajaan bakteri dapat dilihat pada Gambar 13, 14, dan 15 :

Gambar 13. Prosedur Kerja Sterilisasi Alat



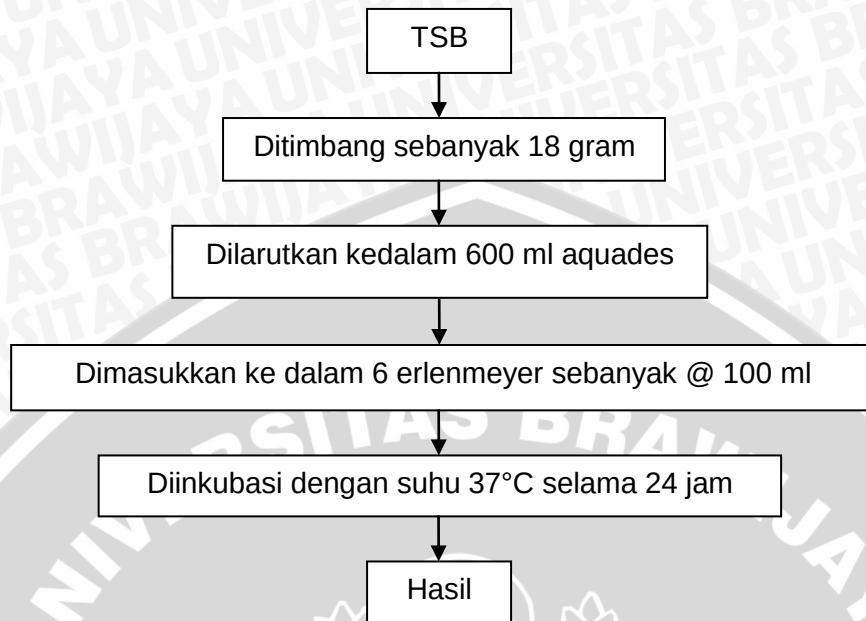
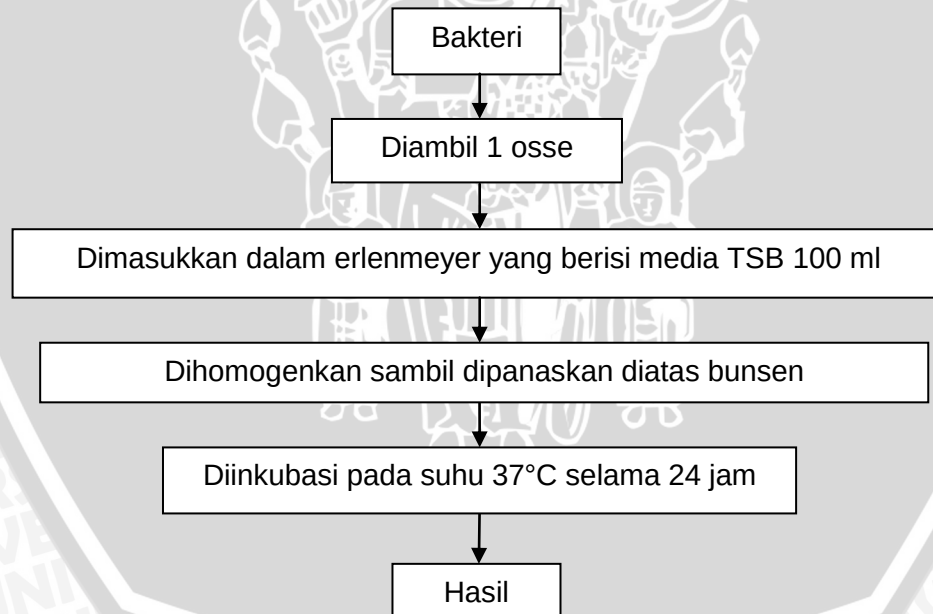
3.4.2 Pembuatan Media TSB (Tryptone Soya Broth)

Tryptone Soya Broth merupakan media cair yang digunakan dalam penelitian ini pada tahap identifikasi dan pengamatan fase pertumbuhan bakteri simbion. Bakteri yang didapatkan dari hasil identifikasi dimasukkan kedalam media TSB kemudian dilakukan pengamatan fase-fase pertumbuhan bakteri sehingga diketahui pada jam ke berapakah bakteri tersebut memasuki fase eksponensial.

Tabel 3. Komposisi TSB per liter

Formula	Gram per Liter
Pandreatic Digest of Casein	17
Papaic Digest of Soybean Meal	3
Sodium Chloride	5
Dibasic Potassium phosphate	2,5
Dextrose	2,5

Prosedur pembuatan media TSB hampir sama dengan prosedur pembuatan media pada umumnya. Adapun langkah-langkah dalam pembuatan media TSB yang pertama adalah menimbang bubuk media TSB, kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 1 L, kemudian ditambahkan dengan 600 ml aquades sambil dihomogenkan dan di masukkan ke dalam 6 erlenmeyer masing-masing diisi sebanyak 100 ml, kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.

Gambar 14. Prosedur Kerja Pembuatan Media Cair**Gambar 15. Prosedur Kerja Peremajaan Bakteri**

3.4.3 Penelitian Tahap II (Pengenceran Bakteri)

Dalam melakukan pengenceran dan penanaman, kondisi lingkungan di sekitarnya harus aseptis agar mikroorganisme yang tumbuh nantinya benar-

benar mikroorganisme yang berasal dari sampel yang diuji. Adapun cara pengkondisian aseptis adalah dengan menyalakan bunsen dan menyemprotkan alkohol. Agar tidak tertukar maka setiap tabung reaksi diberi tanda menggunakan label.

Laminaran yang akan digunakan sebagai tempat pembiakan bakteri disterilkan dengan cara menyemprot bagian dalamnya dengan cairan aseptis (alkohol 70%), kemudian di lap semua bagiannya menggunakan serbet bersih agar aseptis, ditutup kaca laminaran dan menekan tombol UV untuk menghidupkan sinar UV pada alat yang berfungsi sebagai pensteril laminaran selama 1 jam. Langkah pertama yang dilakukan adalah membuat larutan pengenceran yaitu dengan menimbang serbuk NaCl menggunakan timbangan digital sebanyak 1,944 gram. Kemudian NaCl dimasukkan ke dalam beaker glass 500 ml dan diberi aquades sebanyak 216 ml, lalu di aduk hingga homogen menggunakan spatula. Media cair tersebut dimasukkan kedalam 24 tabung reaksi bertutup, masing-masing tabung diberi sebanyak 9 ml. Tabung reaksi bertutup yang berisi media cair disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit dengan tujuan menghilangkan kontaminan yang ada pada media. Setelah disterilisasi, media cair didiamkan sampai dingin agar botol tidak pecah ketika diberi perlakuan lebih lanjut. Karena pengenceran dilakukan sampai 10^{-6} dari 2 bakteri (*Acinotobacter* sp. dan *Nitrococcus* sp.).

Sinar UV pada laminaran dimatikan setelah 1 jam, dan lampu pada laminaran dinyalakan untuk memudahkan penglihatan pada saat pengenceran bakteri. Bagian dalam laminaran disemprot dengan cairan aseptis, kemudian tangan yang telah dipasang sarung tangan disemprot juga agar tidak ada kontaminasi saat penanaman bakteri. Bunsen yang telah dinyalakan diletakkan ke dalam laminaran beserta isolat murni bakteri yang sudah diremajakan yaitu :

Acinotebacter sp. dan *Nitrococcus* sp. dan media cair pengenceran yang ditaruh di rak tabung reaksi. Pipet volume 1 ml pada bagian ujungnya disemprot dengan cairan aseptis dan dipanaskan diatas bunsen. Hal tersebut dilakukan untuk menghindari kontaminasi alat pada saat penanaman bakteri. Diambil sampel bakteri yang sudah diremajakan sebanyak 1 ml dengan menggunakan pipet volume, kemudian dibuka tutup tabung media cair pengenceran sambil dipanaskan diatas bunsen untuk menjaga kesterilan / kondisi tetap aseptis dan 1 ml bakteri tersebut di masukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml NaCl sebagai larutan pengencer yang bersifat isotonis (pengenceran 10^{-1}) dan di homogenkan tabung agar tercampur rata setelah itu di lakukan pengeceran bertingkat yang bertujuan untuk mengurangi kepadatan mikroba ,adapun cara melakukan pengeceran bertingkat adalah dengan mengambil sebanyak 1 ml larutan pada tabung reaksi 10^{-1} menggunakan pipet volume yang sebelumnya telah di sterilisasi di atas bunsen. Larutan yang di ambil dari tabung reaksi 10^{-1} tersebut lalu di masukan pada tabung reaksi 10^{-2} dan di homogenkan. Pengenceran di lakukan sampai 10^{-6} dengan cara yang sama seperti pengenceran sebelumnya. Dalam melakukan pengenceran kita juga dapat menggunakan rumus : $N_1.V_1 = N_2.V_2$

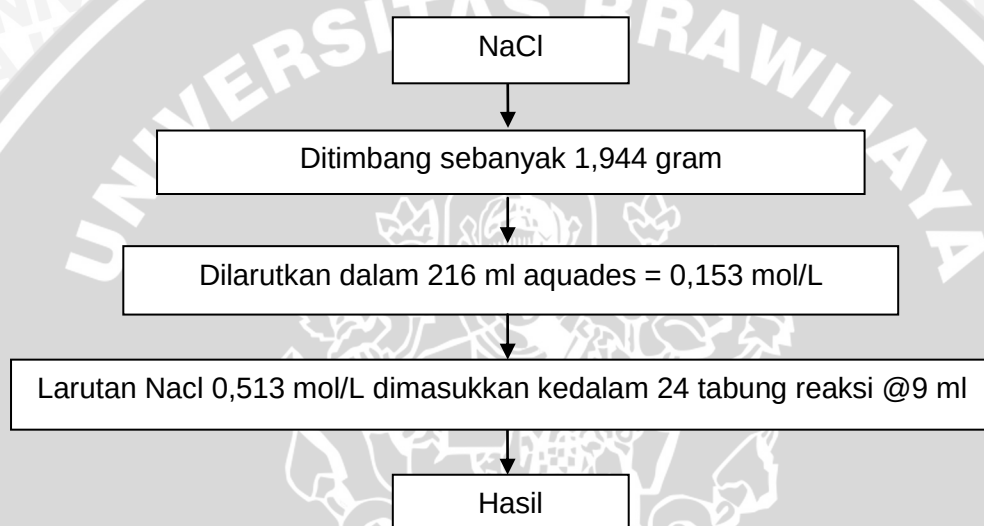
Tujuan dari pengenceran adalah untuk mengurangi kepadatan mikroba yang akan ditanam. Menurut Fardiaz (1993), bahan pangan yang diperkirakan mengandung lebih dari 300 sel mikroba pada per ml, per gram atau per cm permukaan memerlukan perlakuan pengenceran sebelum ditumbuhkan pada medium agar didalam cawan petri, sehingga setelah inkubasi akan terbentuk koloni dalam cawan petri, sehingga stelah inkubasi akan terbentuk koloni dalam jumlah yang dapat dihitung.

Proses pengenceran adalah mencapai larutan pekat (konsentrasi tinggi) dengan cara menambahkan pelarut agar diperoleh volume akhir yang lebih

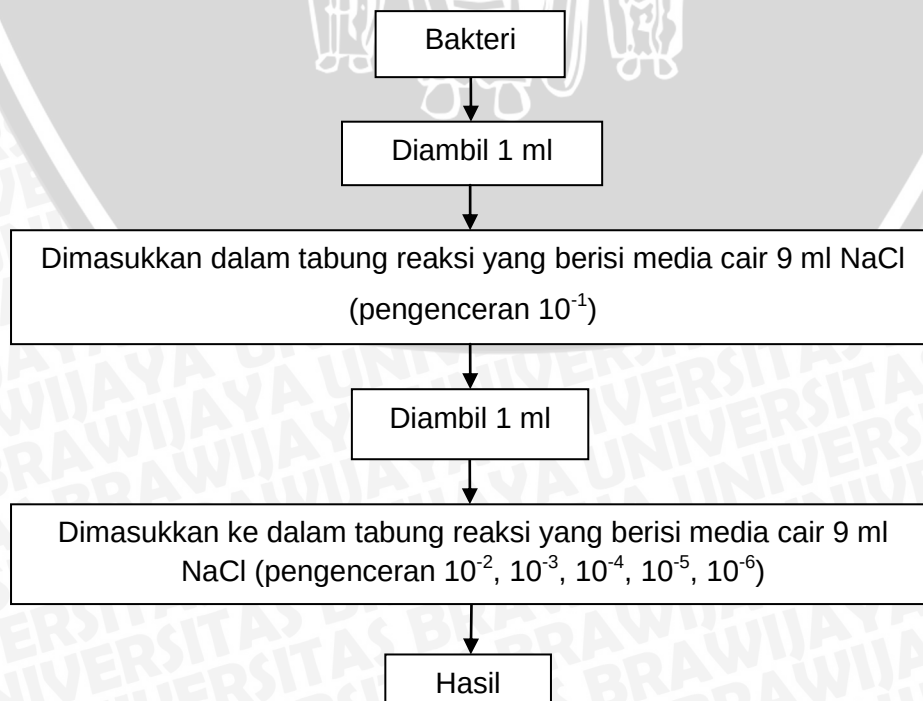
besar (Brady, 1999). Menurut Dwijosaputro (1989) tujuan dari pengenceran adalah untuk mendapatkan satu koloni murni dan selanjutnya koloni yang didapat kita jadikan piaraan murni.

Prosedur kerja pembuatan larutan pengenceran dan pengenceran bakteri dapat dilihat pada Gambar 16 dan 17.

Gambar 16. Prosedur Kerja Pembuatan Larutan Pengenceran



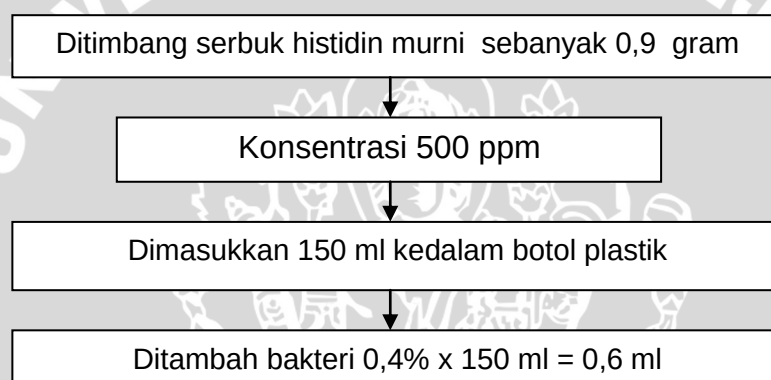
Gambar 17. Prosedur Kerja Pengenceran Bakteri



3.4.4 Penelitian Tahap III (Pembuatan Larutan Histidin)

Pada proses pembuatan histidin ini digunakan konsentrasi 500 ppm, langkah awal yang dilakukan adalah serbuk histidin di masukkan ke dalam botol plastik yang dilarutkan dengan aquabides sebanyak 150 ml, dan kemudian ditambahkan sebanyak 0,6 ml. pada tahapan ini alasan menggunakan aquabides dikarenakan aquabides lebih murni dari pada aquades. Proses ini dapat dilihat pada Gambar 18.

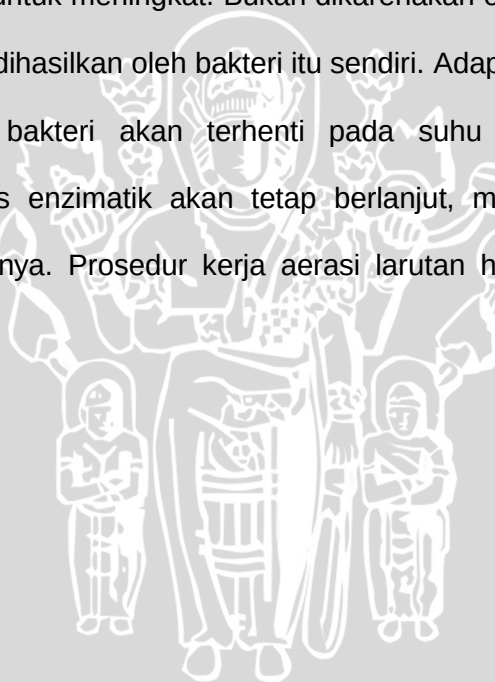
Gambar 18. Proses Pembuatan Histidin



3.4.5 Penelitian Tahap IV (Aerasi)

Tahap awal yang dilakukan adalah larutan histidin dimasukkan kedalam 12 botol plastik masing-masing diisi 150 ml larutan histidin. Botol-botol plastik tadi kemudian diaerasi menggunakan aerator untuk pengkondisian oksigen di dalam botol agar dapat hidup. Kemudian dimasukkan dari 2 jenis bakteri yang berbeda ke dalam masing-masing botol plastik yang berisi larutan histidin tersebut. Konsentrasi bakteri yang digunakan, yakni sebesar 0,4% dari jumlah larutan histidin yang digunakan. Berdasarkan penelitian sebelumnya bahwa konsentrasi 0,4% lebih efektif. Bakteri *Nitrococcus* sp. sebanyak 0,6 ml dimasukkan kedalam botol plastik B1. Bakteri *Acinetobacter* sp. sebanyak 0,6 ml dimasukkan kedalam botol plastik B2. Tahap selanjutnya dari bakteri *Nitrococcus* sp. dan

Acinetobacter sp. tadi dikombinasi masing-masing sebanyak 0,2 ml dimasukkan kedalam botol plastik yang diberi tanda B1+B2. Larutan histidin yang telah ditambah kemudian diaerasi selama 6 jam pertama yang diberi tanda B1₁ (untuk bakteri *Nitrococcus* sp.), B2₁ (untuk bakteri *Acinetobacter* sp.), dan B1B2₁ (untuk kombinasi bakteri *Nitrococcus* sp. dan *Acinetobacter* sp.). Perlakuan tersebut berlaku juga untuk perlakuan waktu 12 jam, 18 jam, dan 24 jam. Setiap selesai perlakuan, botol disimpan di *freezer* dengan suhu dibawah 0°C dengan tujuan untuk mengamankan histamin yang terbentuk agar tidak meningkat. Menurut Mahendradatta dan Langkong (2003), histamin yang disimpan pada suhu 0°C memiliki kemungkinan untuk meningkat. Bukan dikarenakan oleh aktivitas bakteri melainkan enzim yang dihasilkan oleh bakteri itu sendiri. Adapun menurut Ahmed (1991), pertumbuhan bakteri akan terhenti pada suhu rendah dari 5°C, bagaimanapun aktivitas enzimatik akan tetap berlanjut, menghasilkan dalam produksi amin selanjutnya. Prosedur kerja aerasi larutan histidin dapat dilihat pada Gambar 12.



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

4.1.1 Penelitian Pendahuluan

Tujuan untuk mengetahui lama waktu aerasi yang berbeda dan mencari perlakuan terbaik dari penguraian histidin murni terhadap kadar histamin. Hasil dari penelitian ini merupakan dasar untuk penelitian utama. Parameter uji yang dilakukan pada penelitian tahap ini adalah uji histamin dengan menggunakan metode spektrofotometri. Hasil penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Kadar histamin dari penguraian histidin murni

No	Kode Sampel	Perlakuan			
		6 jam (mg/kg)	12 jam (mg/kg)	18 jam (mg/kg)	24 jam (mg/kg)
1.	Kontrol	0,05			
2.	B1	0,12	1,19	33,55	0,23
3.	B2	6,18	8,68	0,31	4,21
4.	B12	2,89	6,90	3,26	2,43

Keterangan :

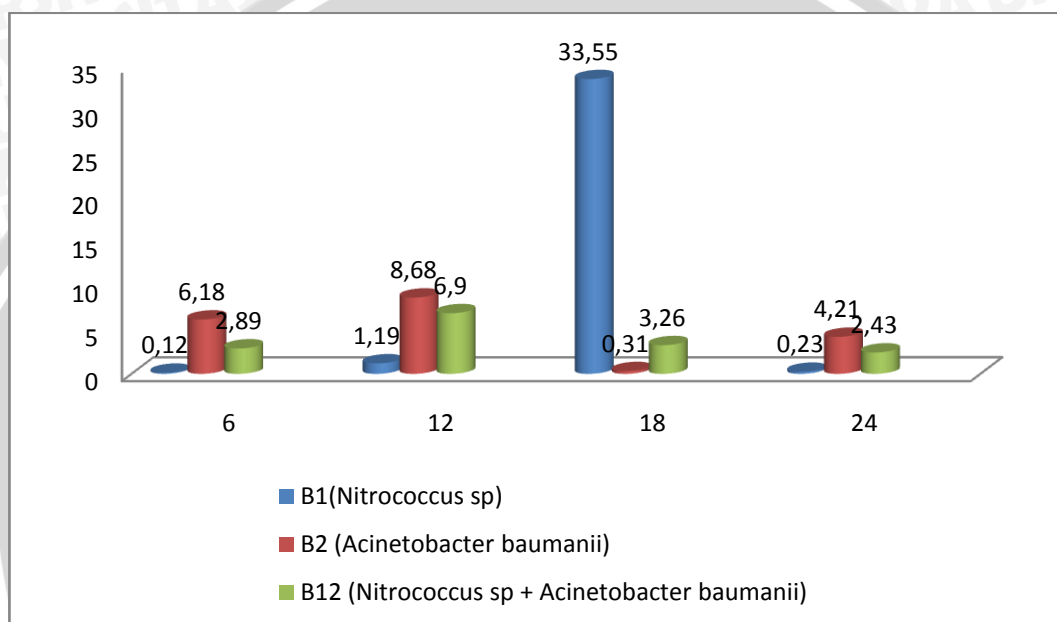
Bakteri B1 = *Nitrococcus* sp.

Bakteri B2 = *Acinetobacter* sp.

Berdasarkan pengujian histamin pada Tabel 4 menggunakan metode spektrofotometri secara kuantitatif, perlakuan histidin murni ditambah bakteri B1 didapat hasilnya berdasarkan lamanya waktu yang digunakan selama 6, 12, 18 dan 24 jam yaitu kontrol awal sebanyak 0,05 mg/kg mengalami kenaikan sebanyak 0,12 mg/kg; 1,19; 33,55 mg/kg; 0,23 mg/kg. untuk penambahan bakteri B2 kadar histamin yang semula 0,05 mg/kg mengalami kenaikan sebanyak 6,18 mg/kg; 8,68 mg/kg; 0,31 mg/kg; 4,21 mg/kg. Sedangkan campuran antara B1

dan B2 sebanyak 2,89 mg/kg; 6,90 mg/kg; 3,26 mg/kg; 2,43 mg/kg. Dari hasil diatas dapat disimpulkan secara garis besar bahwa bakteri *Nitrococcus* sp. dan *Acinetobacter* sp. tidak dapat menurunkan kadar histamin melainkan menaikkan kadar histamin.

Grafik kadar histamin dari penguraian histidin murni dapat dilihat pada Gambar 19.



Gambar 19. Grafik hasil kadar histamin dari histidin murni

Menurut Bennour *et al.*, (1991), produksi histamin tidak selalu berkorelasi dengan besarnya jumlah bakteri penghasil histamin, tetapi lebih berkaitan dengan kemampuan bakteri tersebut mensintesis histidin dekarboksilase. Menurut Fletcher *et al.*, (1998), yang menyatakan bahwa tidak terdapat hubungan yang konsisten antara jumlah bakteri penghasil histamin dengan kadar histamin yang dihasilkan pada beberapa sampel ikan asap dipasar ikan Auckland.

4.2 Penelitian Utama

Hasil dari penelitian ini merupakan hasil dari penelitian pendahuluan tahap II. Analisis yang dilakukan pada penelitian ini yaitu analisis uji histamin yang diberikan perlakuan waktu seperti penelitian pendahuluan II tetapi dalam penelitian dilakukan ulangan sebanyak 3 kali. Hasil keseluruhan dari penelitian tahap ini dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil penelitian utama

Perlakuan		Ulangan (mg/kg histamin)		
Bakteri 0,4 % (B)	Lama Aerasi (jam) (P)	1	2	3
B1	P1	0,12	0,24	0,24
	P2	1,19	1,29	1,29
	P3	33,55	34,22	34,22
	P4	0,23	0,36	0,36
B2	P1	6,18	5,28	5,28
	P2	8,68	8,05	8,05
	P3	0,31	0,50	0,50
	P4	4,21	4,66	4,66
B3	P1	2,89	2,28	2,28
	P2	6,90	6,15	6,15
	P3	3,26	3,74	3,74
	P4	2,43	2,25	2,25

Keterangan :

B1P1 : Aerasi selama 6 jam dengan penambahan bakteri *Nitrococcus* sp.

B1P2 : Aerasi selama 12 jam dengan penambahan bakteri *Nitrococcus* sp.

B1P3 : Aerasi selama 18 jam dengan penambahan bakteri *Nitrococcus* sp.

B1P4 : Aerasi selama 24 jam dengan penambahan bakteri *Nitrococcus* sp.

B2P1 : Aerasi selama 6 jam dengan penambahan bakteri *Acinetobacter* sp.

B2P2 : Aerasi selama 12 jam dengan penambahan bakteri *Acinetobacter* sp.

B2P3 : Aerasi selama 18 jam dengan penambahan bakteri *Acinetobacter* sp.

B2P4 : Aerasi selama 24 jam dengan penambahan bakteri *Acinetobacter* sp.

B3P1 : Aerasi selama 6 jam dengan penambahan kombinasi dari kedua bakteri

B3P2 : Aerasi selama 12 jam dengan penambahan kombinasi dari kedua bakteri

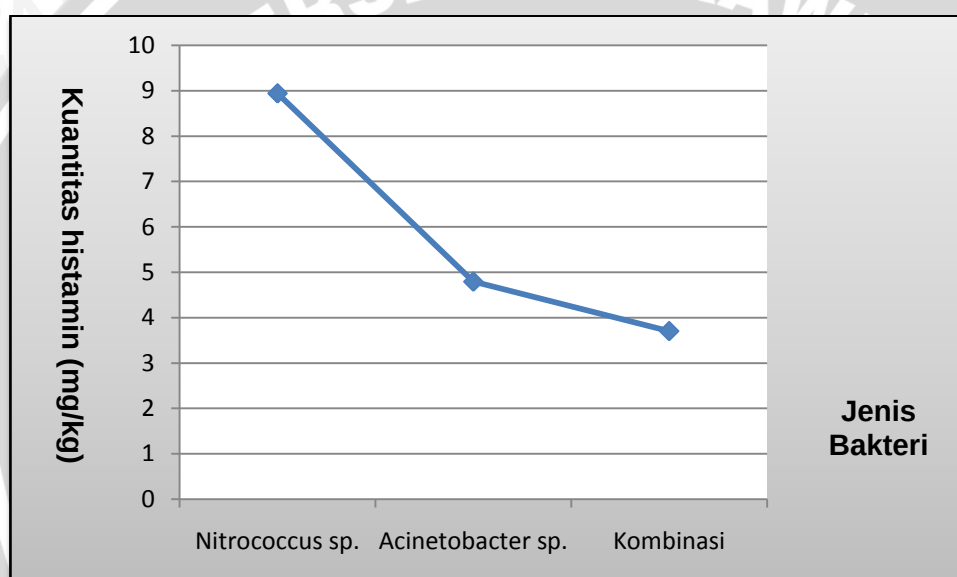
B3P3 : Aerasi selama 18 jam dengan penambahan kombinasi dari kedua bakteri

B3P4 : Aerasi selama 24 jam dengan penambahan kombinasi dari kedua bakteri

Berdasarkan hasil analisis uji histamin metode spektrofotometri pengaruh penambahan bakteri *Nitrococcus* sp., dan *Acinetobacter* sp. dalam larutan histidin murni dan lama aerasi serta interaksi antara kedua perlakuan tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap kadar histamin yang dihasilkan ($\alpha = 5\%$).

4.2.1 Pengaruh Penambahan Bakteri Terhadap Kadar Histamin

Pengaruh penambahan bakteri terhadap kadar histamin yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 20.



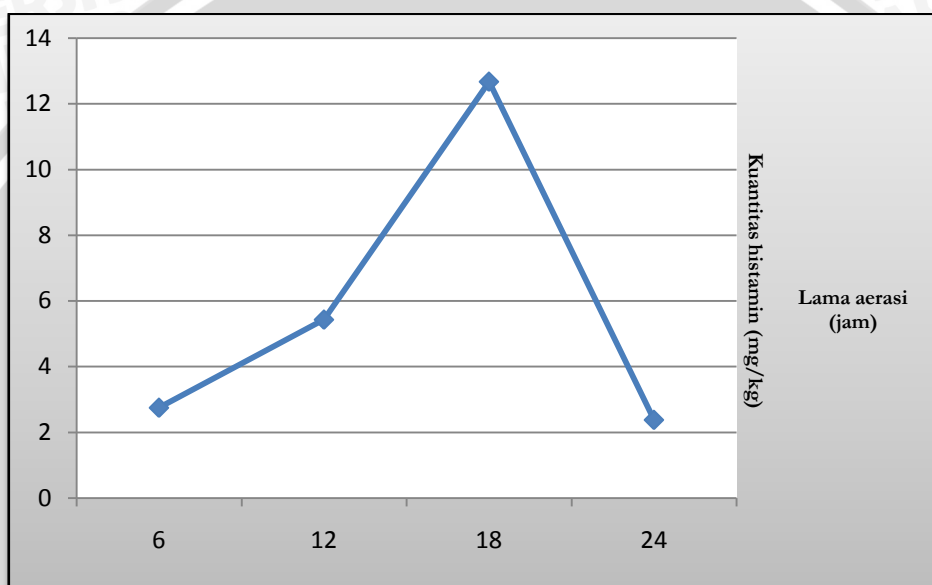
Gambar 20. Grafik pengaruh jenis bakteri terhadap kadar histamin

Berdasarkan grafik diatas dapat dilihat bahwa ada perbedaan tingkat kemampuan bakteri dalam menghasilkan histamin terhadap penguraian histidin murni. Bakteri yang memiliki kemampuan dalam menguraikan histidin menjadi histamin adalah bakteri *Nitrococcus* sp. yang memiliki tingkatan pertama dalam menghasilkan histamin. Sedangkan kombinasi dari kedua bakteri tersebut terdapat pada tingkatan yang terakhir. Hal ini dikarenakan dalam kombinasi kedua bakteri tersebut terjadi kompetisi antar kedua bakteri yang menyebabkan kadar histamin yang dihasilkan lebih rendah. Menurut Yamanaka *et al.*, (1987)

dalam Mahendradatta (2003), bahwa histamin dapat diproduksi oleh histidin dekarboksilase meskipun bakteri sangat sedikit.

4.2.2 Pengaruh Lama Aerasi Terhadap Kadar Histamin Yang Dihasilkan

Pengaruh lama aerasi terhadap kadar histamin yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 21.



Gambar 21. Grafik pengaruh lama aerasi terhadap kadar histamin

Berdasarkan grafik diatas dapat dilihat bahwa ada perbedaan tingkat lama aerasi dalam menghasilkan histamin terhadap penguraian histidin murni. Jadi dapat disimpulkan bahwa kadar histamin yang tertinggi terdapat pada perlakuan 18 jam, sedangkan kadar histamin yang terendah terdapat pada perlakuan 24 jam. Jadi dari perlakuan waktu yang mampu menghasilkan histamin lebih besar yakni pada perlakuan waktu 18 jam. Menurut Sumner *et al.*, (2004), histamin adalah senyawa amina biogenik yang terbentuk dari asam amino histidin akibat reaksi dengan enzim dekarboksilase. Sedangkan Baranowski *et al.*, (1985), menjelaskan bahwa histidin dekarboksilase selalu dihasilkan oleh bakteri yang terhenti pertumbuhannya dan masih mampu mengkonversi histidin

menjadi histamin. Dengan demikian hal ini dapat mendukung meskipun kondisi tersebut tidak persis sama. Tetapi dapat dijelaskan bahwa pada penelitian ini meskipun tidak dijumpai mikroba yang tumbuh karena kondisinya telah mati seperti dijelaskan pada bagian mikroba psikrofilik, tetapi enzim yang telah dihasilkan sebelum mikroba tersebut mati akan terus beraktifitas menghasilkan histamin.

4.2.3 Perlakuan Terbaik

Dari empat perlakuan penambahan bakteri, yakni *Nitrococcus* sp., *Acinetobacter* sp., dan lama waktu aerasi yang digunakan, yakni 6 jam, 12 jam, 18 jam, dan 24 jam. Menurut analisis statistik jika dilihat dari pengaruh penambahan bakteri terhadap penguraian histidin menjadi histamin perlakuan yang terbaik, yakni pada penambahan bakteri jenis *Nitrococcus* sp., sedangkan pada perlakuan lama waktu aerasi yang terbaik terdapat pada waktu 18 jam. Perlakuan terbaik ini didukung dengan adanya grafik pada Gambar 20 dan 21 seperti yang telah dijelaskan diatas. Hal ini disebabkan karena aktivitas enzim dekarboksilase yang terkandung di dalam bakteri *Nitrococcus* sp. lebih besar.

Histamin dapat diproduksi oleh histidin dekarboksilase meskipun bakteri sangat sedikit (Yamanaka *et al.* 1987 dalam Mahendradatta, 2003). Adapun menurut Baranowski *et al.*, (1985) dalam Mahendradatta 2003), histidin dekarboksilase selalu dihasilkan oleh bakteri yang terhenti pertumbuhannya dan masih mampu mengkonversi histidin menjadi histamin. Dengan demikian hal ini dapat mendukung meskipun kondisi tersebut tidak persis sama. Tetapi dapat dijelaskan bahwa pada penelitian ini meskipun tidak dijumpai mikroba yang tumbuh karena kondisinya telah mati seperti dijelaskan pada bagian mikroba psikrofilik, tetapi enzim yang telah dihasilkan sebelum mikroba tersebut mati akan terus beraktifitas menghasilkan histamin.

5. PENUTUP

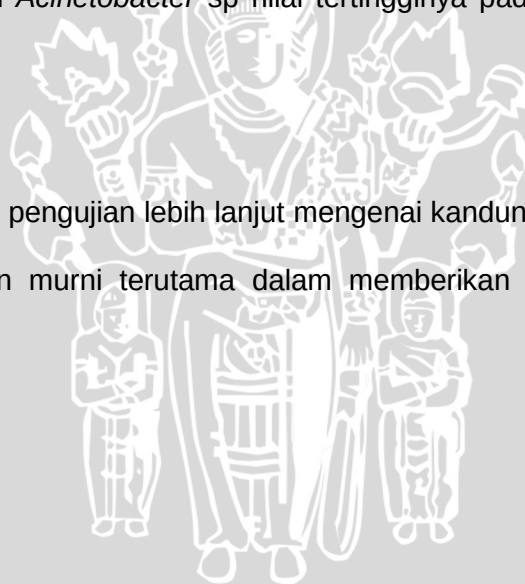
5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian tentang penambahan histidin murni dengan bakteri *Nitrococcus* sp dan *Acinetobacter* sp secara *In-vitro* dalam menurunkan kadar histamin, diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

- Bakteri (*Acinetobacter* sp dan *Nitrococcus* sp) berpengaruh terhadap kadar histamin.
- Lama waktu mempengaruhi penguraian histidin menjadi histamin oleh bakteri (*Nitrococcus* sp dan *Acinetobacter* sp) dan kadar yang tertinggi untuk bakteri *Nitrococcus* sp pada 18 jam sebesar 33,55 mg/kg dan untuk *Acinetobacter* sp nilai tertingginya pada 12 jam sebesar 8,68 mg/kg dan untuk kombinasi *Nitrococcus* sp dan *Acinetobacter* sp nilai tertingginya pada 12 jam sebesar 6,90 mg/kg.

5.2 Saran

Perlu diadakan pengujian lebih lanjut mengenai kandungan histamin yang dihasilkan dari histidin murni terutama dalam memberikan manfaat terhadap masyarakat.



DAFTAR PUSTAKA

- Adhie. 2007. **Bakteri, Ciri-ciri, Struktur, Perkembangbiakan, Bentuk dan Manfaatnya**. <http://www.WordPress.com> weblog. Diakses tanggal 5 April 2011.
- Agustina. 2010. **Efektifitas Chitosan Dalam Meminimalkan Pembentukan Histamin Pada Ikan Kembung (*Rastrelliger sp*) Selama Distribusi di Kalimantan Selatan**. [Desertasi]. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang.
- Ahmed, F. 1991. **Scombroid (histamine) fish poisoning**. Committee on evaluation of the safety of fishery products, National Academy Press, Washington, DC. Seafood Safety pp 93-96.
- Allen, G. Green, D.P and Bolton, G. E. 2004. **Control of Histamin Production in Current Commercial Fishing Operation for Mahi-Mahi (*Coryphaena hippurus*) and Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) in North Carolina**. Corresponding author : dave_green@ncsu.edu.
- Amirin, T.M. 2009. **Penelitian Eksploratori (Efksploratif)**. www.tatangmanguny.wordpress.com. diakses tanggal 25 Juli 2011.
- Bennour, M., marrakchi, A.E., Bouchriti, N., Hamama, A. And Quadaa, M.E. 1991. Chemical and Microbiological assessment of Mackerel (*Scomber scombrus*) stored in ice. J Food Prot. 54:789-792.
- Anonymous. 2010. **Nitrosomonas**. <http://en.wikipedia.org/wiki/Nitrosomonas>. Diakses tanggal 5 April 2011.
- Angeles, M. M. 1993. **Epidemiologia De Las Infecciones Por *Acinetobacter baumannii***. Enferm Infect Microbial Clinic 1993: 11: 29-33.
- Arisman. 2009. **Keracunan Makanan : Buku Ajar Ilmu Gizi**. Penerbit Buku Kedokteran EGC. <http://books.google.co.id/books>. Diakses pada Tanggal 20 Oktober 2011.
- Brady, J. E. 1999. Kimia Universitas Asas dan Struktur. Bina Dupa Aksara. Jakarta
- Brinker, C., Maurice Kerr and Carl Rayne. 2002. **Investigation Of Biogenic Amines In Fish And Fish Products**. Public Health Division. Public Health Division. Victoria.
- Center for disease control. 2005. ***Acinetobacter baumannii***. Form no. 954-0041 (Rev 06/06). OSF. Saint Francis Medical Center.

- Dart, R. K. 2003. **Microbiology For The Analytical Chemist**. Loughborough University.
- Djaafar, T. F, Rahayu, S. 2007. **Cemaran Mikroba Pada Produk Pertanian, Penyakit Yang Ditimbulkan dan Pencegahannya**. Jurnal Litbang Pertanian 26:2.
- Diomedi, A. P. 2005. ***Acinetobacter baumanii* pandrug-resistant up date in epidemiologist and anti microbial managing issues**. Rev chil infect 2005 ; 22 (4) : 298-320.
- Dwijoseputro. 1998. **Dasar-Dasar Mikrobiologi**. Djambatan. Malang.
- Fardiaz, S. 1993. **Mikrobiologi Pangan 1**. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Fletcher, G.C., Summers,G and van Veghel, P.W.C. 1998. ***Levels of histamine and histamine producing-bacteria in smoked fish from New Zealand markets***. J. Food Prot. 61(8): 1064-1070.
- Guizani, N; A. A. Moza; M. A. Ismail; M. Ann and S. R. Mohammad. 2005. **The Effect of Storage Temperature and Histamine Production and The Freshness of Yellowfin Tuna (*Thunus albacares*)**. Journal Food Research International 38 : 215-222.
- Hamdan. 2008. **Kultur Jaringan**. [http:// hamdan.blogspot.html](http://hamdan.blogspot.html). diakses tanggal 1 desember 2011 pukul 20.54 WIB.
- Huss. 1994. **Bakteri Penghasil Histamin**. www.damandiri.or.id/file/indahwidiastutyipbbab2.pdf. Diaksees pada tanggal 07 Juli 2010. Pukul 07.15 WIB
- Holt, J. G., N. R., Kreig., P. H. A. Sneath., J. T. Staley., S. T. Williams. 2000. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Ninth Edition.
- Indriati, N., dan dan Arifah. K. 2006. **Penggunaan Ekstrak Daun Sirih UntukMenghambat Pertumbuhan Bakteri Penghasil Histamin**. Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan
- Jenie, B.S.L dan Rahayu, W.P.R. 1993. **Penanganan Limbah Industri Pangan**. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Keer, M. Lawicki, P. Aguirre, S. and Rayner, C.2002. **Effect of Storage Conditions on Histamine Formation in Fresh and Canned Tuna**. State Chemitry Laboratory, Werbee. Victorian Government Departement of Human Service. [www. Fodsafety.vic.gov.au](http://www.Fodsafety.vic.gov.au).

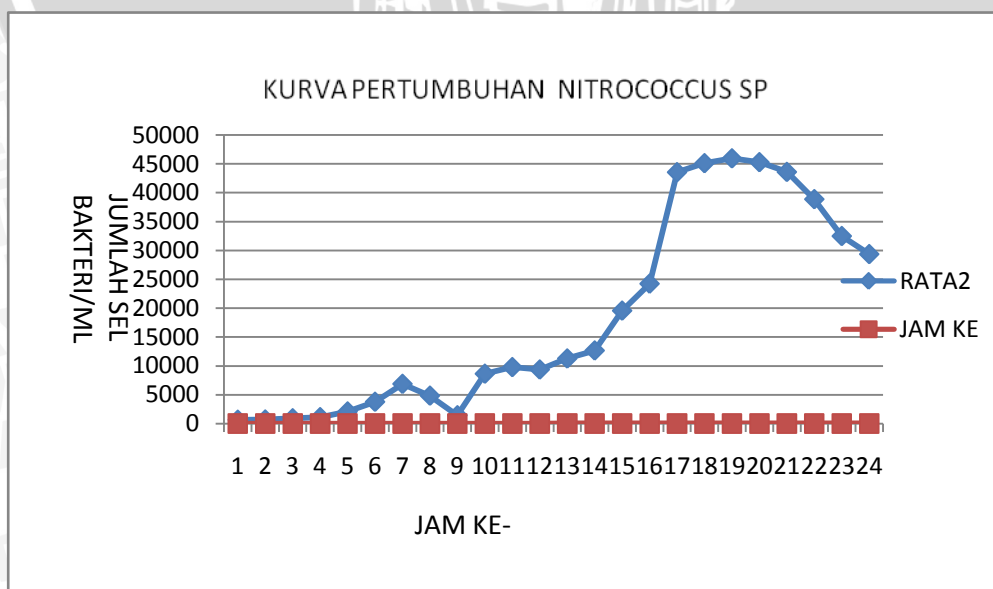
- Kusmarwati, A. dan Ninoek, I. 2008 . **Daya Hambat Ekstrak Bahan Aktif Biji Picung (*Pangium edule Reinw*)**. Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan Vol.3
- Lehane, L and Olley, J. 1999. **Histamine Fish Poisoning Revisited**. Jurnal Food Microbial. 58 ; 1-37.
- Mahendratta, Risna, A. M dan Langkong Jumriah. 2003. **Studi Perubahan Mutu Pada Burger Ikan Cakalang (*Katsuwonus Pelamis L*) Selama Penyimpanan dingin**. Teknologi Hasil Pertanian Universitas Hasanuddin. Makasar.■
- Noviarty. 2007. **Kalibrasi alat spektrofлуorometer luminesen ls-5b menggunakan bahan standar ovalen**. Pusat Teknologi Bahan Bakar Nuklir, BATAN. Tangerang.
- Perkin; Elmer. 1981. **Operator's Manual Luminescence Spectrometer LS-5**. Beaconsfield, Bucking-hamshire. England.
- Pharmacy. E. 2011^e. *In Vitro*. <http://pharmacyeducation.com/2010>. Diakses Pada Tanggal 10 November 2011.
- Pisang kipas. 2009. ***Acinetobacter baumannii***. <http://www.wordpress.com>. diakses pada tanggal 22 Oktober 2011
- Putera, D. 2010. **Perbedaan *In Vivi*, *In Vitro* dan *Ex Vivo***. <http://farmasiblogku.blogspot.com>. Diakses tanggal 17 desember 2011 pukul 21.15 WIB.
- Rawles, D.D, Flick, G.J. and Martin. 1995. **Biogenic Amines In Fish Shellfish**. **Adv. Food. Nutr. Res. 39:329-364**.
- Rodriguez, J. J. J; Sabater, E. I. L; Herrero, M. M. H; dan Ventura,M. T. M. 1994. **Histamine, Putrescine, and Cadaverine Formation, in Spanish Semipreserved Anchovies as Affected by Time/Temperature**. Journal of Food Science, Volume 59 No. 5.
- Rodwell, V. W; K. M. Robert; A. M. Peter dan K. G. Daryl. 2003. **Biokimia Harper**. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hal 333.
- Rompas, M.R. 1998. **Kimia Lingkungan. Edisi Pertama**. Penerbit Tarsito. Bandung.
- Sims, G. G *et al.*, 1992. **Quality Indices for Canned Skipjack Tuna : Correlation of Sensory Attributes with Chemical Indices**. Journal of Food Science 57 (5).

- Singarimbun, M. dan Effendi, S. 1989. Metode Penelitian Survei. Edisi Revisi. LP3ES. Jakarta.
- Sumner J, Ross T, Ababouch L. 2004. **Application of Risk Assessment in the Fish Industry**. Roma : FAO
- SNI. 2009. **Penentuan Kadar Histamin dengan Spektroflorometri dan Kromatografi Kinerja Tinggi (KCKT) pada Produk Perikanan**. Standar Nasional Indonesia Nomor 2354.10:2009. Jakarta.
- Taylor, S. L. 1982. Monograph on Histamin Poisoning Codex Alimentarius Commisior. **Roma : FAO**.
- Taylor, S. L dan Behling, A. R. 1983. **Bacterial Histamine Production as a Function of Temperature and Time of Incubation**. Journal of Food Science, Volume 4.
- Tim Penyusun. 2007. **Modul Kuliah : Spektroskopi**. Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma. Yogyakarta.
- Wanenoer. 2010. **Penentuan Kadar Vitamin E Metode Fluorometri**. <http://id.shvoong.com>. Diakses pada Tanggal 22 Desember 2010.
- Veteriner, 2010. **Pengertian *In Vitro***. <http://veteriner-island.blogspot.com/2010/06/deskripsi-in-vitro.html>. Diakses pada tanggal 10 November 2011.
- Wibowo, M., Romauli .A.S, dan Endang .S.H, 2007. **Seleksi dan Pengujian Aktivitas Enzim *L-Histidine Decarboxylase* Dari Bakteri Pembentuk Histamin**. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi, Departemen Kelautan dan Perikanan. Jakarta.
- Widiastuti, I. 2004. **Histidin Dekarboksilase**. http://docs.google.com/viewer_pdf. Diakses pada Tanggal 28 April 2011.
- Widodo, Wahyu Eko. 2010. **Spektrofluorometri untuk Mengukur Kadar Kinin Sulfat**. <http://wordpress.com>. Diakses tanggal 03 Desember 2010.
- Wikipedia. 2010^a. **Histamin**. <http://id.wikipedia.org/wiki/Histamin>. /Diakses/ pada tanggal 27 Mei 2011 pukul 13.00 /WIB
- _____. 2010^b. **Asam amino**. <http://id.wikipedia.org>. Diakses pada tanggal 20 Desember 2010.

Lampiran 1. Kurva Pertumbuhan Bakteri

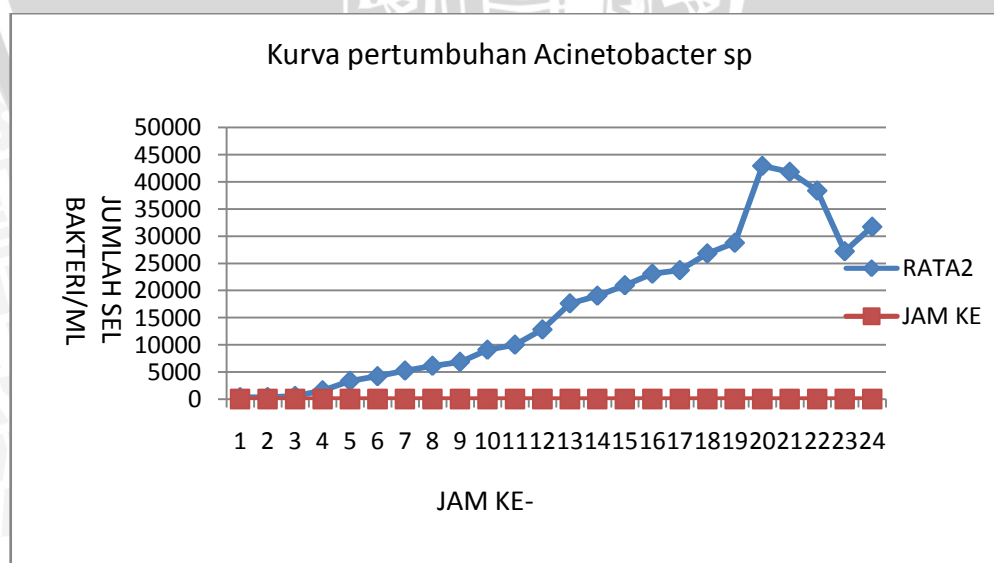
- *Nitrococcus* sp.

JAM KE	X1	X2	RATA2	Σ Sel / ml	X1	X2	RATA2	JAM KE
1	598	666	632	$5,9 \cdot 10^6$	598	666	632	1
2	659	682	670.5	$6,7 \cdot 10^6$	659	682	670.5	2
3	898	876	887	$8,9 \cdot 10^6$	898	876	887	3
4	1079	1086	1082.5	$1,1 \cdot 10^6$	1079	1086	1082.5	4
5	2100	2037	2068.5	$2,1 \cdot 10^7$	2100	2037	2068.5	5
6	3645	3850	3747.5	$3,7 \cdot 10^7$	3645	3850	3747.5	6
7	7842	5869	6855.5	$6,9 \cdot 10^7$	7842	5869	6855.5	7
8	10548	8560	9554	$1,0 \cdot 10^7$	1054	8560	4807	8
9	13162	15030	14096	$1,4 \cdot 10^7$	1312	1503	1407.5	9
10	8350	8880	8615	$8,6 \cdot 10^7$	8350	8880	8615	10
11	9580	9940	9760	$9,8 \cdot 10^7$	9580	9940	9760	11
12	9760	8920	9340	$9,3 \cdot 10^7$	9760	8920	9340	12
13	10740	11770	11255	$1,1 \cdot 10^8$	10740	11770	11255	13
14	12830	12450	12640	$1,3 \cdot 10^8$	12830	12450	12640	14
15	19540	19560	19550	$2,0 \cdot 10^8$	19540	19560	19550	15
16	22530	21920	22225	$2,2 \cdot 10^8$	22530	25920	24225	16
17	43860	43240	43550	$4,3 \cdot 10^9$	43860	43240	43550	17
18	44060	42170	43115	$4,3 \cdot 10^9$	45060	45170	45115	18
19	42450	41450	41950	$4,2 \cdot 10^9$	46450	45450	45950	19
20	40270	40310	40290	$4,0 \cdot 10^8$	45270	45310	45290	20
21	33180	34010	33595	$4,0 \cdot 10^8$	43180	44010	43595	21
22	31630	29120	30375	$3,0 \cdot 10^8$	38630	39120	38875	22
23	28810	27160	27985	$2,8 \cdot 10^7$	31810	33160	32485	23
24	25960	23750	24855	$2,5 \cdot 10^7$	29960	28750	29355	24



- *Acinetobacter* sp

JAM KE	X1	X2	RATA2	Σ Sel / ml	X1	X2	RATA2	JAM KE
1	368	399	383.5	$3.8 \cdot 10^6$	368	399	383.5	1
2	448	342	395	$4.0 \cdot 10^6$	448	342	395	2
3	590	613	601.5	$6.0 \cdot 10^6$	590	613	601.5	3
4	1698	1593	1645.5	$1.6 \cdot 10^7$	1698	1593	1645.5	4
5	3040	3720	3380	$3.4 \cdot 10^7$	3040	3720	3380	5
6	4640	3850	4245	$4.2 \cdot 10^7$	4640	3850	4245	6
7	4870	5690	5280	$5.3 \cdot 10^7$	4870	5690	5280	7
8	6080	6240	6160	$6.2 \cdot 10^7$	6080	6240	6160	8
9	6740	7030	6885	$6.9 \cdot 10^7$	6740	7030	6885	9
10	8350	9880	9115	$1.1 \cdot 10^8$	8350	9880	9115	10
11	9880	10210	10045	$1.0 \cdot 10^8$	9880	10210	10045	11
12	13760	11920	12840	$8.8 \cdot 10^7$	13760	11920	12840	12
13	17540	17740	17640	$7.6 \cdot 10^7$	17540	17740	17640	13
14	18830	19280	19055	$5.1 \cdot 10^7$	18830	19280	19055	14
15	21010	20950	20980	$4.0 \cdot 10^7$	21010	20950	20980	15
16	23230	22970	23100	$3.1 \cdot 10^7$	23230	22970	23100	16
17	24250	23260	23755	$2.8 \cdot 10^7$	24250	23260	23755	17
18	27710	25940	26825	$2.3 \cdot 10^6$	27710	25940	26825	18
19	28430	29150	28790	$2.3 \cdot 10^6$	28430	29150	28790	19
20	42870	43010	42940	$2.9 \cdot 10^6$	42870	43010	42940	20
21	41920	41760	41840	$1.8 \cdot 10^6$	41920	41760	41840	21
22	37750	39010	38380	$8.8 \cdot 10^5$	37750	39010	38380	22
23	28018	26450	27234	$7.3 \cdot 10^5$	28018	26450	27234	23
24	26350	37120	31735	$6.9 \cdot 10^5$	26350	37120	31735	24



Lampiran 2. Gambar Proses Pembuatan Larutan Histidin



Serbuk Histidin



Aquabides











Lampiran 3. Gambar proses aerasi



Lampiran 4. Hasil uji histamin dari histidin murni

FROM : LPPMHP BWI

FORM NO. : 03334178/16

Dec. 19 2011 10:25PM P1

REPORT OF HISTAMINE DETERMINATION (SNI 2354.10-2009)

Prepared By Chemistry Laboratory

to : P. Hadi

Quantitation results file:C:\FLWINLAB\DATA\Uji Histamine.rpt
Generated on :17-12-2011 at time:14:51:19

Measurement conditions

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

Comments: Default concentration method

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

Reference sample results

Std#	Conc	Fact	Intens.	BG	Factor
	(mg/kg)				
STD 1	0.100	18.534	2.62	1	
STD 2	0.200	40.789	2.62	1	
STD 3	0.300	59.075	2.62	1	
STD 4	0.400	81.843	2.62	1	
STD 5	0.500	99.197	2.62	1	
STD 6	0.600	117.888	2.62	1	

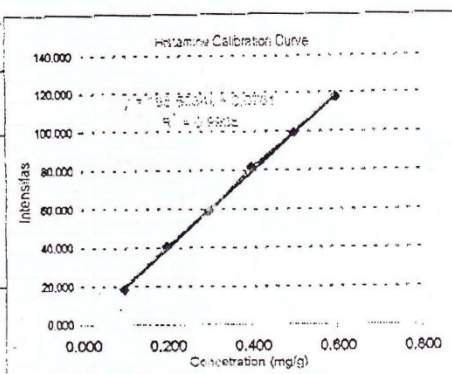
Fit equation:

$$Y = 198,5034 X + 0.0781$$

$$a = 0.0781$$

$$b = 198.5034$$

$$X \text{ (mg/kg)} = ((Y - a) \times 5000) / (b \times 1000)$$



Test Number	Test Code	Intensity	Weight (Grams)	Conc. (mg/kg)	Test Decision
1	A1(2)	0.596	10.0639	1.2962	Accepted
2	A1(1)	2.246	10.0843	3.5386	Accepted
3	A2(2)	1.215	10.0508	2.8492	Accepted
4	A2(1)	7.524	10.0918	16.7260	Accepted
5	A3(3)	0.688	10.0563	1.5276	Accepted
6	A2(3)	1.191	10.0746	2.7825	Accepted
7	A3(1)	0.096	10.0502	0.0445	Accepted
8	A3(2)	0.511	10.0918	1.4704	Accepted
9	A123(2)	0.512	10.0596	1.0865	Accepted
10	A1(3)	2.211	10.0820	3.4518	Accepted
11	A123(1)	0.722	10.0674	1.6110	Accepted
12	A123(3)	2.156	10.0435	3.3269	Accepted
13	A3(2)	2.994	10.0918	7.2779	Accepted
14	A3(4)	5.105	10.0909	12.5479	Accepted
15	A123(4)	2.349	10.0516	3.8085	Accepted
16	A1(4)	0.857	10.0764	1.9471	Accepted
17	A2(4)	0.182	10.0621	0.2601	Accepted
18	B2(1)	3.298	10.0533	6.1886	Accepted
19	B2(3)	0.201	10.0878	0.3068	Accepted
20	B1(1)	0.124	10.0451	0.1151	Accepted
21	B1(2)	0.554	10.0858	1.1868	Accepted
22	B12(1)	1.230	10.0417	2.8894	Accepted
23	B12(2)	2.839	10.0818	6.8979	Accepted
24	B2(2)	3.530	10.0226	8.6752	Accepted
25	B1(4)	0.191	10.0903	0.2818	Accepted
26	B12(4)	1.052	10.0885	2.4316	Accepted
27	B12(3)	1.380	10.0667	3.2576	Accepted
28	B2(4)	2.521	10.1051	4.2176	Accepted

REPORT OF HISTAMINE DETERMINATION (SNI 2354.10-2005)

Prepared By Chemistry Laboratory

to: P. Hadi

29	B1 (3)	13.495	10.0730	33.5502	Accepted
30	P2 (2)	0.088	10.0918	0.0247	Accepted
31	P2 (1)	2.530	10.0634	6.1371	Accepted
32	P3 (1)	2.081	10.0348	3.1413	Accepted
33	P123 (1)	0.370	10.0808	0.7294	Accepted
34	P23 (1)	0.678	10.0907	1.4975	Accepted
35	P1 (2)	2.972	10.0517	5.3716	Accepted
36	P13 (1)	1.500	10.0257	3.5724	Accepted
37	P123 (2)	2.116	10.0596	5.1027	Accepted
38	P1 (1)	0.492	10.0486	1.0375	Accepted
39	P23 (4)	1.516	10.0910	3.5892	Accepted
40	P1 (4)	2.558	10.0693	6.2035	Accepted
41	P123 (4)	0.521	10.0729	1.1075	Accepted
42	P3 (2)	1.117	10.0902	2.5934	Accepted
43	P12 (2)	1.747	10.0749	4.1725	Accepted
44	P12 (1)	1.905	10.0741	4.5678	Accepted
45	P1 (3)	2.255	10.0663	5.4472	Accepted
46	P13 (2)	1.878	10.0400	4.5156	Accepted
47	P3 (4)	10.749	10.0592	26.7202	Accepted
48	P23 (3)	0.266	10.0564	0.4706	Accepted
49	P3 (3)	1.391	10.0375	3.2946	Accepted
50	P23 (2)	0.331	10.0718	0.7825	Accepted
51	P12 (4)	1.971	10.0896	2.8493	Accepted
52	P12 (3)	2.262	10.0605	5.4678	Accepted
53	P13 (3)	0.341	10.0825	0.6568	Accepted
54	P123 (3)	2.394	10.0353	3.9278	Accepted
55	P13 (4)	0.769	10.0559	1.7306	Accepted
56	P2 (4)	1.023	10.0428	2.3699	Accepted
57	P2 (3)	2.996	10.0547	7.3098	Accepted
58	Q2 (2)	3.256	10.0612	7.9560	Accepted
59	Q1 (2)	3.290	10.0896	6.1463	Accepted
60	Q1 (1)	1.009	10.0824	2.3256	Accepted
61	Q12 (4)	1.412	10.0861	3.3312	Accepted
62	Q2 (3)	0.360	10.0778	0.7046	Accepted
63	Q12 (1)	0.749	10.0329	1.6844	Accepted
64	Q2 (1)	0.747	10.0683	1.6734	Accepted
65	Q1 (3)	0.783	10.0587	1.7652	Accepted
66	Q12 (3)	0.765	10.0478	1.7220	Accepted
67	Q12 (2)	0.318	10.0708	0.6000	Accepted
68	Q2 (4)	9.162	10.0581	22.7488	Accepted
69	Q1 (4)	0.589	10.0824	1.2764	Accepted
70	CONTROL	0.099	10.0667	0.0523	Accepted



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS PERIKANAN DAN KELAUTAN
UNIT LABORATORIUM PENGENDALIAN DAN PENGUJIAN MUTU HASIL PERIKANAN
 Jl. Barong Bakungan Kec. Glagah Telp. 0333 417845 Fax. 0333 417846
 email : lppmhpbanyuwangi@yahoo.com
BANYUWANGI

LAPORAN HASIL PENGUJIAN KADAR HISTAMIN

Tanggal masuk contoh : 6 Februari 2012
 Tanggal uji : 6 Februari 2012
 Tanggal Selesai : 7 Februari 2012
 Metode Uji : Spektrofotometri SNI : 2354.10: 2009

Hasil Uji :

NO. UJI	KODE UJI	HASIL UJI (mg/kg)	NO. UJI	KODE UJI	HASIL UJI (mg/kg)
1	A1(2)	1.2387	36	P13(1)	3.5709
2	A1(1)	3.6374	37	P123(2)	5.8892
3	A2(2)	2.7969	38	P1(1)	0.7981
4	A2(1)	16.3231	39	P23(4)	3.6441
5	A3(3)	2.2346	40	P1(4)	6.4272
6	A2(3)	2.2562	41	P123(4)	2.6422
7	A3(1)	0.4004	42	P3(2)	3.5271
8	A3(2)	1.2013	43	P12(2)	4.4721
9	A123(2)	0.6071	44	P12(1)	4.5420
10	A1(3)	3.7632	45	P1(3)	5.8210
11	A123(1)	1.4250	46	P13(2)	4.4795
12	A123(3)	3.2125	47	P3(4)	26.7489
13	A3(2)	7.2279	48	P23(3)	0.4992
14	A3(4)	13.0491	49	P3(3)	3.6525
15	A123(4)	3.0947	50	P23(2)	0.8390
16	A1(4)	1.1493	51	P12(4)	2.6892
17	A2(4)	0.3734	52	P12(3)	3.3854
18	B2(1)	5.2767	53	P12(3)	0.4928
19	B2(3)	0.5014	54	P123(3)	3.8226
20	B1(1)	0.2429	55	P13(4)	1.8797
21	B1(2)	1.2958	56	P2(4)	2.2585
22	B12(1)	2.2817	57	P2(3)	7.5201
23	B12(2)	6.1541	58	Q2(2)	7.7848
24	B2(2)	8.0555	59	Q1(2)	5.3278
25	B1(4)	0.3803	60	Q1(1)	2.3625
26	B12(4)	2.2483	61	Q12(4)	3.4765
27	B12(3)	3.7445	62	Q2(3)	0.7722
28	B2(4)	4.6671	63	Q12(1)	1.6787
29	B1(3)	34.2182	64	Q2(1)	1.8710
30	P2(2)	0.0511	65	Q1(3)	1.6730
31	P2(1)	6.8846	66	Q12(3)	1.7603
32	P3(1)	3.0791	67	Q12(2)	0.6486
33	P123(1)	0.6792	68	Q2(4)	22.7645
34	P23(1)	1.4418	69	Q1(4)	1.3066
35	P1(2)	5.8250	70	CONTROL	0.0512

Catatan : Hasil uji hanya berlaku terhadap contoh yang di uji, dan tidak mewakili Lot tertentu.

Banyuwangi, 7 Februari 2012

Manajer Teknis



OF HISTAMINE DETERMINATION (SNI 2354.10-2009)

Prepared By Chemistry Laboratory

Quantitation results file:C:\FLWINLAB\DATA\Uji Histamine.rpt
Generated on :07-02-2012 at time:13:11:39

Measurement conditions

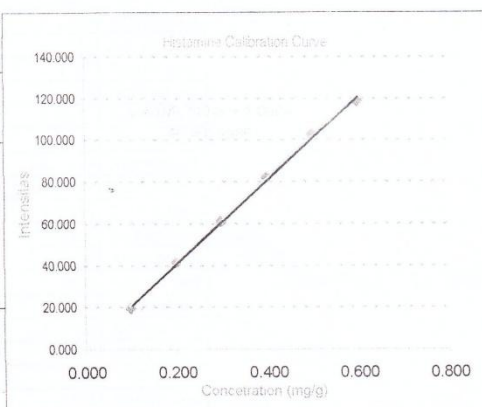
Method: C:\FLWINLAB\METHODS\CONC.MTH

Comments: Default concentration method

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

Reference sample results

Std#	Conc*Fact (mg/kg)	Intens.	BG	Factor
STD 1	0.100	19.718	2.069	1
STD 2	0.200	41.597	2.069	1
STD 3	0.300	61.228	2.069	1
STD 4	0.400	82.160	2.069	1
STD 5	0.500	102.557	2.069	1
STD 6	0.600	118.774	2.069	1



Fit equation:

$$Y = 199.7404 X + 1.0964$$

a= 1.0964

b= 199.7404

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

Test Number	Test Code	Intensitas	Weight (Grams)	Conc. (mg/kg)	Test Decision
1	A 1(2)	1.596	10.0963	1.2387	Accepted
2	A1(1)	2.559	10.0657	3.6374	Accepted
3	A2(2)	2.215	10.0117	2.7969	Accepted
4	A2(1)	7.673	10.0856	16.3231	Accepted
5	A3(3)	1.996	10.0774	2.2346	Accepted
6	A2(3)	2.001	10.0367	2.2562	Accepted
7	A3(1)	1.257	10.0417	0.4004	Accepted
8	A3(2)	1.577	10.0149	1.2013	Accepted
9	A123(2)	1.339	10.0034	0.6071	Accepted
10	A1(3)	2.611	10.0749	3.7632	Accepted
11	A123(1)	1.667	10.0237	1.4250	Accepted
12	A123(3)	2.392	10.0956	3.2125	Accepted
13	A3(2)	4.012	10.0977	7.2279	Accepted
14	A3(4)	6.331	10.0417	13.0491	Accepted
15	A123(4)	2.337	10.0349	3.0947	Accepted
16	A1(4)	1.557	10.0318	1.1493	Accepted
17	A2(4)	1.247	10.0967	0.3734	Accepted
18	B2(1)	3.223	10.0885	5.2767	Accepted
19	B2(3)	1.297	10.0147	0.5014	Accepted
20	B1(1)	1.194	10.0569	0.2429	Accepted
21	B1(2)	1.615	10.0187	1.2958	Accepted
22	B12(1)	2.011	10.0339	2.2817	Accepted
23	B12(2)	3.574	10.0779	6.1541	Accepted
24	B2(2)	4.332	10.0559	8.0555	Accepted
25	B1(4)	1.249	10.0457	0.3803	Accepted
26	B12(4)	1.996	10.0159	2.2483	Accepted
27	B12(3)	2.597	10.0317	3.7445	Accepted
28	B2(4)	2.963	10.0117	4.6671	Accepted

7 OF HISTAMINE DETERMINATION (SNI 2354.10-2009)

Prepared By Chemistry Laboratory

29	B1 (3)	14.853	10.0637	34.2182	Accepted
30	P2 (2)	1.117	10.0848	0.0511	Accepted
31	P2 (1)	3.865	10.0667	6.8846	Accepted
32	P3 (1)	2.337	10.0857	3.0791	Accepted
33	P123 (1)	1.370	10.0845	0.6792	Accepted
34	P23 (1)	1.678	10.0976	1.4418	Accepted
35	P1 (2)	3.446	10.0972	5.8250	Accepted
36	P13 (1)	2.534	10.0779	3.5709	Accepted
37	P123 (2)	3.457	10.0339	5.8892	Accepted
38	P1 (1)	1.417	10.0558	0.7981	Accepted
39	P23 (4)	2.557	10.0332	3.6441	Accepted
40	P1 (4)	3.667	10.0119	6.4272	Accepted
41	P123 (4)	2.152	10.0008	2.6422	Accepted
42	P3 (2)	2.519	10.0966	3.5271	Accepted
43	P12 (2)	2.897	10.0788	4.4721	Accepted
44	P12 (1)	2.917	10.0339	4.5420	Accepted
45	P1 (3)	3.439	10.0741	5.8210	Accepted
46	P13 (2)	2.894	10.0455	4.4795	Accepted
47	P3 (4)	11.856	10.0692	26.7489	Accepted
48	P23 (3)	1.297	10.0594	0.4992	Accepted
49	P3 (3)	2.561	10.0378	3.6525	Accepted
50	P23 (2)	1.434	10.0728	0.8390	Accepted
51	P12 (4)	2.178	10.0680	2.6892	Accepted
52	P12 (3)	2.457	10.0607	3.3854	Accepted
53	P13 (3)	1.295	10.0875	0.4928	Accepted
54	P123 (3)	2.636	10.0822	3.8226	Accepted
55	P13 (4)	1.853	10.0759	1.8797	Accepted
56	P2 (4)	2.007	10.0928	2.2585	Accepted
57	P2 (3)	4.117	10.0548	7.5201	Accepted
58	Q2 (2)	4.227	10.0666	7.7848	Accepted
59	Q1 (2)	3.229	10.0199	5.3278	Accepted
60	Q1 (1)	2.047	10.0724	2.3625	Accepted
61	Q12 (4)	2.496	10.0778	3.4765	Accepted
62	Q2 (3)	1.406	10.0369	0.7722	Accepted
63	Q12 (1)	1.772	10.0745	1.6787	Accepted
64	Q2 (1)	1.845	10.0159	1.8710	Accepted
65	Q1 (3)	1.767	10.0337	1.6730	Accepted
66	Q12 (3)	1.803	10.0485	1.7603	Accepted
67	Q12 (2)	1.356	10.0189	0.6486	Accepted
68	Q2 (4)	10.221	10.0337	22.7645	Accepted
69	Q1 (4)	1.622	10.0697	1.3066	Accepted
70	CONTROL	1.117	10.0758	0.0512	Accepted

Lampiran 5. Kadar histamin dari histidin murni

PERLAKUAN	ULANGAN			JUMLAH	RERATA
	1	2	3		
B1P1	0,12	0,24	0,24	0,6	0,20
B1P2	1,19	1,29	1,29	3,77	1,26
B1P3	33,55	34,22	34,22	101,99	34
B1P4	0,23	0,36	0,36	0,95	0,32
B2P1	6,18	5,28	5,28	16,74	5,58
B2P2	8,68	8,05	8,05	24,78	8,26
B2P3	0,31	0,50	0,50	1,31	0,44
B2P4	4,21	4,66	4,66	13,53	4,51
B3P1	2,89	2,28	2,28	7,45	2,48
B3P2	6,90	6,15	6,15	19,20	6,40
B3P3	3,26	3,74	3,74	10,74	3,58
B3P4	2,43	2,25	2,25	6,93	2,31
TOTAL	69,95	69,02	69,02	207,99	

Tabel dua arah

Perlakuan	Lama waktu aerasi				Jumlah	Rerata
	P1	P2	P3	P4		
Penambahan bakteri						
B1	0,60	3,77	101,99	0,95	107,31	8,94
B2	16,74	24,78	1,31	13,53	56,36	4,79
B3	7,45	19,20	10,74	6,93	44,32	3,70
Jumlah	24,79	47,75	114,04	21,41	207,99	
Rerata	2,75	5,43	12,67	2,38		

Tabel sidik ragam

Sumber Keragaman (SK)	Derajat Bebas (db)	Jumlah Kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	F hit.	Ket.	F tabel	
						5%	1%
Ulangan	2	0,05	0,025	0,2822	ns	3,44	5,72
Perlakuan	11	2826,3390	256,9399	2899,9989	sgnf	2,26	3,18
Galat	22	2,0387	0,0886				
Total	35	2828,4277					

Tabel uji BNT Pengaruh penambahan bakteri (B)

Rerata (B)		B3	B2	B1	Notasi	BNT 5%
		3,70	4,79	8,94		
B3	3,70	-			a	0,50
B2	4,79	1,00	-		b	
B1	8,94	5,24	4,24	-	c	

Tabel uji BNT Pengaruh lama aerasi (P)

Rerata (A)		P3	P2	P4	P1	Notasi	BNT 5%
		2,83	3,02	4,49	5,46		
P3	2,83	-				a	2,22
P2	3,01	0,18	-			ab	
P4	4,49	1,66	1,47	-		ab	
P1	5,46	2,63	2,44	0,97	-	b	