

**PENGARUH BAKTERI *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. DAN  
*Planococcus* sp. TERHADAP PEMBENTUKAN HISTAMIN  
DARI HISTIDIN MURNI SECARA *IN VITRO***

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

Oleh:

**WILA RUMINA NENTO  
NIM. 0810833009**



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

**PENGARUH BAKTERI *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. DAN  
*Planococcus* sp. TERHADAP PEMBENTUKAN HISTAMIN  
DARI HISTIDIN MURNI SECARA *IN VITRO***

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

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Meraih Gelar Sarjana**

**Oleh:**

**WILA RUMINA NENTO  
NIM. 0810833009**



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

**PENGARUH BAKTERI *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. DAN *Planococcus* sp. TERHADAP PEMBENTUKAN HISTAMIN DARI HISTIDIN MURNI SECARA *IN VITRO***

Oleh:  
**WILA RUMINA ENTO**  
0810833009

**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 :

**SKRIPSI**

**PENGARUH BAKTERI *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. DAN *Planococcus* sp.  
TERHADAP PEMBENTUKAN HISTAMIN DARI HISTIDIN MURNI  
SECARA *IN VITRO***

Oleh:  
**WILA RUMINA NENTO**  
NIM. 0810833009

Menyetujui

**Dosen Penguji I**

**Dosen Pembimbing I**

**Ir. Dwi Setijawati, MKes**  
NIP. 19611022 198802 2 001  
Tanggal : \_\_\_\_\_

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

**Dosen Penguji II**

**Dosen Pembimbing II**

**Ir. Hj. Kartini Zaelani, MS**  
NIP. 19550503 198503 2 001  
Tanggal : \_\_\_\_\_

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

**Mengetahui,  
Ketua Jurusan**

**Dr. Ir. Happy Nursyam, MS**  
NIP. 19600322 198601 1 001  
Tanggal: \_\_\_\_\_

## RINGKASAN

**Wila Rumina Nento.** Laporan Skripsi dengan judul Pengaruh Bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. Dan *Planococcus* sp. Terhadap Pembentukan Histamin Dari Histidin Murni Secara *In Vitro* (dibawah bimbingan Ir. **Yahya, MP** dan Dr. Ir. **Happy Nursyam, MS**)

Histamin adalah senyawa *biogenic amin* hasil perombakan asam amino histidin bebas yang berada dalam daging ikan yang diproduksi secara biologis melalui proses dekarboksilasi dari asam amino bebas serta terdapat pada berbagai bahan pangan seperti ikan, daging merah, keju, dan makanan fermentasi (Keer *et al.*, 2002). Bakteri penghasil histamin adalah bakteri yang dapat menghasilkan enzim histidin dekarboksilase, suatu enzim yang diperlukan dalam proses dekarboksilasi, perubahan dari histidin menjadi histamin. Biogenik amin adalah senyawa amin yang terbentuk sebagai hasil proses dekarboksilasi asam amino bebas yang terdapat di dalam tubuh ikan. Histamin adalah senyawa amina biogenik yang terbentuk dari asam amino histidin akibat reaksi dengan enzim dekarboksilase (Sumner *et al.*, 2004).

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 eksperimen. Metode eksperimen adalah melakukan kegiatan percobaan untuk melihat suatu hasil yang menegaskan hubungan kasual antara variabel-variabel yang diselidiki. Analisis pengujian histamin secara kuantitatif ini menggunakan metode spektrofotometri sesuai SNI 2354. 10 tahun 2009.

Dari hasil penelitian didapatkan bahwa bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. dan *Planococcus* sp. mampu menguraikan histidin menjadi histamin dengan perlakuan waktu yang berbeda serta penggabungan atau kombinasi dari ketiga bakteri tersebut efektif dalam menguraikan histidin menjadi histamin. Dan untuk perlakuan penambahan bakteri yang terbaik terdapat pada jenis bakteri *Planococcus* sp. dan untuk perlakuan waktu aerasi yang terbaik yakni terdapat pada waktu 6 jam.

Perlu diadakan pengujian lebih lanjut mengenai aktivitas enzim yang dihasilkan oleh bakteri yang membentuk kadar histamin tinggi terutama dalam memberikan manfaat terhadap masyarakat.

## KATA PENGANTAR

*Assalamu'alaikum Warrahmatullahi Wabarokatuh,*

Puji syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT, yang hanya dengan izin-Nyalah penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi ini yang menjadi salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana di Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Ir. Yahya, MP, selaku dosen pembimbing I yang telah banyak memberikan bimbingan, arahan dan motivasi kepada penulis.
2. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS, selaku dosen pembimbing II yang telah banyak memberikan bimbingan, arahan dan motivasi kepada penulis.
3. Ir. Dwi Setijawati, M.Kes, selaku dosen penguji I.
4. Ir. Kartini Z., MS, selaku dosen penguji II.
5. Ayah dan Ibu, Adik, serta seluruh anggota keluarga saya atas kesabaran dan pengertiannya selama ini.
6. Seluruh teman-teman dan semua pihak yang bersangkutan terima kasih atas kerjasamanya dan kebersamaanya selama ini.

Penulis menyadari bahwa dalam laporan ini masih banyak kelemahan dan kekurangannya, sehingga penulis mengharapkan masukan, perbaikan, dan penelitian lebih lanjut demi kelengkapan laporan ini. Semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi semua pihak.

*Wassalam'alaikum Warrahmatullahi Wabarokatuh*

Malang, Februari 2012

Penulis

DAFTAR ISI

	Hal
HALAMAN JUDUL .....	i
LEMBAR PENGESAHAN .....	ii
RINGKASAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN .....	ix
<b>1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar belakang .....	1
1.2 Identifikasi masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.4 Kegunaan Penelitian .....	4
1.5 Hipotesis .....	4
1.6 Waktu dan Tempat.....	5
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>6</b>
2.1 Histamin .....	6
2.2 Histidin Dekarboksilase .....	8
2.3 Bakteri.....	9
2.3.1 Bakteri Dekarboksilase .....	10
2.3.1.1 <i>Bacillus</i> sp.....	10
2.3.1.2 <i>Enterobacter</i> sp.....	12
2.3.1.3 <i>Planococcus</i> sp.....	14
2.4 <i>In-Vitro</i> .....	15
2.5 Spektrofluorometri .....	16
<b>3. MATERI DAN METODE PENELITIAN.....</b>	<b>18</b>
3.1 Bahan Penelitian .....	18
3.2 Alat Penelitian .....	18
3.3 Metode Penelitian .....	19
3.3.1 Penelitian Pendahuluan.....	20
3.3.1.1 Analisis Uji Histamin .....	20
3.3.1.2 Prosedur Penelitian .....	25
3.3.2 Penelitian Utama .....	27
3.3.2.1 Prosedur Penelitian .....	29
3.3.2.2 Rancangan Percobaan .....	31
3.4 Prosedur Penelitian.....	33
3.4.1 Penelitian Tahap I (Pembiakan Bakteri).....	33
3.4.2 Penelitian Tahap II (Pengenceran Bakteri) .....	37
3.4.3 Penelitian Tahap III (Pembuatan Larutan Histidin).....	40
3.4.4 Penelitian Tahap IV (Aerasi) .....	41

<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>43</b>
4.1 Hasil Penelitian .....	43
4.1.1 Penelitian Pendahuluan .....	43
4.1.1.1 Penelitian Pendahuluan Tahap I .....	43
4.1.1.2 Penelitian Pendahuluan Tahap II .....	45
4.1.1.3 Perbandingan Kadar Histamin Dari Limbah Pemindangan Dan Histidin Murni .....	48
4.2 Penelitian Utama .....	50
4.2.1 Pengaruh Penambahan Bakteri Terhadap Kadar Histamin .....	53
4.2.2 Pengaruh Lama Aerasi Terhadap Kadar Histamin.....	54
4.2.3 Perlakuan Terbaik .....	55
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>56</b>
5.1 Kesimpulan .....	56
5.2 Saran .....	56
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>57</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>61</b>



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Rancangan percobaan bentuk RAL faktorial.....	32
2. Tabel sidik ragam pada rancangan acak lengkap (RAL) faktorial	33
3. Komposisi medium <i>Tryptone Soya Broth</i> (TSB).....	34
4. Kadar histamin dari penguraian limbah pemindangan .....	43
5. Kadar histamin dari penguraian histidin murni .....	45
6. Hasil penelitian utama .....	51

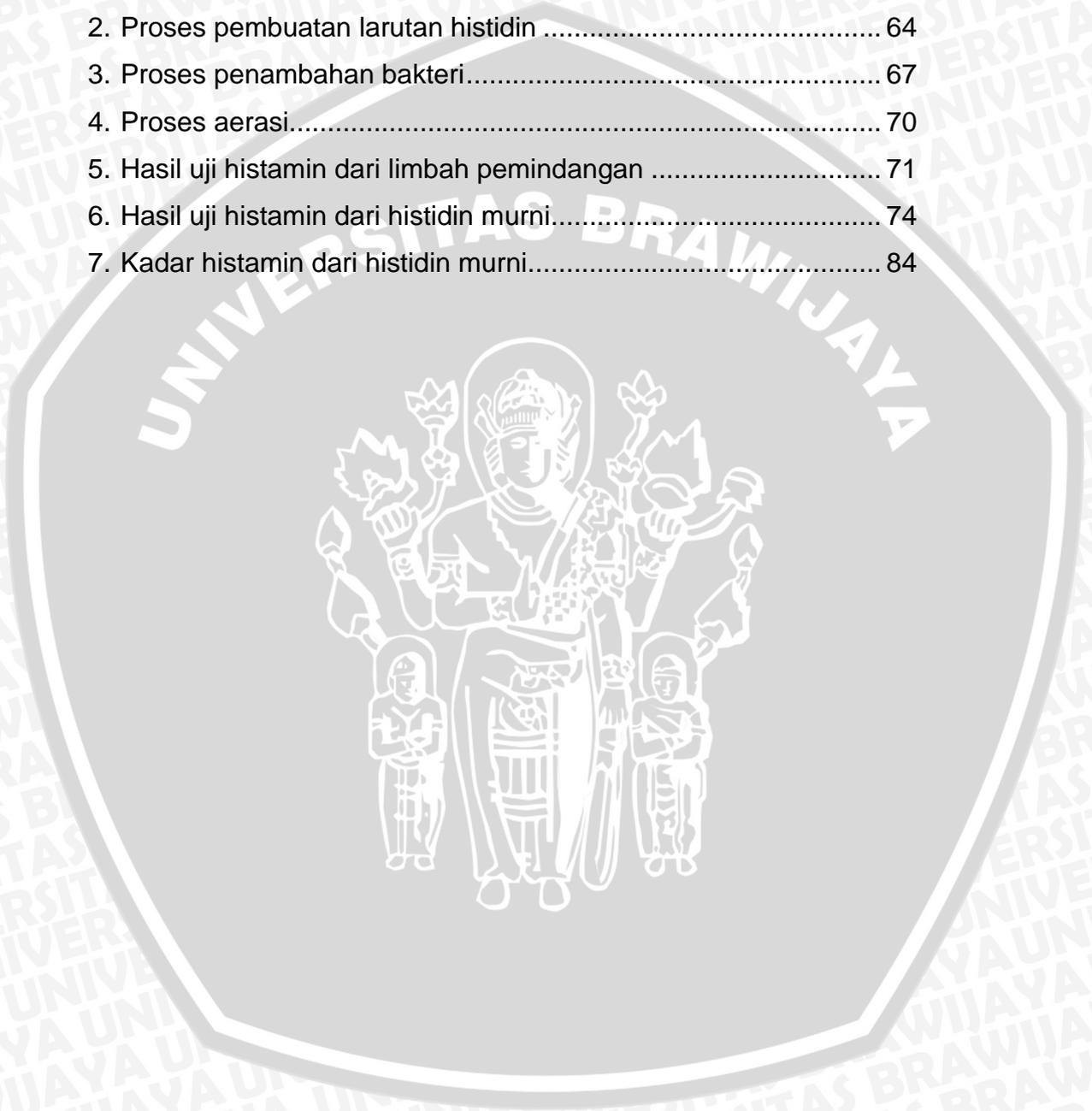


## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Perubahan histidin menjadi histamin .....	9
2. <i>Bacillus</i> sp. ....	11
3. <i>Enterobacter</i> sp. ....	13
4. <i>Planococcus</i> sp. ....	14
5. Diagram optik fluorometer .....	16
6. Alat spektrofлуorometri .....	17
7. <i>Waterbath</i> .....	21
8. <i>Stirrer-plate</i> .....	22
9. Resin .....	23
10. <i>Glasswool</i> .....	23
11. Skema kerja aerasi limbah pemindangan .....	26
12. Skema kerja aerasi larutan histidin murni .....	27
13. Skema kerja aerasi larutan histidin murni dengan ulangan.....	30
14. Skema kerja preparasi alat .....	36
15. Skema kerja pembuatan media cair .....	36
16. Skema kerja peremajaan bakteri .....	37
17. Skema kerja pembuatan larutan pengenceran .....	40
18. Skema kerja pengenceran bakteri .....	40
19. Skema kerja pembuatan larutan histidin .....	41
20. Grafik hasil kadar histamin dari limbah pemindangan.....	44
21. Grafik hasil kadar histamin dari histidin murni.....	47
22. Grafik perbandingan hasil uji histamin dari limbah pemindangan dan dari histidin murni.....	48
23. Grafik pengaruh perlakuan kombinasi penambahan bakteri dan lama aerasi dalam larutan histidin murni terhadap kadar histamin .....	52
24. Grafik pengaruh jenis bakteri terhadap kadar histamin.....	53
25. Grafik pengaruh lama aerasi terhadap kadar histamin .....	54

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halamn
1. Kurva pertumbuhan bakteri .....	61
2. Proses pembuatan larutan histidin .....	64
3. Proses penambahan bakteri.....	67
4. Proses aerasi.....	70
5. Hasil uji histamin dari limbah pemandangan .....	71
6. Hasil uji histamin dari histidin murni.....	74
7. Kadar histamin dari histidin murni.....	84



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Histidin adalah asam amino esensial, yang bermuatan positif sebagai gugus fungsional yang berisi imidazol. Satu dari 22 jenis asam amino yang terdapat pada manusia dan mamalia lainnya. Biogenik amin histamin merupakan modulator penting untuk beberapa proses fisiologis, termasuk neurotransmisi, sekresi asam lambung, dan kesehatan otot polos. Biosintesis histamin dari histidin dikatalis oleh enzim L-histidin dekarboksilasi. Enzim yang berkaitan adalah *phridoxal phosphate* (PDP) – berkaitan dengan dekarboksilasi dan merupakan enzim paling spesifik untuk substrat histidin (Wikipedia, 2011<sup>a</sup>).

Histamin atau dikenal sebagai [2-(4-imidazolyl)ethylamine] terbentuk dari dekarboksilasi oleh enzim yang terdapat secara alami dalam jaringan daging ikan. Jumlah histamin yang dihasilkan melalui aktivitas enzim selama proses autolisis sangat rendah bila dibandingkan dengan histamin yang dihasilkan oleh aktivitas bakteri selama proses pembusukan berlangsung. Dibawah kondisi optimum, jumlah histamin dihasilkan melalui autolisis biasanya kurang dari 5-10 mg/100 g daging ikan. Selain itu produksi histamin juga dipengaruhi oleh suhu dan pH lingkungan (Rispayeni, 2005). Histamin merupakan perubahan dari histidin yang terbentuk di dalam makanan karena aktivitas bakteri penghasil enzim histidin dekarboksilase (Taylor dan Behling, 1982). Histamin mempunyai berat molekul rendah yang terdiri atas cincin imidazol dan sisi rantai

etilamin, komponen yang kecil dan tidak larut air. Histamin berpengaruh terhadap efek fisiologis manusia (Aflal *et al.*, 2006). Dalam SNI (2009), histamin adalah senyawa turunan dari asam amino histidin yang terbentuk karena tindakan bakteri yang memiliki enzim dekarboksilase.

Histidin dekarboksilasi (HDC) adalah enzim yang mengkatalis reaksi pada produksi histamin dari histidin dengan bantuan dari vitamin B6. Pada manusia, enzim histidin dekarboksilasi disandikan oleh gen HDC. Dekarboksilasi histidin membentuk histamin, yaitu suatu reaksi di jaringan tubuh mamalia yang dikatalis oleh enzim dekarboksilasi asam L-amino aromatik yang memiliki spesifitas yang luas. Enzim ini juga mengkatalis reaksi dekarboksilasi dopa, 5-hidroksi-triptofan, fenilalanin, tirosin dan triptofan (Rodwell *et al.*, 2003). Ditambahkan oleh Sims *et al.*, (1992), histamin dihasilkan dari perombakan histidin yang merupakan prekursor histamin. Ditambahkan oleh Guizani *et al.*, (2005), selama proses pembusukan oleh bakteri pembentuk histamin yang mengandung enzim histidin dekarboksilasi. Pembentukan histamin sering disebabkan oleh suhu ikan yang tinggi setelah penangkapan.

Berbagai jenis bakteri yang mampu menghasilkan enzim histidin dekarboksilasi (HDC) adalah bakteri yang menguraikan histidin menjadi histamin termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae* dan *Bacillaceae* (Staruszkiewicz 2002 dalam Allen 2004). Umumnya spesies *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Pedicoccus*, *Photobacterium*, *Salmonella*, *Shigella*, dan *Streptococcus* menunjukkan aktivitas dekarboksilasi asam amino (Kanki *et al.* 2002 dalam Allen 2004).

*Planococcus* sp. adalah bakteri gram positif berbentuk bulat atau kokus yang berhabitat di lautan yang sangat toleran dengan kondisi garam yang tinggi dan tidak bersifat patogen terhadap tanaman (Holt *et al.*,1994).

*Enterobacter* sp. adalah bakteri gram-negatif, fakultatif-anaerob, berbentuk batang dan merupakan bakteri dari keluarga *Enterobacteriaceae*. Beberapa koloni dari bakteri ini patogen dan menyebabkan infeksi oportunistik dalam. *Bacillus* sp. adalah bakteri yang berbentuk basil dimana bakteri ini merupakan bakteri pengurai dari protein menjadi senyawa sederhana.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh penguraian histidin menjadi histamin oleh bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* sp. secara *in vitro* karena *in vitro* adalah proses metabolisme yang terjadi diluar tubuh organisme contohnya pada organ, jaringan, sel, komponen sel, protein dan biomolekul. Sehingga teknik *in vitro* ini lebih sesuai digunakan dalam 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 sering digunakan termasuk teknik *in vitro* yaitu metode spektrofotometri. Metode ini mempunyai prinsip mengekstrak kadar histamin dari sampel contoh dengan menggunakan metanol, sekaligus mengkonversinya ke dalam 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 Identifikasi Masalah

Pada penelitian pendahuluan yaitu bakteri dimasukkan dalam limbah pemindangan. Diduga bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* sp. merupakan bakteri dekarboksilase karena menghasilkan histamin pada uji histamin dalam limbah pemindangan. Oleh karena itu, dilakukan penelitian mengenai pengaruh bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* sp. terhadap penguraian histidin murni secara *in-vitro*. Dari uraian tersebut didapatkan permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah perlakuan waktu yang berbeda mempengaruhi kuantitas histamin yang dihasilkan?
2. Apakah bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* sp. dapat mengubah histidin menjadi histamin?
3. Apakah penggabungan (kombinasi) antar bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* sp. efektif dalam menguraikan histidin?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui kuantitas histamin yang dihasilkan dari perlakuan waktu yang berbeda.

2. Untuk mengetahui pengaruh bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* sp. terhadap kadar histamin dengan penguraian histidin murni.
3. Untuk mengetahui keefektifan dari penggabungan (kombinasi) antar bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* sp.

#### 1.4 Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi dan pengetahuan mengenai bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* sp. dalam aplikasi *in vitro* untuk mengurai histidin menjadi histamin dari perlakuan waktu yang berbeda dengan sehingga dapat digunakan untuk penelitian lebih lanjut.

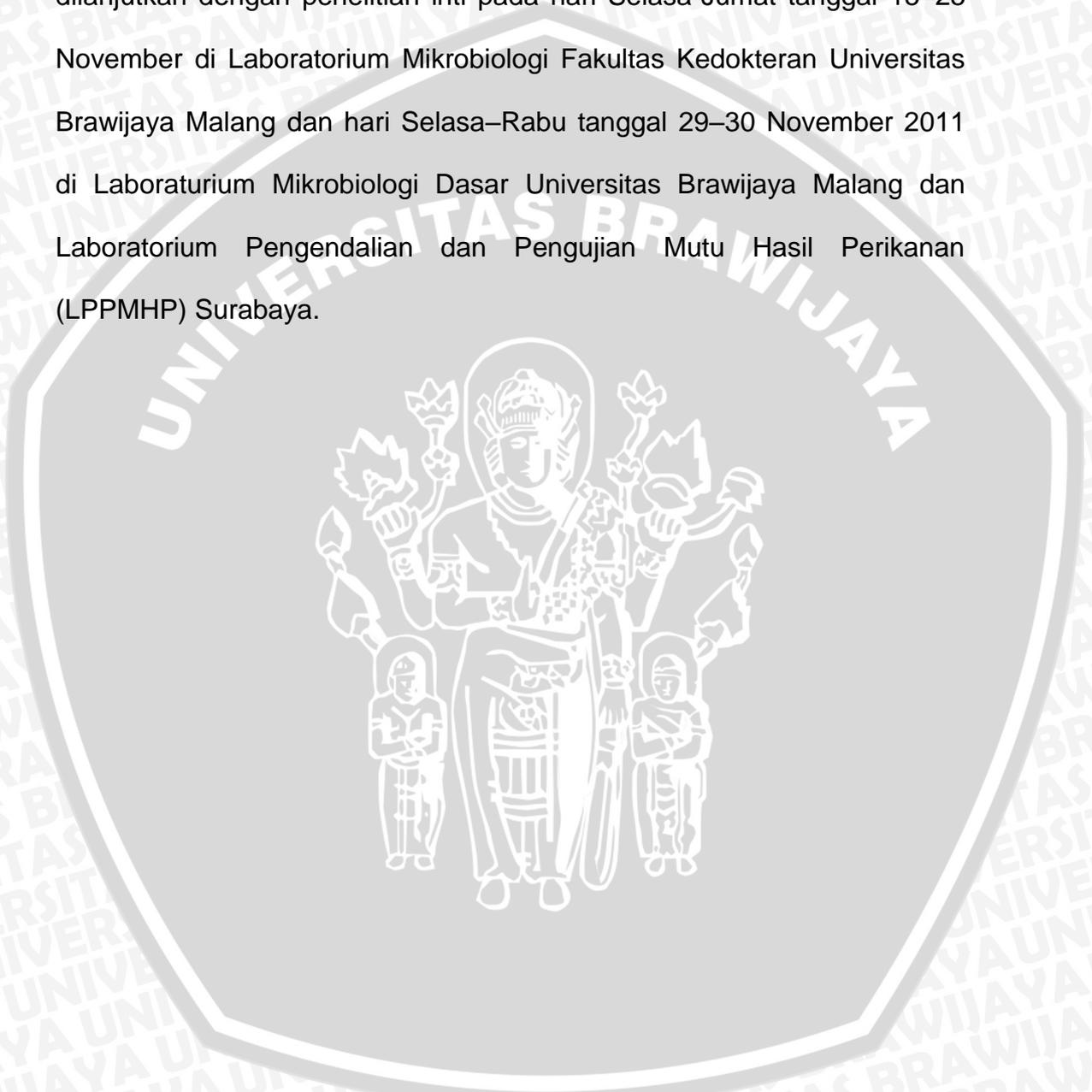
#### 1.5 Hipotesis

Hipotesis yang mendasari penelitian ini adalah :

1. Perlakuan waktu yang berbeda mempengaruhi kadar histamin yang dihasilkan.
2. Penambahan bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* sp. dapat menguraikan histidin menjadi histamin.
3. Penggabungan (kombinasi) antar bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* sp. cukup efektif dalam menguraikan histidin menjadi histamin.

## 1.6 Waktu dan Tempat

Penelitian pendahuluan dilaksanakan pada hari Selasa–Kamis tanggal 16–18 Agustus 2011 di Laboratorium Mikrobiologi Dasar 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 Histamin

*Biogenic Amine* adalah bagian dari berbagai senyawa asam amino dengan kehadiran kelompok *biogenic amine* tertentu terjadi secara alami diberbagai tumbuhan dan hewan. Biogenik amin berkembang sebagai hasil dari dekarboksilasi asam amino melalui aksi anaerob (Sander, 1996).

Biogenik amina merupakan komponen dasar nitrogen yang dibentuk terutama oleh dekarboksilasi asam amino atau dengan transminasi dari aldehid dan keton. Biogenik amin merupakan sumber nitrogen dan prekursor untuk sintesis hormon, alkaloid, asam nukleat dan protein. Mereka juga dapat mempengaruhi proses dalam organisme seperti pengaturan suhu tubuh, asupan gizi, kenaikan atau penurunan tekanan darah (Karovicova *et al.*, 2003).

Biogenik amin merupakan molekul organik berbobot rendah yang diproduksi oleh sebagian besar dekarboksilasi asam amino dari beberapa aksi mikroba tertentu (Munoz, 2008). Biogenik amin adalah senyawa amin yang terbentuk sebagai hasil proses dekarboksilasi asam amino bebas yang terdapat di dalam tubuh ikan. Masalah yang dihadapi dalam pembuatan ikan pindang adalah terbentuknya suatu senyawa yang dapat menyebabkan keracunan yaitu biogenik amin akibat sanitasi yang buruk selama pengolahan maupun penyimpanan. Senyawa biogenik amin yang sering terbentuk pada ikan pindang adalah histamin (Danur, 1993).

Kandungan biogenik amin pada makanan bergantung pada proses bioteknologi yang kompleks dalam prosedur produksi. Ini dipengaruhi oleh faktor tertentu seperti pertumbuhan bakteri, tersedianya asam-asam amino bebas, perkembangan mikrobia seperti itu, availabilitas dari amino asam bebas, adanya enzim dekarboksilasi dan kondisi suhu yang ditinggikan. Enzim yang dilibatkan dalam produksi histamin, *histidine decarboxylase*, memerlukan suhu lebih besar dari 15° C dan 30° C adalah suhu optimum. Pada area tropis di dunia, ikan sering tertangkap di suhu melebihi 20° C. Apabila ikan tidak didinginkan dengan seketika, kondisi baik untuk produksi biogenik amin asalkan bakteri mengandung enzim dekarboksilasi. Pertumbuhan bakteri akan terhenti pada suhu rendah dari 5° C, bagaimanapun aktivitas enzimatik akan tetap berlanjut, menghasilkan dalam produksi amin selanjutnya (Ahmed, 1991).

Histamin adalah senyawa *biogenic amin* hasil perombakan asam amino histidin bebas yang berada dalam daging ikan yang diproduksi secara biologis melalui proses dekarboksilasi dari asam amino bebas serta terdapat pada berbagai bahan pangan seperti ikan, daging merah, keju, dan makanan fermentasi (Keer *et al.*, 2002).

Histamin merupakan komponen yang kecil, mempunyai berat molekul rendah yang terdiri atas cincin imidazol dan sisi rantai etilamin. Histamin juga merupakan komponen yang tidak larut air. Histamin adalah salah satu amin biogenik yang mempunyai pengaruh terhadap efek fisiologis manusia (Aflal *et al.*, 2006). Histamin berasal dari perubahan histidin yang terbentuk di dalam makanan karena aktivitas bakteri

penghasil enzim histidin dekarboksilase (Taylor dan Behling, 1982). Menurut Sumner *et al.*, (2004), histamin adalah senyawa amina biogenik yang terbentuk dari asam amino histidin akibat reaksi dengan enzim dekarboksilase.

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). Ditambahkan pula oleh Putro (2002), pembentukan biogenik amin ini tergantung dari ketersediaan asam amino bebas, keberadaan dekarboksilase yang dikandung oleh mikroorganisme (bakteri dengan enzim yang dapat menyebabkan dekarboksilasi asam amino bebas) dan kondisi yang mendukung pertumbuhan mikroba dan aktivitas enzimatik.

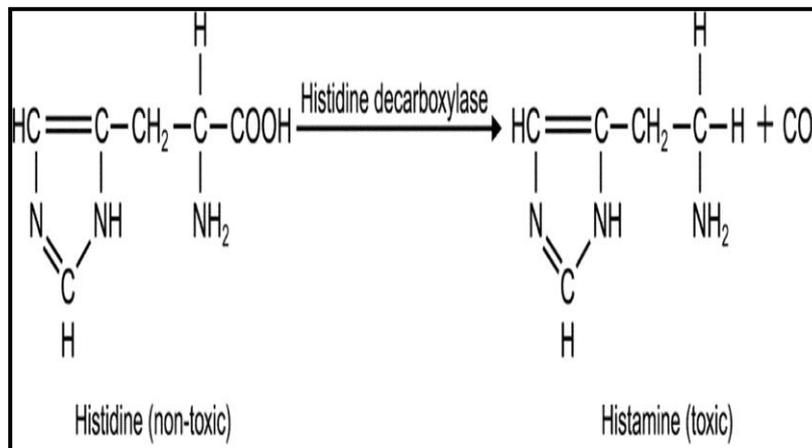
## 2.2 Histidin Dekarboksilase

Histidin dekarboksilase (HDC) adalah enzim yang mengkatalis reaksi pada produksi histamin dari histidin. Enzim histidin dekarboksilase disandikan oleh gen HDC. Biogenik amin histamin merupakan modulator penting untuk beberapa proses fisiologis, termasuk neurotransmisi, sekresi asam lambung, dan kesehatan otot polos. Biosintesis histamin dari histidin dikatalis oleh enzim L-histidin dekarboksilase. Enzim yang

berkaitan adalah *pyridoxal phosphate* (PDP)- ikatan dekarboksilase dan merupakan enzim paling spesifik untuk substrat histidin (Wikipedia, 2011<sup>b</sup>).

Menurut Widiastuty (2004), banyak zat telah diuji untuk mengetahui kemampuannya untuk menghambat enzim histidin dekarboksilase. Walaupun beberapa inhibitor kuat telah ditemukan, tidak satupun yang sepenuhnya spesifik untuk menghambat histidin dekarboksilase tanpa secara bersamaan menghambat enzim lain. Pada faktanya, senyawa yang dibentuk dari pengaruh ketersediaan dari *co-decarboxylase pyridoxal 5 – phosphate* tidak hanya akan menghambat *histidine decarboxylase* tetapi seluruh asam amino dekarboksilase dan *transaminase*, untuk *pyridoxal phosphat* ko-enzim juga dihambat.

Berbagai jenis bakteri yang mampu menghasilkan enzim histidin dekarboksilase (HDC) termasuk famili Enterobacteriaceae dan Bacillaceae (Staruszkiewicz 2002 dalam Allen 2004). Umumnya spesies *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klasiella*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, dan *Streptococcus* menunjukkan aktivitas dekarboksilase asam amino (Kanki *et. al.*, 2002 dalam Allen 2004). Perubahan histidin menjadi histamin dapat dilihat pada gambar 1 dibawah ini :



**Gambar 1. Perubahan histidin menjadi histamin**

(Mc Lauchlin *et al.*, 2005)

### 2.3 Bakteri

Bakteri merupakan mikroba prokariotik uniselular, berkembang biak secara aseksual dengan pembelahan sel. Bakteri tidak berklorofil kecuali beberapa yang bersifat fotosintetik. Bakteri ada yang dapat hidup bebas, parasitik, saprofitik, patogen pada manusia, hewan dan tumbuhan. Habitatnya tersebar luas di alam, dalam tanah, atmosfer (sampai  $\pm 10$  km di atas bumi), di dalam lumpur, dan di laut. Bakteri mempunyai bentuk dasar bulat, batang, dan lengkung. Bentuk bakteri juga dapat dipengaruhi oleh umur dan syarat pertumbuhan tertentu. Bakteri dapat mengalami involusi, yaitu perubahan bentuk yang disebabkan faktor makanan, suhu, dan lingkungan yang kurang menguntungkan bagi bakteri. Selain itu, beberapa bakteri dapat mengalami pleomorfi, yaitu bentuk dan ukuran yang bermacam-macam dan teratur walaupun ditumbuhkan pada syarat

pertumbuhan yang sesuai. Umumnya bakteri berukuran 0,5-10  $\mu\text{m}$  (Wawan, 2010).

### 2.3.1 Bakteri Dekarboksilase

Bakteri yang memiliki enzim histidin dekarboksilase atau biasa disebut bakteri penghasil histamin, sebagian besar termasuk ke dalam famili Enterobacteriaceae (Indriati dan Arifah, 2008). Adapun menurut Indriati *et al.*, (2006), 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 histamin.

Bakteri pembentuk histamin akan membentuk koloni berwarna ungu dengan latar belakang medium berwarna kuning. Histamin yang terbentuk akan meningkatkan pH medium, sehingga terjadi perubahan warna kuning menjadi ungu (Wibowo, 2007).

#### 2.3.1.1 *Bacillus* sp.

Klasifikasi bakteri *Bacillus* sp. dalam Zipcodezoo (2011<sup>a</sup>), adalah sebagai berikut :

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



Gambar 2. *Bacillus* sp.

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

Mikroba yang berperan dalam pelarutan fosfat adalah bakteri, jamur dan aktinomisetes. Dari golongan bakteri antara lain: *Bacillus*

*B. firmus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. polymixa*, *B. megatherium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* dan *Mycobacterium* (Nursanti dan Madjid, 2009).

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

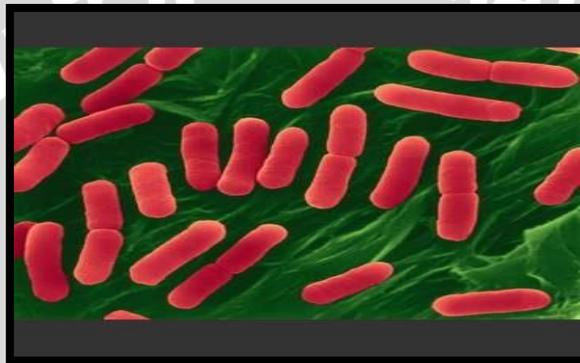
- *Bacillus brevis*, menghasilkan terotrisin
- *Bacillus subtilis*, menghasilkan basitrasin
- *Bacillus polymyxa*, menghasilkan polimixin

Menurut Krieg (1989), dalam buku *Bergey's Manual of Sytematic Bacteriology-Ninth Edition*, bakteri *Bacillus megaterium* ini akan tumbuh pada media glukosa. Selain itu media juga mengandung asam dari arabinose, silose dan manitol. Pertumbuhan bakteri pada media mengalami peleburan secara aktif dari nutrisi gelatin, casein dicerna secara aktif dan fenialanin diaminasi, nitrat diasimilasi tetapi bukan akumulasi nitrit pada medium.

### 2.3.1.2 *Enterobacter* sp.

Klasifikasi bakteri *Enterobacter* sp. dalam Zipcodezoo (2011<sup>b</sup>), adalah sebagai berikut :

Kerajaan : Bacteria  
Filum : Proteobacteria  
Kelas : Gammaproteobacteria  
Ordo : Enterobacteriales  
Famili : Enterobacteriaceae  
Genus : *Enterobacter*  
Spesies : *Enterobacter* sp.



Gambar 3. *Enterobacter* sp.

*Enterobacter* sp. tidak memfermentasi D-sorbitol. Untuk penghasil  $\beta$ -xilosidase dan gelatinase hasil dari bakteri ini adalah negatif dan positif. Bakteri ini merupakan bakteri penghasil ODC dan LDC, tetapi tidak menghasilkan ADH. *Enterobacter* sp. adalah urease positif, sedangkan spesies *Enterobacter* lainnya adalah urease-negatif. *Enterobacter* sp. kadang muncul menjadi patogen oportunistik dan telah diisolasi dari urin, nanah, dahak, darah dan spesimen klinis lainnya. Spesies ini telah terlibat dalam sebuah wabah nosokomial infeksi saluran kemih (Richard *et al.* 1976 dalam Krieg 1989).

*Enterobacter* sp. adalah bakteri gram negatif, fakultatif-anaerob, berbentuk batang dan merupakan bakteri dari keluarga Enterobacteriaceae. Beberapa koloni dari bakteri ini patogen dan menyebabkan infeksi oportunistik

dalam. Kantung kemih dan saluran pernafasan adalah bagian yang sering terinfeksi (Wikipedia, 2010). Akan tetapi, bakteri *Enterobacter* sp. juga mempunyai manfaat lain yaitu sebagai pelarut zat P dalam meremediasi tanah tercemar. Nursanti dan Madjid (2009) mengatakan bahwa, bakteri pelarut P (*Pseudomonas putida* dan *Enterobacter gergoviae*) mampu meningkatkan kelarutan P pada tanah ultisol.

### 2.3.1.3 *Planococcus* sp.

Klasifikasi bakteri *Planococcus* sp. dalam Zipcodezoo (2011<sup>o</sup>), adalah sebagai berikut :

Kerajaan : Animalia  
Filum : Arthropoda  
Kelas : Insecta  
Ordo : Hemiptera  
Famili : Pseudococcidae  
Genus : *Planococcus*  
Spesies : *Planococcus* sp.



Gambar 4. *Planococcus* sp.

*Planococcus* sp. dapat ditemukan pada tanah yang *hiper* salin, barang-barang yang mengandung garam tinggi dan makanan laut makarel (Rodriguez,1988). *Planococcus* sp. 1, bentuk selnya bulat, diameter

koloninya 1,0-1,2  $\mu\text{m}$ , koloni muncul di atas permukaan media NA. Warna koloninya orange, penataan selnya strepto, termasuk kepada bakteri gram positif. Berdasarkan pergerakannya termasuk ke dalam bakteri yang mampu bergerak (motilitas positif). Kebutuhan terhadap oksigen termasuk aerob, katalase positif, temperatur optimumnya adalah 27-37 $^{\circ}$  C. *Planococcus* sp. 2, bentuk selnya bulat, diameter koloninya 1,0-1,2  $\mu\text{m}$ , koloni muncul di atas permukaan media NA, warna koloninya putih keruh, penataan selnya mono, diplo dan strepto, termasuk kepada bakteri gram positif, berdasarkan pergerakannya termasuk ke dalam bakteri yang mampu bergerak (motilitas positif). Kebutuhan terhadap oksigen termasuk aerob, katalase positif, gelatin positif, temperatur optimumnya adalah 27-37 $^{\circ}$  C (Usu, 2011). Adapun menurut Holt *et al.*, (1994), *Planococcus* sp. adalah bakteri gram positif berbentuk bulat atau kokus yang berhabitat di lautan yang sangat toleran dengan kondisi garam yang tinggi dan tidak bersifat patogen terhadap tanaman.

#### 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, 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).

Menurut Veteriner (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.

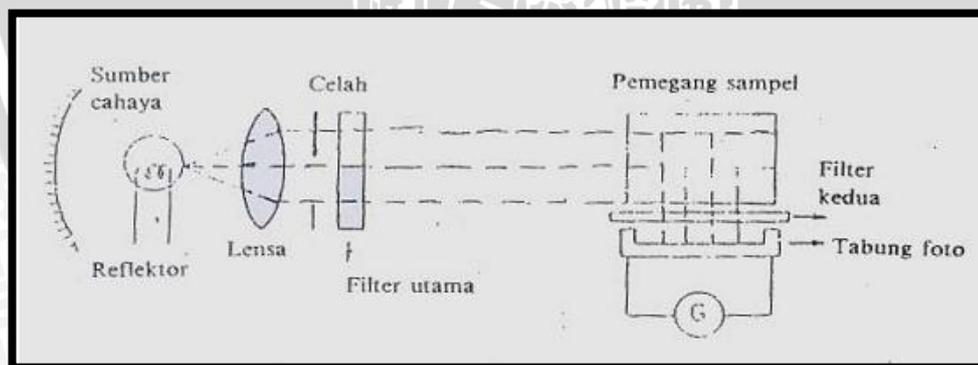
Kultur *in vitro* adalah suatu teknik untuk mengisolasi, sel, protoplasma, jaringan, dan organ dan menumbuhkan bagian tersebut pada nutrisi yang mengandung zat pengatur tumbuh tanaman pada kondisi aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman sempurna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

## 2.5 Spektrofluorometri

Spektrofluorometri adalah metode analisis kimia kuantitatif yang berdasarkan *fluorecence*. *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 spektrofluorometer 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 spektrum fluoresensi sampel.
- Detektor 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.

Metode spektrofлуорometri mempunyai limit deteksi yang rendah dengan kemampuan analisis kimia relatif 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 Spektrofлуорometer (Perkin; Elmer, 1981)**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



### 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. Bahan lain yang digunakan adalah biakan murni bakteri didapat dari lingkungan perairan limbah pemindangan yaitu *Enterobacter* sp. yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Dan bakteri endogenous mangrove yaitu *Bacillus* sp. serta bakteri *Planococcus* sp. Media TSB untuk pertumbuhan *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* sp., larutan NaCl, aquades, air ledeng, kertas saring, tisu, sarung tangan, masker, sabun cair, dan waring. Sedangkan untuk pembuatan larutan histidin : aquabides dan serbuk histidin. Serbuk histidin yang digunakan yakni, histidin standar yang didapat dari perusahaan di Singapore. Untuk pengujian histamin dibutuhkan : metanol, aquades, *glasswool*, NaOH 1 N, HCl 0,1 N, *Orto-ptalatdikarbosildehyd* (OPT) 0,1%, asam *phospat* ( $H_3PO_4$ ) 3,57 N, resin penukar ion jenis *Dowex* 1-X8 50-10 *mesh*, larutan standar histamin, dan larutan kerja.

#### 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 pembuatan larutan histidin : timbangan analitik, erlenmeyer, *beaker glass*, spatula. Peralatan aerasi larutan histidin yang

digunakan adalah botol plastik dan seperangkat aerator, serta *freezer*. 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 dari 2 tahap yaitu tahap I adalah mencari lama waktu aerasi yang terbaik dari limbah pemandangan dan tahap II adalah 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 tahap I limbah pemindangan dengan penambahan *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* sp. masing-masing sebanyak 0,6 ml. Tahap II histidin murni dengan penambahan *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Planococcus* sp. masing-masing sebanyak 0,6 ml dan gabungan antar 3 bakteri tersebut masing-masing sebanyak 0,2 ml. Perlakuan tanpa penambahan bakteri digunakan sebagai kontrol dan merupakan pembanding 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 eksitasi 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  $\pm$  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  $60^{\circ}$  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

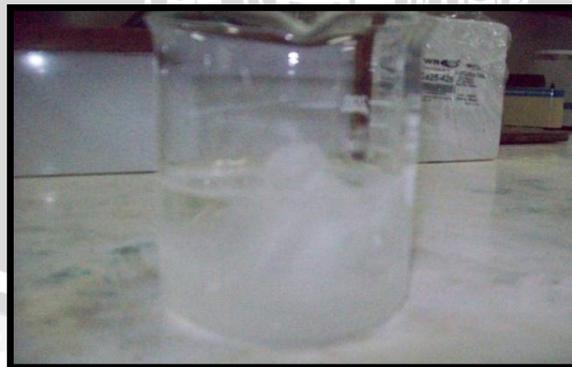
### Persiapan Kolom Resin

- Masukkan *glasswool* ke dalam kolom resin setinggi  $\pm 1,5$  cm
- Masukkan resin dalam medium air ke kolom resin setinggi  $\pm 8$  cm, pertahankan volume air yang berada di atas resin  $\pm 1$  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  $\pm 1$  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<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 3,57 N, kocok

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

### Perhitungan

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

$$y = a + bx$$

keterangan :

y = fluoresensi sampel;

a = intersep;

b = slope;

x = konsentrasi sampel yang akan dihitung

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

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

Keterangan :

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

Penjelasan :

- **Intersep (*Intercept*)**

Intersep adalah titik perpotongan antara suatu garis regresi dengan sumbu Y pada diagram/sumbu kartesius saat nilai  $X = 0$ . Sedangkan definisi secara statistik adalah nilai rata-rata pada variabel Y apabila nilai pada variabel X bernilai 0. Dengan kata lain, apabila X tidak memberikan kontribusi, maka secara rata-rata, variabel Y akan bernilai sebesar intersep. Perlu diingat, intersep hanyalah suatu konstanta yang memungkinkan munculnya koefisien lain didalam regresi. Intersep tidak selalu dapat atau perlu untuk diinterpretasikan.

Apabila data pengamatan pada variabel X tidak mencakup 0 atau mendekati 0, maka intersep tidak memiliki makna yang berarti, sehingga tidak perlu diinterpretasikan.

- **Slope**

Secara matematis, slope merupakan ukuran kemiringan dari suatu garis. Slope adalah koefisien regresi untuk variabel X (variabel bebas).

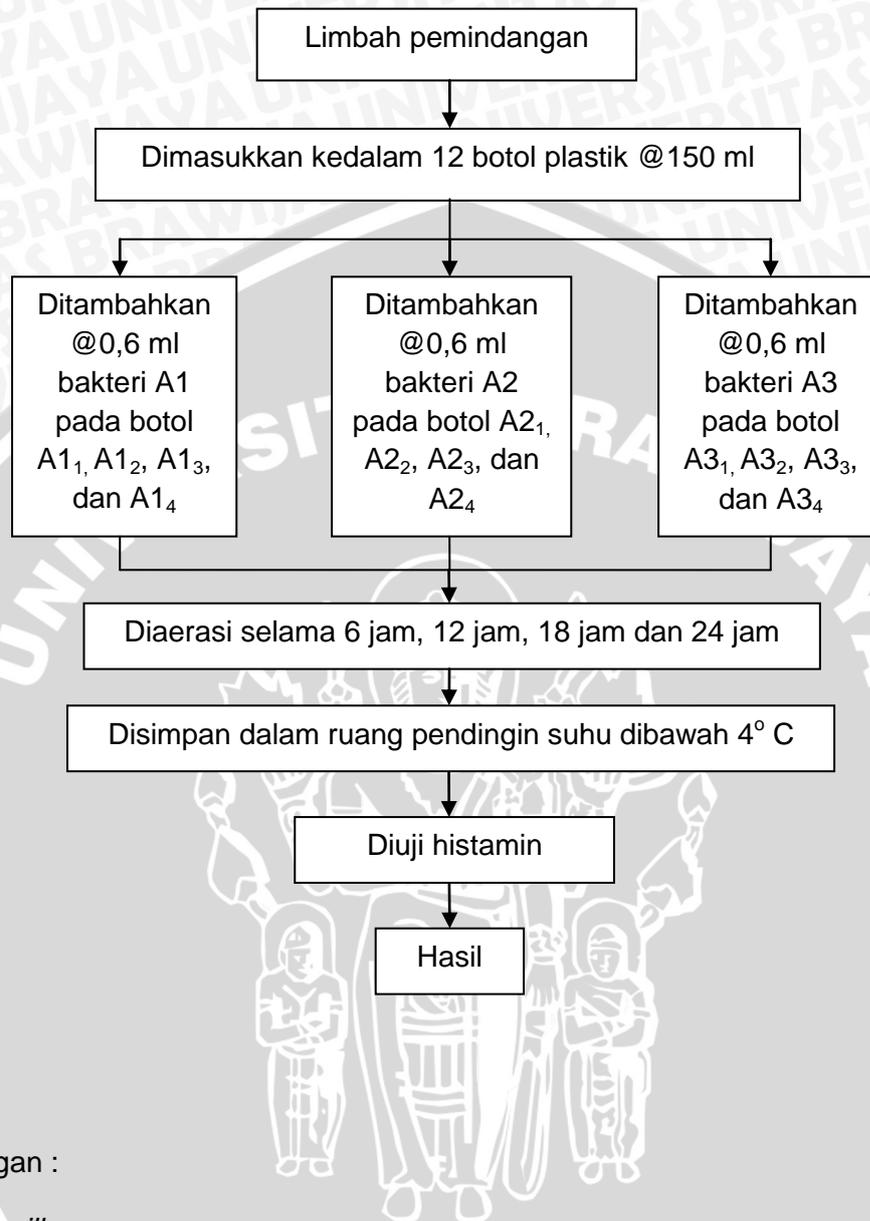
Dalam konsep statistika (sumbangan) yang diberikan suatu variabel X terhadap Y. Nilai slope dapat pula diartikan sebagai rata-rata pertambahan (pengurangan) yang terjadi pada variabel Y untuk setiap peningkatan satu satuan variabel X.

### 3.3.1.2 **Prosedur Penelitian**

Secara garis besar penelitian pendahuluan tahap 1 dan 2 dapat dilihat pada Gambar 11 dan 12 dibawah ini.



Gambar 11. Skema Kerja Aerasi Limbah Pemandangan



Keterangan :

A1 = *Bacillus* sp.

A2 = *Enterobacter* sp.

A3 = *Planococcus* sp.

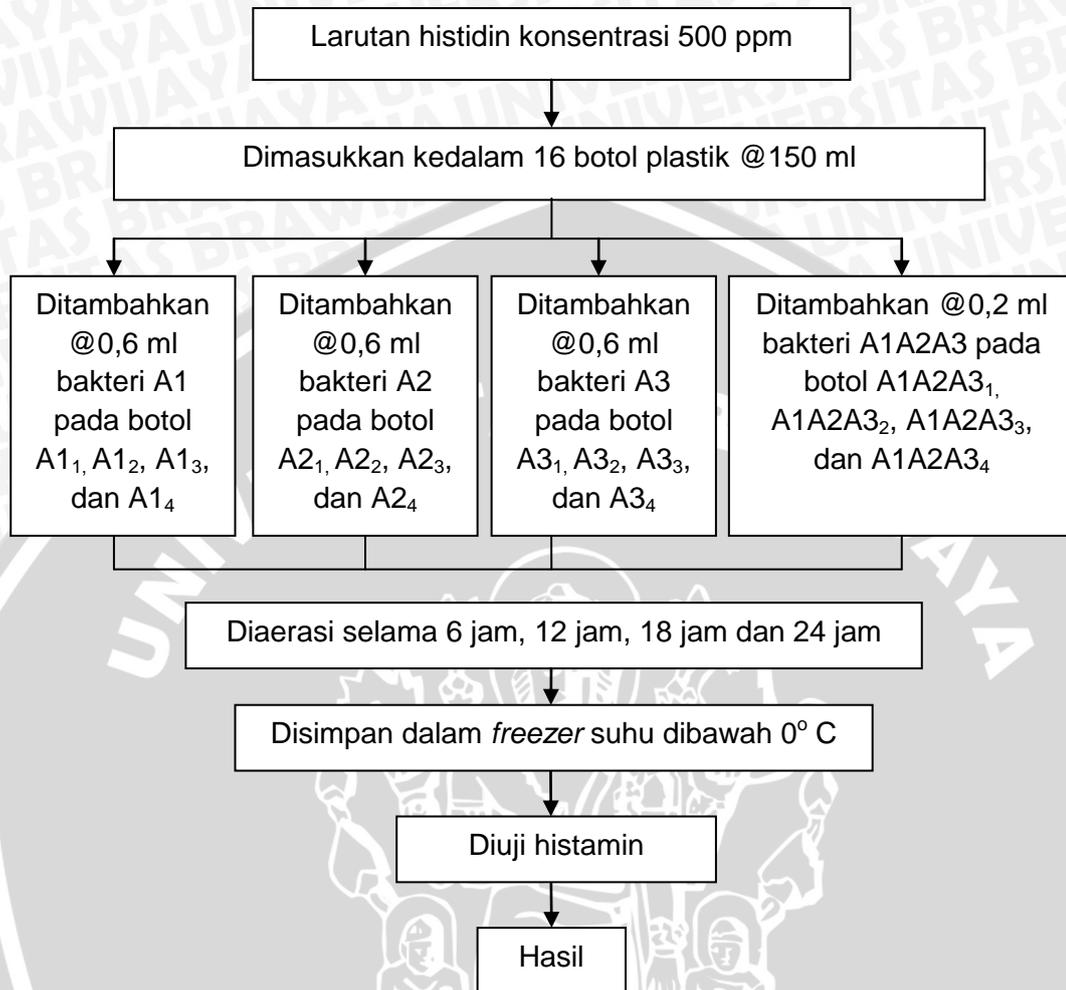
1 = Perlakuan 6 jam

2 = Perlakuan 12 jam

3 = Perlakuan 18 jam

4 = Perlakuan 24 jam

Gambar 12. Skema Kerja Aerasi Larutan Histidin Murni



Keterangan :

- A1 = *Bacillus* sp.
- A2 = *Enterobacter* sp.
- A3 = *Planococcus* 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 *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Planococcus* sp., dan gabungan antar ketiga 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 *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Planococcus* sp. masing-masing sebanyak 0,6 ml dan gabungan antar 3 bakteri tersebut masing-masing sebanyak 0,2 ml. Perlakuan tanpa penambahan bakteri digunakan sebagai kontrol dan merupakan pembanding da 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 :

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

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

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

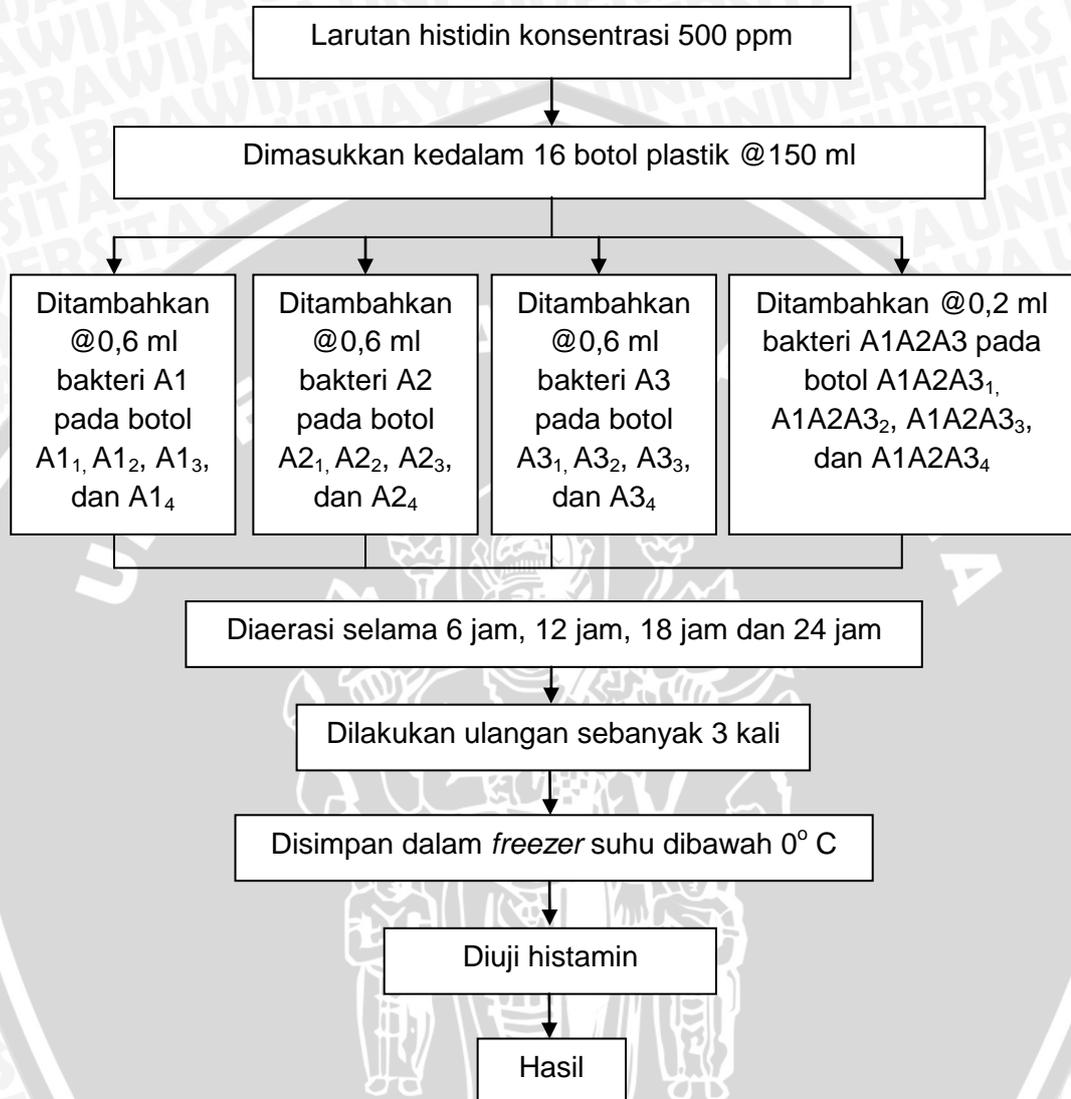
Membandingkan t hitung dengan t tabel :

- 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 13 dibawah ini adapun analisa yang digunakan, yakni analisa uji histamin dengan menggunakan metode spektrofotometri.

**Gambar 13. Skema Kerja Aerasi Larutan Histidin Murni Dengan Ulangan**



Keterangan :

A1 = *Bacillus* sp.

A2 = *Enterobacter* sp.

A3 = *Planococcus* 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 faktor 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 % (A)	Lama Aerasi (jam) (P)	1	2	3
A1		P1	A1P1	A1P1	A1P1
		P2	A1P2	A1P2	A1P2
		P3	A1P3	A1P3	A1P3
		P4	A1P4	A1P4	A1P4
A2		P1	A2P1	A2P1	A2P1
		P2	A2P2	A2P2	A2P2
		P3	A2P3	A2P3	A2P3
		P4	A2P4	A2P4	A2P4
A3		P1	A3P1	A3P1	A3P1
		P2	A3P2	A3P2	A3P2
		P3	A3P3	A3P3	A3P3
		P4	A3P4	A3P4	A3P4
A4		P1	A4P1	A4P1	A4P1
		P2	A4P2	A4P2	A4P2
		P3	A4P3	A4P3	A4P3
		P4	A4P4	A4P4	A4P4

Keterangan :

- A (1, 2, 3, 4) = 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 :

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

Dimana :

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



$\mu$  = nilai rata-rata umum

$\alpha_i$  = pengaruh faktor perlakuan utama

$\beta_j$  = pengaruh faktor perlakuan kedua

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

$\varepsilon_{ijk}$  = 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 lengkap (RAL)**

	faktorial					
Sumber keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
Ulangan						
Perlakuan						
Interaksi						
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 (Pembiasaan Bakteri)

Sebelum melakukan penelitian terlebih dahulu dilakukan sterilisasi alat.

Sterilisasi adalah suatu proses penguapan yang digunakan untuk beberapa

produk dalam situasi dimana produk-produk tersebut terhindar dari infeksi (Dart, 2003). Karena stabilitas panas dari bakteri yang tidak bisa dihilangkan dengan cara direbus. Sterilisasi menggunakan uap panas dilakukan pada suhu dan tekanan yang tinggi di dalam autoklaf. Mesin ini beroperasi pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dan dapat membunuh mikroba (Nicklin *et al.*, 1999). Selain itu alat yang harus disterilkan yaitu laminaran, dengan cara menyemprot bagian dalamnya dengan cairan aseptis (alkohol 70%). Kemudian lap semua bagiannya menggunakan serbet makan bersih agar aseptis, ditutup kaca laminaran dan menekan tombol UV untuk menghidupkan sinar UV pada alat yang berfungsi sebagai pensteril laminaran selama 1 jam. Sambil menunggu laminaran selesai disterilkan, kemudian membuat larutan untuk perkembangbiakan bakteri dekarboksilasi *Bacillus sp.*, *Enterobacter sp.*, dan *Planococcus sp.* yaitu media TSB. Pertama yaitu menimbang media TSB sebanyak 18 gram menggunakan timbangan digital. Kemudian media TSB dimasukkan ke dalam erlenmeyer 1000 ml dan diberi aquades sebanyak 600 ml. Kemudian dimasukkan dalam waterbath suhu  $100^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit, selama pemanasan diwaterbath sesekali digoyang erlenmeyer untuk membantu pelarutan (homogen). Jika sudah larut sempurna dengan tidak adanya agar yang menempel pada dinding Erlenmeyer, medium tersebut disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  tekanan 1 atm selama 15 menit dengan tujuan menghilangkan kontaminan yang ada pada media. Setelah disterilisasi, media cair didiamkan sampai dingin agar botol tidak pecah ketika diberi perlakuan lebih lanjut. Adapun komposisi dari media TSB dapat dilihat pada Tabel 3 dibawah ini :

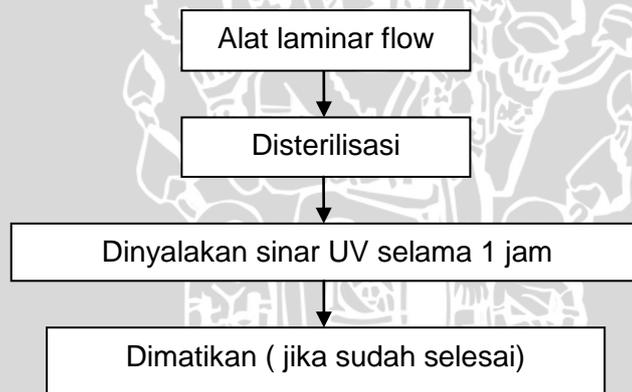
Tabel 3. Komposisi Medium *Tryptone Soy Broth* (TSB)

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

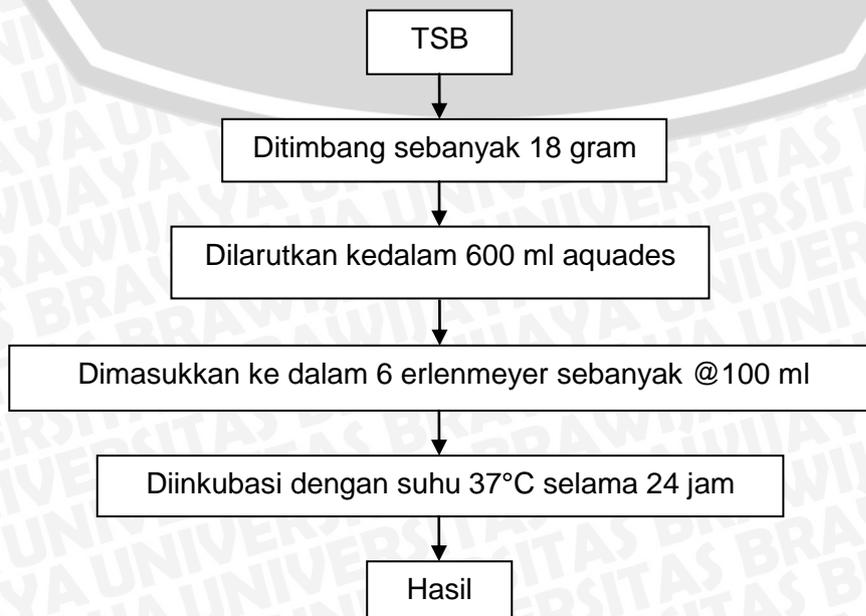
Setelah 1 jam, sinar UV pada laminaran dimatikan lalu lampu laminaran dinyalakan untuk memudahkan penglihatan pada saat penanaman bakteri. Laminaran bagian dalam disemprot dengan alkohol agar aseptis. Kemudian tangan yang telah dipasang dengan sarung tangan disemprot juga agar tidak ada kontaminasi saat penanaman bakteri. Kemudian bunsen dinyalakan dan diletakkan ke dalam laminaran beserta isolat murni bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* sp. dan media cair yang diletakkan di rak tabung reaksi. Lalu jarum osse pada bagian ujungnya disemprot dengan alkohol dan dipanaskan di atas bunsen. Hal tersebut dilakukan untuk menghindari kontaminasi alat pada saat penanaman bakteri. Kemudian diambil sampel bakteri yang akan dibiakkan, dibuka tutup tabung sambil dipanaskan di atas bunsen untuk menjaga kondisi tetap aseptis. Jarum osse disentuh di media isolat bakteri untuk mengurangi panas dari jarum osse, sehingga bakteri yang diambil tidak mati. Selanjutnya diambil sebanyak 1 osse bakteri dengan cara menggores isolat dan dimasukkan ke dalam media cair baru yang telah disiapkan (jarum osse dimasukkan di permukaan saja agar tidak terjadi kontaminasi, karena hanya bagian ujung jarum

osse yang disterilkan). Bakteri yang telah diinokulasi pada media baru, dipanaskan lagi diatas bunsen bagian permukaan erlenmeyernya dan segera ditutup. Jarum osse dipanaskan diatas bunsen lagi bagian ujungnya agar kembali steril saat digunakan untuk membiakkan bakteri yang lain. Setelah itu, bakteri dan media dihomogenkan, lalu diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, dilihat ada atau tidak endapan pada media, dimana adanya endapan berarti pembiakan telah berhasil dilakukan. Erlenmeyer diberi label nama bakteri yang telah dibiakkan agar tidak terjadi kesalahan pada saat pengamatan perlakuan fermentasi. Prosedur kerja preparasi ruang, pembuatan media cair dan peremajaan bakteri dapat dilihat pada Gambar 14, 15, dan 16.

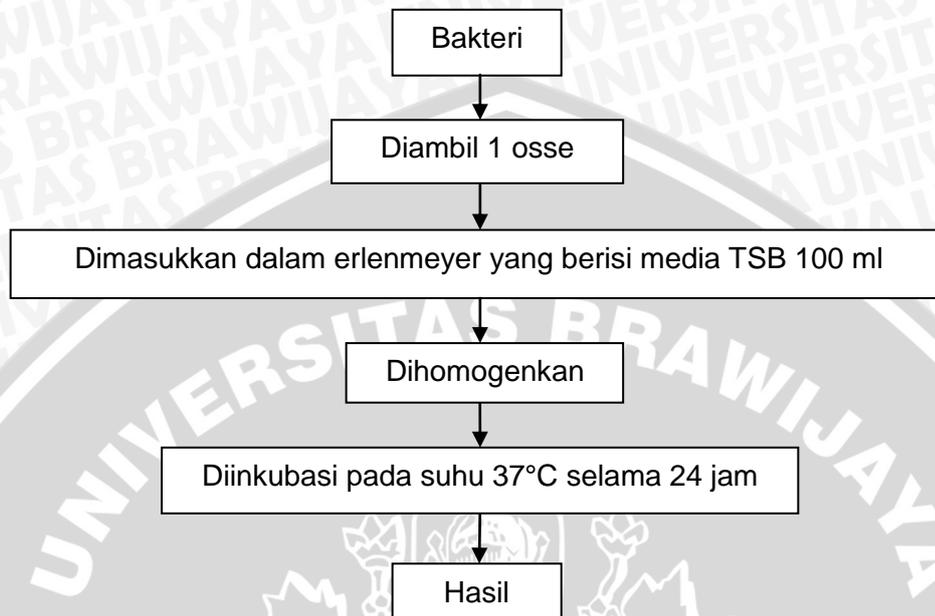
**Gambar 14. Skema Kerja Preparasi Ruang**



**Gambar 15. Skema Kerja Pembuatan Media Cair**



**Gambar 16. Skema Kerja Peremajaan Bakteri**



#### **3.4.2 Penelitian Tahap II (Pengenceran Bakteri)**

Dalam melakukan pengenceran dan penanaman, kondisi lingkungan di sekitarnya harus aseptis agar mikroorganismenya yang tumbuh nantinya benar-benar mikroorganismenya yang berasal dari sampel yang diuji. Adapun cara pengkondisian aseptis adalah dengan menyalakan bunsen dan menyemprotkan alkohol. Agar tidak tertukar maka setiap erlenmeyer diberi tanda dengan menggunakan kertas 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 2,916 gram. Kemudian NaCl dimasukkan ke dalam *beaker glass* 500 ml dan diberi aquades sebanyak 324 ml, lalu di aduk hingga homogen menggunakan spatula. Media cair tersebut dimasukkan kedalam 36 tabung reaksi bertutup, masing-masing tabung diberi sebanyak 9 ml. Tabung reaksi bertutup yang berisi media cair disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu  $12^{\circ}$  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. Pengenceran dilakukan sampai  $10^{-6}$  dari 3 bakteri (*Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* sp.) dan dilakukan secara duplo.

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 : *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* sp. dan media cair pengenceran yang diletakkan di rak tabung reaksi. Pipet volume yang berukuran 1 ml disemprot pada bagian ujungnya 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

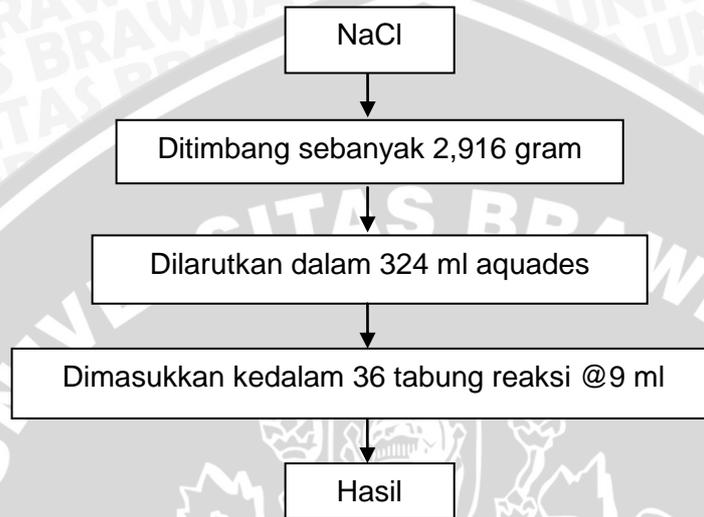
ml dengan menggunakan pipet volume, kemudian dibuka tutup tabung media cair pengenceran sambil dipanaskan diatas bunsen untuk menjaga kesterilan/kondisi tetap aseptis. Setelah itu, 1 ml bakteri tersebut di masukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml NaCl sebagai larutan pengencer yang bersifat isotonis (pengenceran  $10^{-1}$ ) dan di homogenkan agar tercampur rata. Setelah itu di lakukan pengenceran bertingkat yang bertujuan untuk mengurangi kepadatan mikroba. Adapun cara melakukan pengenceran 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, yakni  $N_1.V_1 = N_2.V_2$ .

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 setelah inkubasi akan terbentuk koloni dalam jumlah yang dapat dihitung.

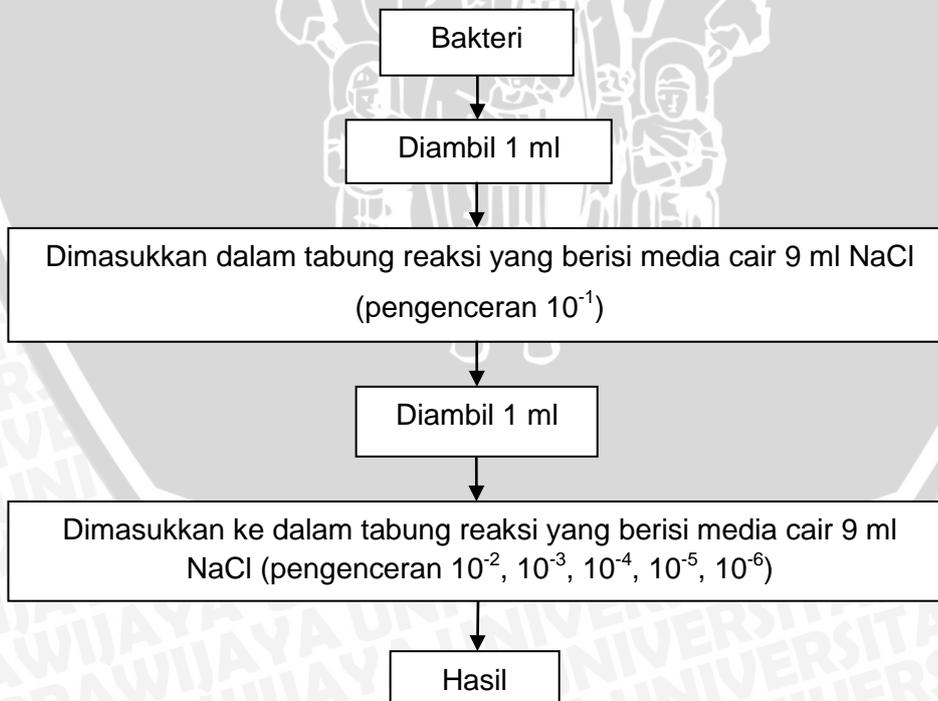
Proses pengenceran adalah mencapai larutan pekat (konsentrasi tinggi) dengan cara menambahkan pelarut agar diperoleh volume akhir yang lebih besar (Brady, 1999). Adapun menurut Dwijosaputro (1989), tujuan dari pengenceran adalah untuk mendapatkan satu koloni murni dan selanjutnya koloni yang didapat kita jadikan piaraan murni.

Prosedur kerja pembuatan larutan pengenceran dan pengenceran bakteri dapat dilihat pada Gambar 17 dan 18.

**Gambar 17. Skema Kerja Pembuatan Larutan Pengenceran**



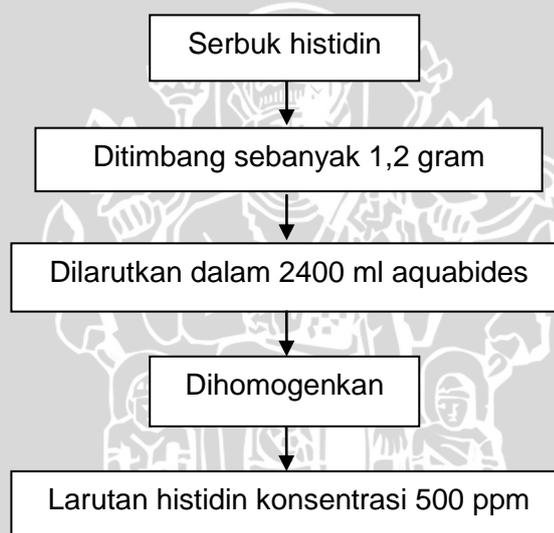
**Gambar 18. Skema Kerja Pengenceran Bakteri**



### 3.4.3 Penelitian Tahap III (Pembuatan Larutan Histidin)

Dalam pembuatan larutan histidin ini digunakan konsentrasi 500 ppm dengan cara menimbang serbuk histidin sebanyak 1,2 gram dengan menggunakan timbangan analitik. Serbuk histidin dimasukkan kedalam erlenmeyer dan dilarutkan dalam 2400 ml atau 2,4 L aquabides. Kemudian dihomogenkan dengan menggunakan spatula. Prosedur kerja pembuatan larutan histidin dapat dilihat pada Gambar 19.

**Gambar 19. Skema Kerja Pembuatan Larutan Histidin**



### 3.4.4 Penelitian Tahap IV (Aerasi)

Larutan histidin kemudian dimasukkan kedalam 16 botol plastik masing-masing diisi 150 ml larutan histidin. Masing-masing botol plastik kemudian diaerasi menggunakan aerator untuk pengkondisian oksigen di dalam botol agar bakteri dapat hidup. Kemudian dimasukkan 3 jenis bakteri 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

*Bacillus* sp. sebanyak 0,6 ml dimasukkan kedalam botol plastik A1. Bakteri *Enterobacter* sp. sebanyak 0,6 ml dimasukkan kedalam botol plastik A2. Bakteri *Planococcus* sp. sebanyak 0,6 ml juga dimasukkan kedalam botol plastik A3. Selanjutnya kombinasi bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* sp. masing-masing sebanyak 0,2 ml dimasukkan kedalam botol plastik yang diberi tanda A1A2A3. Larutan histidin yang sudah ditambahi bakteri kemudian diaerasi selama 6 jam pertama yang diberi tanda A1<sub>1</sub> (untuk bakteri *Bacillus* sp.), A2<sub>1</sub> (untuk bakteri *Enterobacter* sp.), A3<sub>1</sub> (untuk bakteri *Planococcus* sp.), dan A1A2A3<sub>1</sub> (untuk kombinasi bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* 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 13.

## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil Penelitian

#### 4.1.1 Penelitian Pendahuluan

##### 4.1.1.1 Penelitian Pendahuluan Tahap I

Tujuannya untuk mengetahui lama waktu aerasi yang berbeda dan mencari perlakuan terbaik dari penguraian limbah pemindangan terhadap kadar histamin. Hasil dari penelitian ini merupakan dasar penelitian pendahuluan II dan penelitian utama. Parameter uji yang dilakukan pada penelitian tahap ini adalah uji kadar histamine dengan menggunakan metode spektrofotometri.

Hasil dari penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 4. Kadar histamin dari penguraian limbah pemindangan**

No	Kode Sampel	Perlakuan			
		6 jam (mg/kg) Histamin	12 jam (mg/kg) Histamin	18 jam (mg/kg) Histamin	24 jam (mg/kg) Histamin
1.	Kontrol			21,87	
2.	A1	179,74	153,75	181,15	176,27
3.	A2	71,27	83,79	79,08	84,49
4.	A3	39,54	41,17	39,79	39,95

Keterangan :

Bakteri A1 = Limbah pemindangan ditambahkan bakteri *Bacillus* sp.

Bakteri A2 = Limbah pemindangan ditambahkan bakteri *Enterobacter* sp.

Bakteri A3 = Limbah pemindangan ditambahkan bakteri *Planococcus* sp.

Berdasarkan hasil uji histamin menunjukkan bahwa perlakuan aerasi terhadap penguraian histidin menjadi histamin sangatlah besar kuantitasnya.

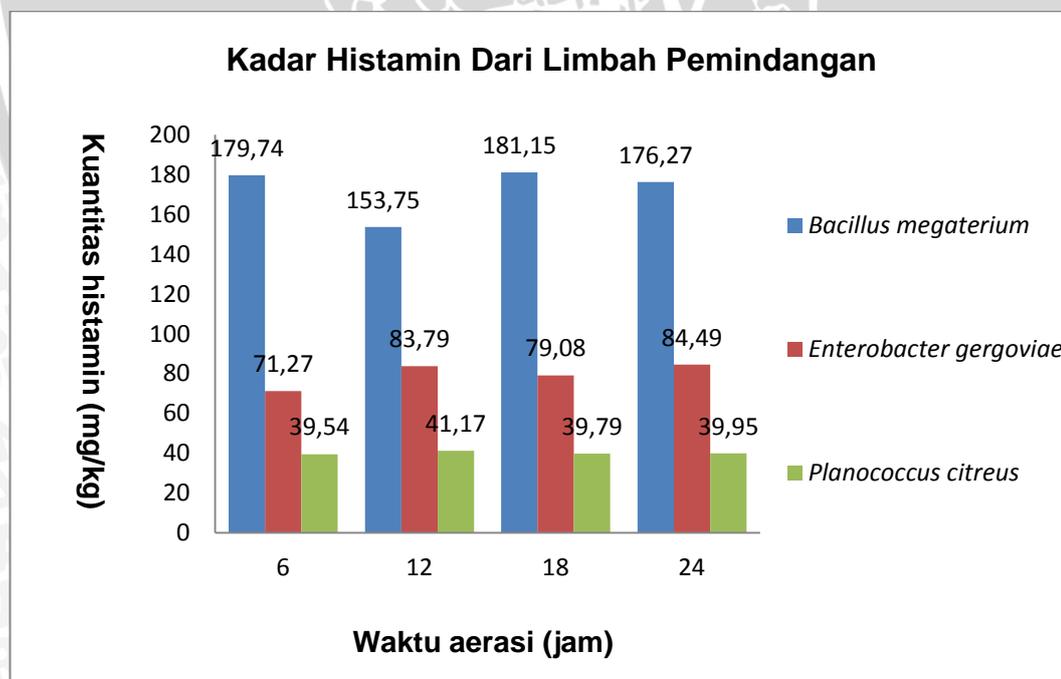
Selain itu, limbah pemindangan memiliki kandungan bakteri yang lebih banyak

yang belum diketahui golongannya. Akan tetapi diasumsikan bahwa limbah pemindangan sudah mengalami pencemaran lingkungan yang melibatkan beberapa bakteri didalamnya.

Menurut Ronquillo (2009), limbah adalah buangan yang dihasilkan dari suatu proses produksi baik industri maupun domestik (rumah tangga), yang kehadirannya pada suatu saat dan tempat tertentu tidak dikehendaki lingkungan karena tidak memiliki nilai ekonomis.

Limbah cair yang dihasilkan dari pengolahan makanan biasanya berupa air yang telah dikotori untuk berbagai keperluan. Sebagai contoh adalah air bekas pencucian bahan-bahan mentah baik bahan nabati maupun hewani, serta sisa air yang berasal dari pencucian peralatan yang digunakan dalam proses pengolahan makanan (Purnawijayanti, 2001).

Grafik kadar histamin dari penguraian limbah pemindangan dapat dilihat pada Gambar 20.



Gambar 20. Grafik hasil kadar histamin dari limbah pemindangan

Penentuan perlakuan terbaik pada penelitian tahap ini didasarkan pada parameter uji yang dilakukan, yaitu uji histamin dengan menggunakan metode spektrofotometri. Berdasarkan penentuan perlakuan terbaik diperoleh hasil bahwa perlakuan terbaik didapat pada perlakuan waktu aerasi 18 jam yang diberi perlakuan penambahan bakteri *Bacillus* sp. dalam limbah pembedangan. Karena kadar histamin yang diberikan sangatlah tinggi. Menurut Ahmed (1991), *Bacillus* merupakan bakteri yang berbentuk basil dimana bakteri jenis ini merupakan bakteri pengurai dari protein menjadi senyawa sederhana.

#### 4.1.1.2 Penelitian Pendahuluan Tahap II

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 5.

**Tabel 5. Kadar histamin dari penguraian histidin murni**

No	Kode Sampel	Perlakuan			
		6 jam (mg/kg) Histamin	12 jam (mg/kg) Histamin	18 jam (mg/kg) Histamin	24 jam (mg/kg) Histamin
1.	Kontrol			0,05	
2.	A1	3,54	1,30	3,45	1,95
3.	A2	16,73	2,84	2,78	0,26
4.	A3	0,04	7,28	1,53	12,55
5.	A1+A2+A3	1,61	1,09	3,33	3,81

Keterangan :

Bakteri A1 = Histidin murni ditambahkan bakteri *Bacillus* sp.

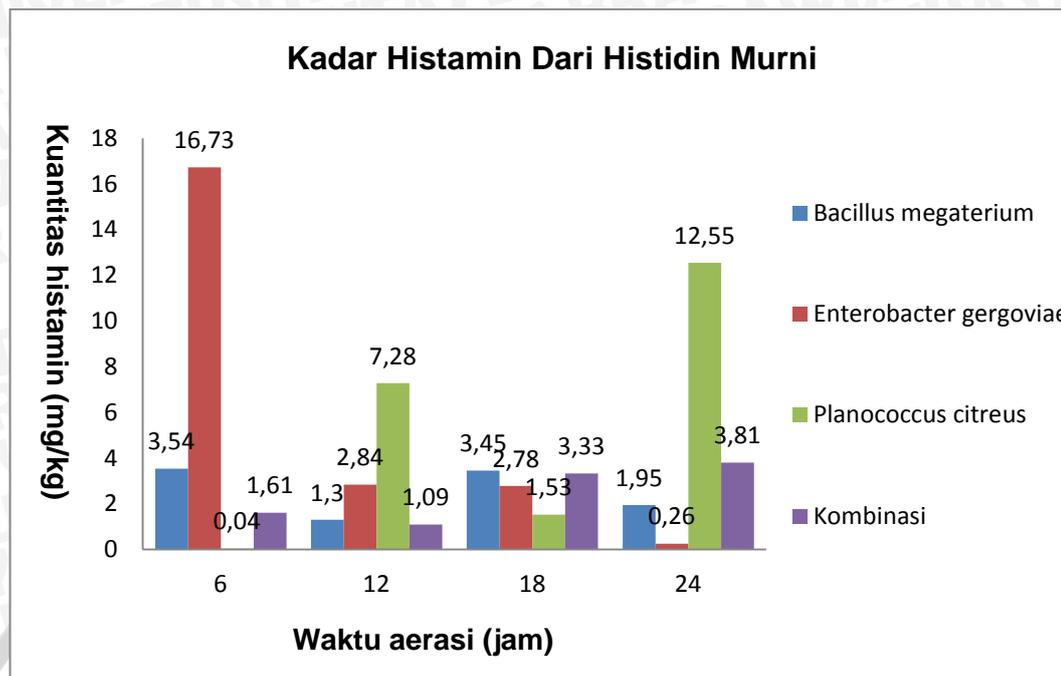
Bakteri A2 = Histidin murni ditambahkan bakteri *Enterobacter* sp.

Bakteri A3 = Histidin murni ditambahkan bakteri *Planococcus* sp.

Berdasarkan hasil uji histamin menunjukkan bahwa perlakuan aerasi terhadap penguraian histidin murni menjadi histamin sangatlah kecil kuantitasnya jika dibandingkan dengan penguraian limbah pемandangan. Untuk bakteri *Bacillus* sp. dalam menguraikan histidin menjadi histamin mengalami penurunan di 12 jam dan 24 jam. Untuk bakteri *Enterobacter* sp. dalam menguraikan histidin menjadi histamin mengalami penurunan selama 24 jam. Untuk bakteri *Planococcus* sp dalam menguraikan histidin menjadi histamin mengalami kenaikan di 12 jam dan 24 jam. Sedangkan untuk penggabungan (kombinasi) antara bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* sp. dalam menguraikan histidin menjadi histamin mempunyai nilai yang mengalami penurunan di 12 jam tetapi mengalami kenaikan di 18 jam dan 24 jam.

Jika dibandingkan dengan kontrol (larutan histidin murni) yang kadar histaminnya sebesar 0,05 mg/kg yang diaerasi selama 0 jam, penggabungan antara bakteri ini ditentukan oleh kemampuan masing-masing bakteri. Dikarenakan kandungan yang terdapat dimasing-masing bakteri tersebut berbeda-beda dalam menghasilkan enzim dekarboksilase untuk menguraikan histidin menjadi histamin. Bila dihubungkan dengan jumlah bakteri penghasil histamin, pola pembentukan histamin ini tidak sama dengan pola pertumbuhan bakteri penghasil histamin.

Grafik kadar histamin dari penguraian histidin murni dapat dilihat pada Gambar 21.



**Gambar 21. Grafik hasil kadar histamin dari histidin murni**

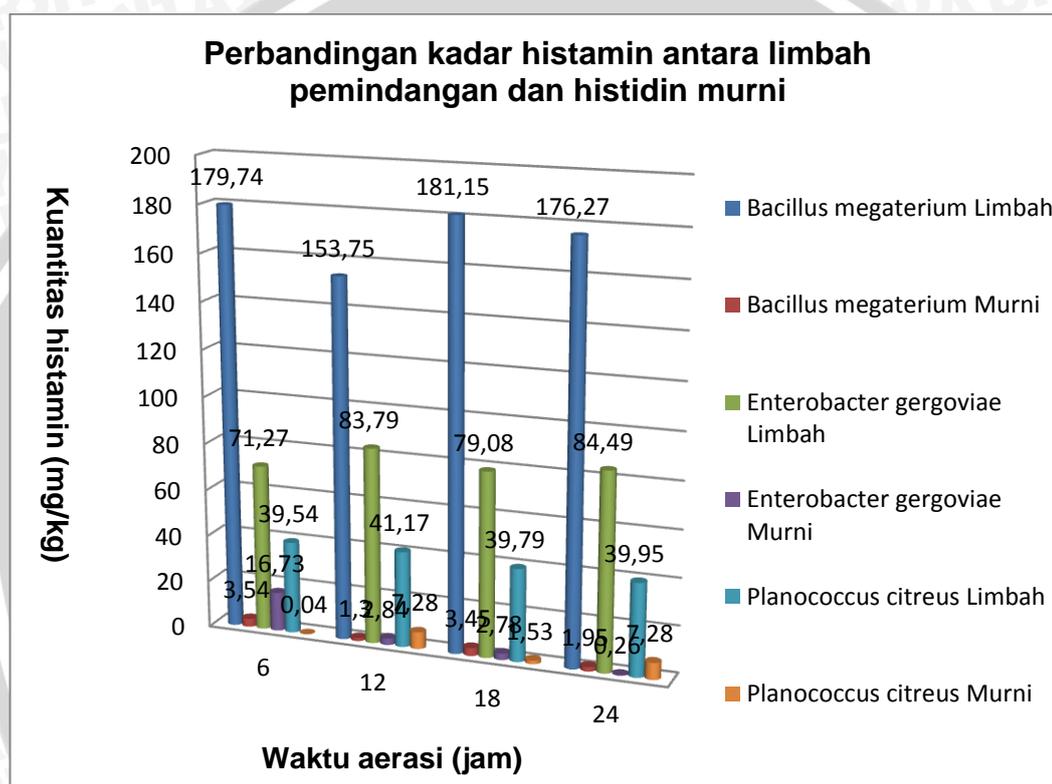
Menurut Bennour *et al.*, (1991), produksi histamin tidak selalu berkorelasi dengan besarnya jumlah bakteri penghasil histamin, tetapi lebih berkaitan dengan kemampuan bakteri tersebut mensintesis histidin dekarboksilase. Menurut Fletcher *et al.*, (1998), yang menyatakan bahwa tidak terdapat hubungan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

Menurut Yamanaka *et al.*, dalam Mahendradatta 2003 (1987), bahwa histamin dapat diproduksi oleh histidin dekarboksilase meskipun bakteri sangat sedikit. 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.

#### 4.1.1.3 Perbandingan Kadar Histamin Dari Limbah Pemandangan Dan Histidin Murni

Perbandingan kadar histamin dari limbah pemindangan dan dari histidin murni dapat dilihat pada grafik dibawah ini :



Gambar 22. Grafik perbandingan hasil uji histamin dari limbah pemindangan dan dari histidin murni

Berdasarkan grafik diatas, hasil uji histamin dalam limbah pemindangan jauh lebih besar kuantitasnya dibandingkan dengan uji histamin dalam histidin murni. Hal ini dikarenakan oleh sifat limbah itu sendiri. Selain itu, limbah pemindangan memiliki kandungan bakteri yang lebih banyak yang belum diketahui golongannya. Akan tetapi diasumsikan bahwa limbah pemindangan sudah mengalami pencemaran lingkungan yang melibatkan beberapa bakteri

didalamnya. Oleh karena itu, jumlah histamin yang dihasilkan jauh lebih besar jika dibandingkan dengan jumlah histamin dari histidin murni. Menurut Ronquillo (2009), limbah adalah buangan yang dihasilkan dari suatu proses produksi baik industri maupun domestik (rumah tangga), yang kehadirannya pada suatu saat dan tempat tertentu tidak dikehendaki lingkungan karena tidak memiliki nilai ekonomis.

Limbah cair yang dihasilkan dari pengolahan makanan biasanya berupa air yang telah dikotori untuk berbagai keperluan. Sebagai contoh adalah air bekas pencucian bahan-bahan mentah baik bahan nabati maupun hewani, serta sisa air yang berasal dari pencucian peralatan yang digunakan dalam proses pengolahan makanan (Purnawijayanti, 2001).

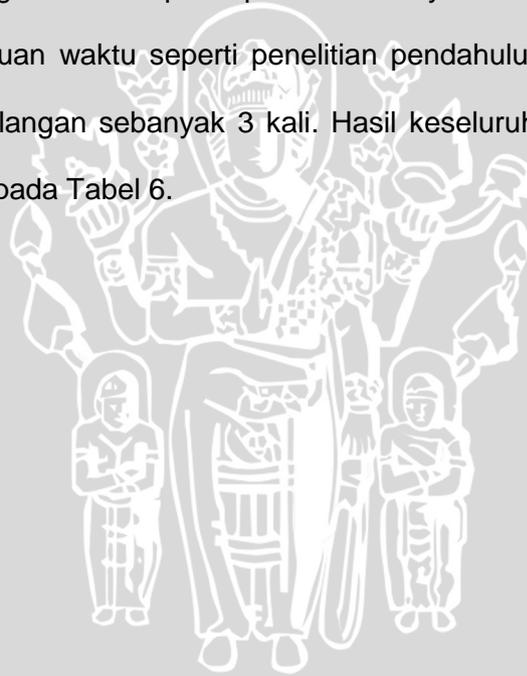
Adapun faktor lain yang mempengaruhi jumlah histidin yang dihasilkan dari 2 perlakuan tersebut, yakni penggunaan suhu penyimpanan. Sebelum dilakukan pengujian, sampel disimpan pada suhu dingin. Suhu yang digunakan pada limbah pemindangan, yakni suhu dingin ( $4^{\circ}\text{C}$ ) dengan menggunakan kulkas, sedangkan untuk histidin murni menggunakan suhu dingin (dibawah  $0^{\circ}\text{C}$ ) dengan menggunakan *freezer*. Menurut Sumner *et al.*, (2004), apabila telah diproduksi enzim dekarboksilase, maka akan terus menerus dihasilkan histamin meskipun pertumbuhan bakteri telah dihambat dengan suhu dingin  $4^{\circ}\text{C}$ . Produksi histamin akan semakin meningkat meskipun telah disimpan pada ruang pendingin.

Dilihat dari aspek kandungan histamin, ikan tuna disimpan pada suhu  $22^{\circ}\text{C}$  sudah tidak dapat dikonsumsi lagi pada penyimpanan hari ketiga. Sementara itu, penyimpanan pada temperatur  $10^{\circ}\text{C}$  sudah tidak layak dikonsumsi lagi pada hari kelima. Jikalau disimpan pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  maka hari kesembilan harus dihindari untuk dikonsumsi. Agar daging ikan aman dikonsumsi tidak menimbulkan reaksi alergi, kadar histamin dalam daging ikan direkomendasikan

di bawah 10 mg/100 gram. Sebagai acuan, kadar histamin pada ikan segar sesaat setelah ditangkap berada di bawah 0,1 miligram per 100 gram daging ikan. Suhu rendah dapat mengontrol bakteri penghasil histamin selama ikan ditangani dan diolah. Karenanya, pada suhu 0° C, ikan meckerel masih layak disantap hingga 12 hari mengingat kadar histamin masih di bawah 5 mg/100 gram daging ikan (Suaramerdeka, 2011).

#### 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 6.



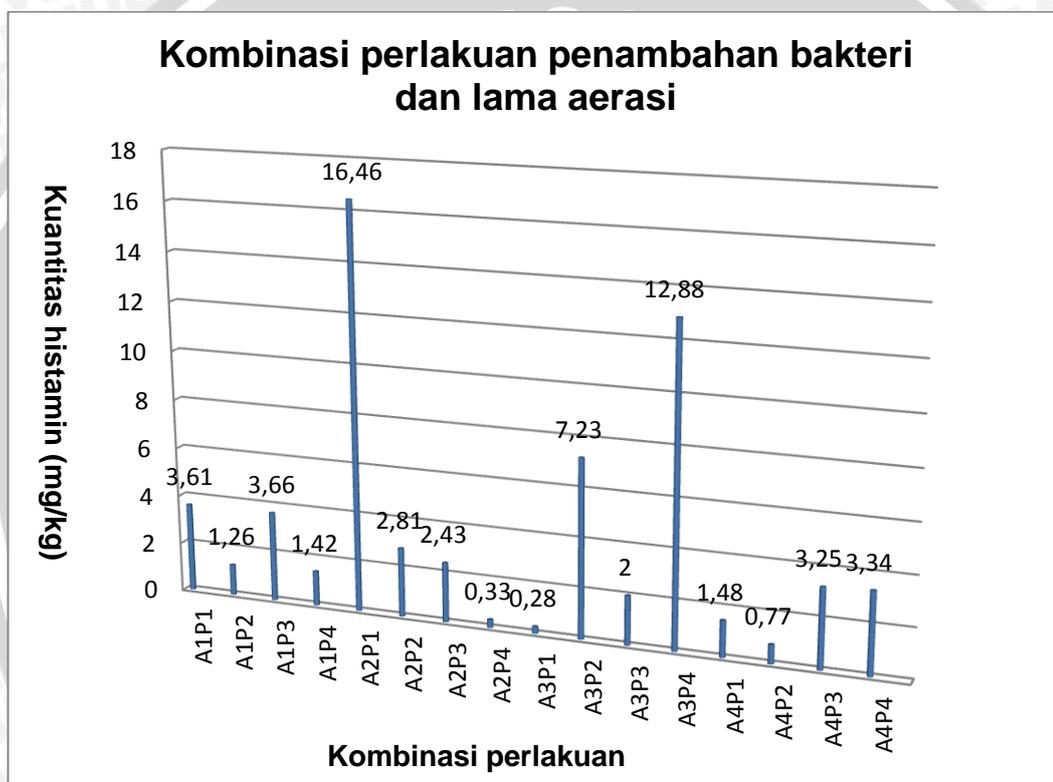
**Tabel 6. Hasil penelitian utama**

	Perlakuan		Ulangan (mg/kg histamin)		
	Bakteri 0,4 % (A)	Lama Aerasi (jam) (P)	1	2	3
A1		P1	3,54	3,64	3,64
		P2	1,30	1,24	1,24
		P3	3,45	3,76	3,76
		P4	1,95	1,15	1,15
A2		P1	16,73	16,32	16,32
		P2	2,84	2,80	2,80
		P3	2,78	2,26	2,26
		P4	0,26	0,37	0,37
A3		P1	0,04	0,40	0,40
		P2	7,28	1,20	1,20
		P3	1,53	2,23	2,23
		P4	12,55	13,05	13,05
A4		P1	1,61	1,42	1,42
		P2	1,09	0,61	0,61
		P3	3,33	3,21	3,21
		P4	3,81	3,10	3,10

Keterangan :

- A1P1 : Aerasi selama 6 jam dengan penambahan bakteri *Bacillus* sp.
- A1P2 : Aerasi selama 12 jam dengan penambahan bakteri *Bacillus* sp.
- A1P3 : Aerasi selama 18 jam dengan penambahan bakteri *Bacillus* sp.
- A1P4 : Aerasi selama 24 jam dengan penambahan bakteri *Bacillus* sp.
- A2P1 : Aerasi selama 6 jam dengan penambahan bakteri *Enterobacter* sp.
- A2P2 : Aerasi selama 12 jam dengan penambahan bakteri *Enterobacter* sp.
- A2P3 : Aerasi selama 18 jam dengan penambahan bakteri *Enterobacter* sp.
- A2P4 : Aerasi selama 24 jam dengan penambahan bakteri *Enterobacter* sp.
- A3P1 : Aerasi selama 6 jam dengan penambahan bakteri *Planococcus* sp.
- A3P2 : Aerasi selama 12 jam dengan penambahan bakteri *Planococcus* sp.
- A3P3 : Aerasi selama 18 jam dengan penambahan bakteri *Planococcus* sp.
- A3P4 : Aerasi selama 24 jam dengan penambahan bakteri *Planococcus* sp.
- A4P1 : Aerasi selama 6 jam dengan penambahan kombinasi dari ketiga bakteri
- A4P2 : Aerasi selama 12 jam dengan penambahan kombinasi dari ketiga bakteri
- A4P3 : Aerasi selama 18 jam dengan penambahan kombinasi dari ketiga bakteri
- A4P4 : Aerasi selama 24 jam dengan penambahan kombinasi dari ketiga bakteri

Berdasarkan hasil analisis uji histamin metode spektrofotometri pengaruh penambahan bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* sp. dalam larutan histidin murni dan lama aerasi serta interaksi antara kedua perlakuan tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap kadar histamin yang dihasilkan ( $\alpha = 5\%$ ) (Lampiran 7).



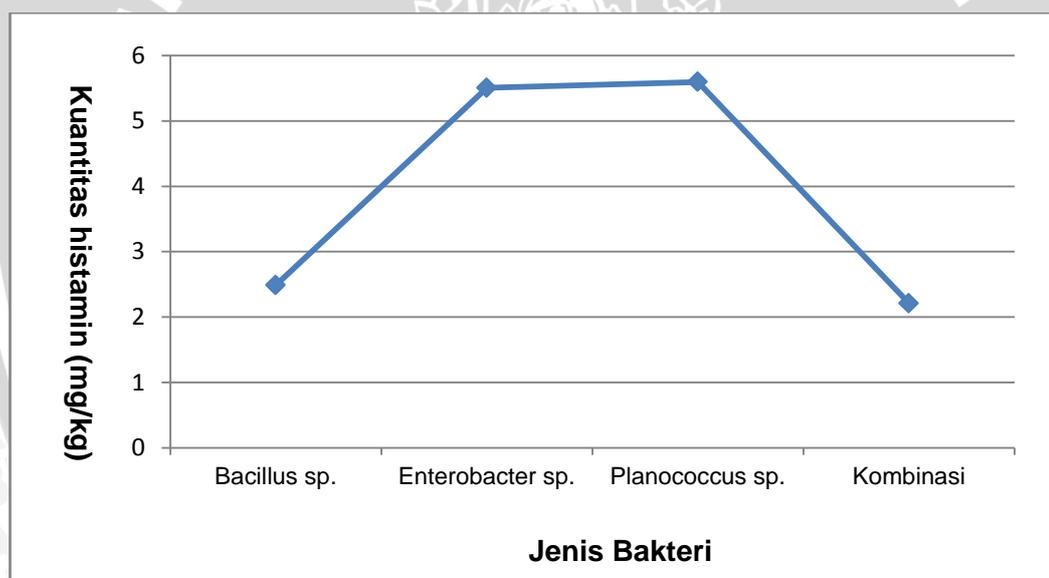
**Gambar 23. Grafik pengaruh perlakuan kombinasi penambahan bakteri dan lama aerasi dalam larutan histidin murni terhadap kadar histamin**

Berdasarkan hasil pengamatan walaupun analisis statistik tidak berbeda nyata tetapi adanya perubahan kadar histamin yang dihasilkan. Hal ini terjadi terutama pada penambahan bakteri yang menyebabkan setiap bakteri memberikan hasil kadar histamin yang berbeda-beda

dengan perlakuan waktu aerasi. Hal ini diduga setiap jenis bakteri mempunyai kemampuan yang berbeda dalam menguraikan histidin menjadi histamin. Menurut Bennour *et al.*, (1991), produksi histamin tidak selalu berkorelasi dengan besarnya jumlah bakteri penghasil histamin, tetapi lebih berkaitan dengan kemampuan bakteri tersebut mensintesis histidin dekarboksilase.

#### 4.2.1 Pengaruh Penambahan Bakteri Terhadap Kadar Histamin

Pengaruh penambahan bakteri terhadap kadar histamin yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 24.



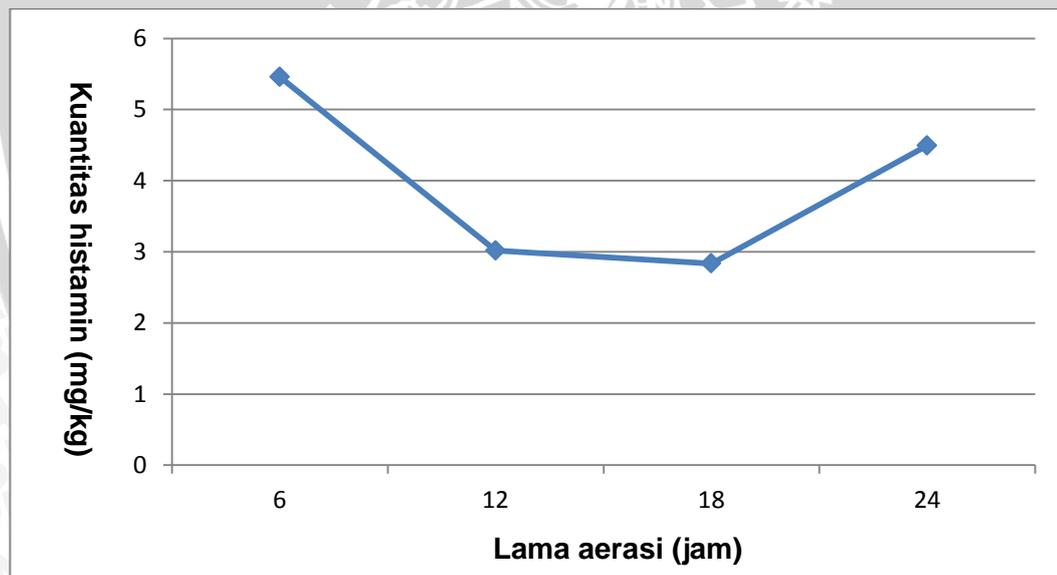
Gambar 24. Grafik pengaruh jenis bakteri terhadap kadar histamin

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 *Planococcus sp.*

yang memiliki tingkatan pertama dalam menghasilkan histamin. Sedangkan kombinasi dari ketiga bakteri tersebut terdapat pada tingkatan yang terakhir. Hal ini dikarenakan dalam kombinasi ketiga bakteri tersebut terjadi kompetisi antar ketiga 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 25.



Gambar 25. 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 6 jam, sedangkan kadar histamin yang terendah terdapat pada perlakuan 18 jam. Jadi dari perlakuan waktu yang mampu menghasilkan histamin lebih besar yakni pada perlakuan waktu 6 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 *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Planococcus* 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 *Planococcus* sp., sedangkan pada perlakuan lama waktu aerasi yang terbaik terdapat pada waktu 6 jam. Perlakuan terbaik ini didukung dengan adanya grafik pada Gambar 24 dan 25 seperti yang telah dijelaskan diatas. Hal ini disebabkan karena aktivitas enzim dekarboksilase yang terkandung di dalam bakteri *Planococcus* 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. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian mengenai pengaruh bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* sp. terhadap kadar histamin yang dihasilkan dengan penguraian histidin murni secara *in vitro* diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

- Perlakuan waktu yang berbeda mempengaruhi kadar histamin yang dihasilkan berdasarkan kemampuan dari masing-masing jenis bakteri dalam mensintesis histidin dekarboksilase.
- Bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* sp. mampu menguraikan histidin menjadi histamin.
- Panggabungan (kombinasi) antar bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* sp. efektif dalam menguraikan histidin menjadi histamin.

### 5.2 Saran

Perlu diadakan pengujian lebih lanjut mengenai aktivitas enzim yang dihasilkan oleh bakteri yang membentuk kadar histamin tinggi terutama dalam memberikan manfaat terhadap masyarakat.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aflal, M.A., Daoudi, H. Jdaini, S., Asehraou., dan Bouali, A. 2006. **Study of The Histamine Production in a Red Flesh Fish (*Sardina pilchardus*) and a White Flesh Fish (*Dicentrarchus punctatus*)**. J. of Fish And Aquatic Science 6.
- 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. D. P., Green and G. E. Bolton. 2004. **Control of Histamine Production in Current Commercial Fishing Perations for Mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) and Yellowfin Tuna (*Thunnus albacores*) in North California**. Corresponding author : dave green@ncsu.edu.
- Amirin, T. M. 2009. **Penelitian Eksploratori (Eksploratif)**. www.tatangmanguny.wordpress.com. Diakses pada Tanggal 25 Juli 2010.
- Bennour, M., marrakchi, A.E., Bouchriti, N., Hamama, A. And Quadaa, M.E. 1991. **Chemical and Microbiological assesment of Mackerel (*Scomber scombrusti*) stored in ice**. J Food Prot. 54:789-792.
- Brady, J.E. 1999. **Kimia Universitas Asas dan Struktur**. Bina Dupa Aksara. Jakarta.
- Danur, I. A. I. 1993. **Mempelajari Metode Reduksi Kadar Histamin Dalam Pembuatan Pindang Tongkol**. Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor. [http://iirc.ipb.ac.id/jspui/bitstream/123456789/30981/2/F93IAI\\_abstract.pdf](http://iirc.ipb.ac.id/jspui/bitstream/123456789/30981/2/F93IAI_abstract.pdf). Diakses pada Tanggal 20 Oktober 2010.
- Dart, R.K. 2003. **Microbiology For The Analytical Chemist**. Loughborough University.
- Dwijoseputro, 1989. **Dasar-Dasar Mikrobiologi**. Djambatan. Jakarta.
- Fardiaz, S. 1993. **Analisis Mikrobiologi Pangan**. PT. Raja Grafindo Persada.
- 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.

- Hamdan. 2008. **Kultur Jaringan**. [http:// hamdan.blogspot.html](http://hamdan.blogspot.html). diakses tanggal 1 Desember 2011 pukul 20.54 WIB.
- Holt JC, Bergey DH (1994). **Bergey's manual of determinative bacteriology** (edisi ke-9th ed.). Baltimore: Williams & Wilkins. ISBN 0-683-00603-7.
- Indriati, N., dan Arifah. K. 2008. **Penggunaan Ekstrak Daun Sirih Untuk Menghambat Pertumbuhan Bakteri Penghasil Histamin**. Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan
- Indriati, N., Rispayeni dan Endang. S.H. 2006. **Studi Bakteri Pembentuk Histamin Pada Ikan Kembung Pada Selama Proses Pengolahan**. Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan Vol.1 No. 2.
- Karovicova, J and Z. Kohajdova, 2003. **Biogenic Amine in Food**. Department of Food Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology.
- Keer, M. Lawicki, P. Aguirre, S. and Rayner, C. 2002. **Effect of Storage Conditions on Histamine Formation in Fresh and Canned Tuna**. State Chemistry Laboratory, Werbee. Victorian Government Department of Human Service. [www. fodsafety.vic.gov.au](http://www.fodsafety.vic.gov.au).
- Krieg, N. R. 1989. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1**. Williams & Wilkins Baltimore. London.
- Mahendradatta, 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. Makassar.
- Mc Lauchlin, J; C. L. Little; K. A. Grant and V. Mithan. 2005. **Scombrototoxic Fish Poisoning**. Journal of Public Health 28 (1) : 61-62.
- Munoz, R. 2008. **Bacterial Biogenic Amine Production**. Spanish Research Council (CSIC) - Instituto de Fermentaciones Industriales. <http://www.scitopics.com>. Diakses tanggal 15 Juli 2010.
- Nicklin, Y. K., Gloema, C and T. Fogel. 1999. **Microbiology**. Blog Scientif Publisher.
- Noviarty. 2007. **Kalibrasi Alat Spektrofluorometer Luminesen Ls-5b Menggunakan Bahan Standar Ovalen**. Pusat Teknologi Bahan Bakar Nuklir, BATAN. Tangerang.
- Nursanti dan Madjid, A. 2009. **Dasar-dasar Ilmu Tanah**. [http://dasar2ilmutanah.blogspot.com/2009\\_05\\_24\\_archive.html](http://dasar2ilmutanah.blogspot.com/2009_05_24_archive.html). Diakses pada Tanggal 22 Oktober 2010.
- Perkin; Elmer. 1981. **Operator's Manual Luminescence Spectrometer LS-5**. Beaconsfield, Bucking-hamshire. England.

- Pharmacy. E. 2011. ***In Vitro***. <http://pharmacyeducation.com/2010>. Diakses Pada Tanggal 10 November 2011.
- Purnawijayanti, H.A. 2001. **Sanitasi Higiene dan Keselamatan Kerja dalam Pengolahan Makanan**. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Putera, D. 2010. **Perbedaan *In Vivi*, *In Vitro* dan *Ex Vivo***. <http://farmasiblogku.blogspot.com>. Diakses tanggal 17 desember 2011 pukul 21.15 WIB.
- Putro. 2002. **Mutu Ikan Tuna**. [www.damandiri.or.id/file/indahwidiastutyipbbab2.pdf](http://www.damandiri.or.id/file/indahwidiastutyipbbab2.pdf). Diakses pada tanggal 07 Juli 2010. Pukul 07.15 WIB.
- Rispayeni. 2005. **Bakteri Pembetuk Histamin pada Peda Kembang Perempuan (*Rastrelliger neglectus*) Selama proses pengolahan**. Skripsi Sarjana Sains. Fakultas Biologi, Universitas nasional, Jakarta. 55 pp.
- Rodwell, V. W; Robert, K. M; Peter, A. M; dan Daryl, K. G. 2003. **Biokimia Harper**. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hal 333.
- Rodriguez, J. J. J; E. I. L. Sabater; M. M. H. Herrero dan M. T. M. Ventura. 1994. **Histamine, Putrescine, and Cadaverine Formation**, in Spanish Semipreserved Anchovies as Affected by Time/Temperature. *Journal of Food Science*, Volume 59 No. 5.
- Ronquillo, U. 2009. **Penanganan Limbah Hasil Perikanan Secara Biologis**. <http://www.wordpress.com>. Diakses tanggal 17 Maret 2010.
- Sumner J, Ross T, Ababouch L. 2004. **Application of Risk Assessment in the Fish Industry**. Roma : FAO.
- Sander, J.E. 1996. **Development of Biogenic Amine During Fermentation of Poultry Carcasses**. Department of Avian Medicine, College of Veterinary Medicine, The University of Georgia, Athens, GA 30602-4875.
- 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.
- SNI. 1991. **Metode Pengujian Kadar Minyak dan Lemak dalam Air secara Gravimetrik**. Standar Nasional Indonesia Nomor 06-2502-1991. Jakarta.
- Taylor, S. L dan Behling, A. R. 1982. **Bacterial Histamine Production as a Function of Temperature and Time of Incubation**. *Journal of Food Science*, Volume 4.

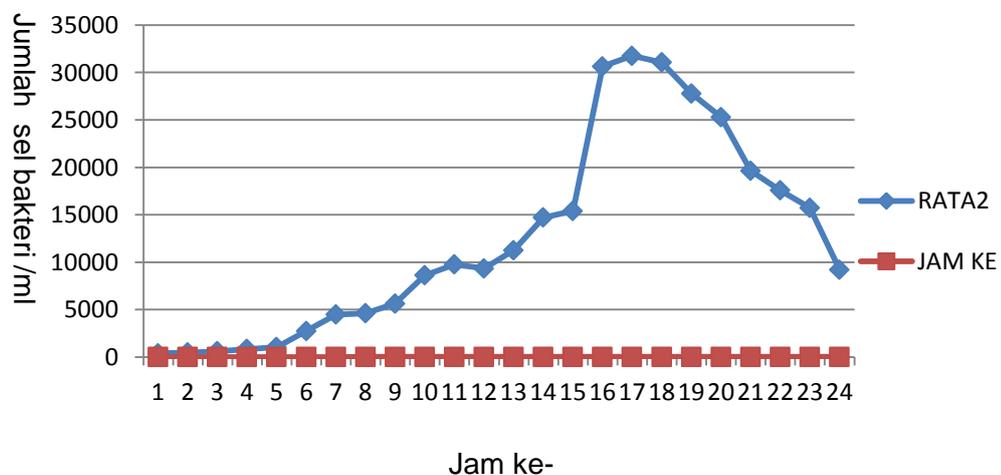
- Tim Penyusun. 2007. **Modul Kuliah : Spektroskopi**. Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma. Yogyakarta.
- Usu. 2011. ***Planococcus citreus***. <http://repository.usu.ac.id/bitstream>. Diakses pada tanggal 14 Desember 2011 pukul 17.23 WIB.
- Veteriner, 2010. **Pengertian *In Vitro***. <http://veteriner-island.blogspot.com/2010/06/deskripsi-in-vitro.html>. Diakses pada tanggal 10 November 2011.
- Wanenoer. 2010. **Penentuan Kadar Vitamin E Metode Fluorometri**. <http://id.shvoong.com>. Diakses pada Tanggal 22 Desember 2010.
- Wibowo, 2007. **Mutu Ikan Tuna**. [www.damandiri.or.id/file/indahwidiastutyipbbab2.pdf](http://www.damandiri.or.id/file/indahwidiastutyipbbab2.pdf). Diakses pada tanggal 07 Juli 2010. Pukul 07.15 WIB.
- Widiastuty, I. 2004. **Histidin Dekarboksilase**. [http://docs.google.com/viewer\\_pdf](http://docs.google.com/viewer_pdf). Diakses pada Tanggal 28 April 2010.
- Widodo, Wahyu Eko. 2010. **Spektrofluorometri untuk Mengukur Kadar Kinin Sulfat**. <http://wordpress.com>. Diakses tanggal 03 Desember 2010.
- Wikipedia. 2011<sup>a</sup>. **Histidin**. <http://id.wikipedia.org/wiki/Histidin>. Diakses pada tanggal 23 Oktober 2011 pukul 07.53 WIB.
- \_\_\_\_\_. 2011<sup>b</sup>. **Histidin Dekarboksilase**. [http://id.wikipedia.org/wiki/Histidin\\_Dekarboksilase](http://id.wikipedia.org/wiki/Histidin_Dekarboksilase). Diakses pada tanggal 22 Oktober 2011 pukul 05.34 WIB.
- \_\_\_\_\_. 2011<sup>c</sup>. ***Enterobacter gergoviae***. [http://id.wikipedia.org/wiki/Enterobacter\\_gergoviae](http://id.wikipedia.org/wiki/Enterobacter_gergoviae). Diakses pada tanggal 23 Oktober 2011 pukul 07.58 WIB.
- Zipcodezoo. 2011<sup>a</sup>. ***Bacillus megaterium***. [http://www.zipcodezoo.com/Bacteria/B/Bacillus\\_megaterium/](http://www.zipcodezoo.com/Bacteria/B/Bacillus_megaterium/). Diakses pada tanggal 10 Desember 2011 pukul 14.23 WIB.
- \_\_\_\_\_. 2011<sup>b</sup>. ***Enterobacter gergoviae***. [http://www.zipcodezoo.com/Bacteria/E/Enterobacter\\_gergoviae/](http://www.zipcodezoo.com/Bacteria/E/Enterobacter_gergoviae/). Diakses pada tanggal 10 Desember 2011 pukul 14.23 WIB.
- \_\_\_\_\_. 2011<sup>c</sup>. ***Planococcus citreus***. [http://www.zipcodezoo.com/Bacteria/P/Planococcus\\_citreus/](http://www.zipcodezoo.com/Bacteria/P/Planococcus_citreus/). Diakses pada tanggal 10 Desember 2011 pukul 14.23 WIB.

## Lampiran 1. Kurva pertumbuhan bakteri

- *Bacillus* sp.

JAM KE	X1	X2	RATA2	$\Sigma$ Sel / ml	Log $\Sigma$ Sel / ml	X1	X2	RATA2
1	385	396	390.5	$3,9 \cdot 10^6$	2,6	385	396	390.5
2	469	482	475.5	$4,8 \cdot 10^6$	2,7	469	482	475.5
3	599	616	607.5	$6,1 \cdot 10^6$	2,8	599	616	607.5
4	798	899	848.5	$8,5 \cdot 10^6$	2,9	798	899	848.5
5	1040	1037	1038.5	$1,0 \cdot 10^7$	3,0	1040	1037	1038.5
6	2640	2850	2745	$2,7 \cdot 10^7$	3,4	2640	2850	2745
7	4270	4690	4480	$4,5 \cdot 10^7$	3,6	4270	4690	4480
8	4480	4740	4610	$4,6 \cdot 10^7$	3,7	4480	4740	4610
9	6240	5030	5635	$5,6 \cdot 10^7$	3,7	6240	5030	5635
10	8350	8880	8615	$8,6 \cdot 10^7$	3,9	8350	8880	8615
11	9580	9940	9760	$9,8 \cdot 10^7$	4,0	9580	9940	9760
12	9760	8920	9340	$9,3 \cdot 10^7$	4,0	9760	8920	9340
13	10740	11770	11255	$1,1 \cdot 10^8$	4,0	10740	11770	11255
14	14830	14580	14705	$1,4 \cdot 10^8$	4,2	14830	14580	14705
15	15400	15390	15395	$1,5 \cdot 10^8$	4,2	15400	15390	15395
16	30320	30970	30645	$3,1 \cdot 10^8$	4,5	30320	30970	30645
17	31250	31260	31255	$3,1 \cdot 10^8$	4,5	31250	32260	31755
18	30210	30940	30575	$3,1 \cdot 10^8$	4,5	30210	31940	31075
19	27430	28150	27790	$2,8 \cdot 10^8$	4,4	27430	28150	27790
20	25270	25310	25290	$2,5 \cdot 10^8$	4,4	25270	25310	25290
21	19120	20170	19645	$2,0 \cdot 10^8$	4,3	19120	20170	19645
22	18050	17100	17575	$1,8 \cdot 10^8$	4,2	18050	17100	17575
23	15818	15650	15734	$1,6 \cdot 10^8$	4,2	15818	15650	15734
24	9650	8720	9185	$9,2 \cdot 10^7$	4,0	9650	8720	9185

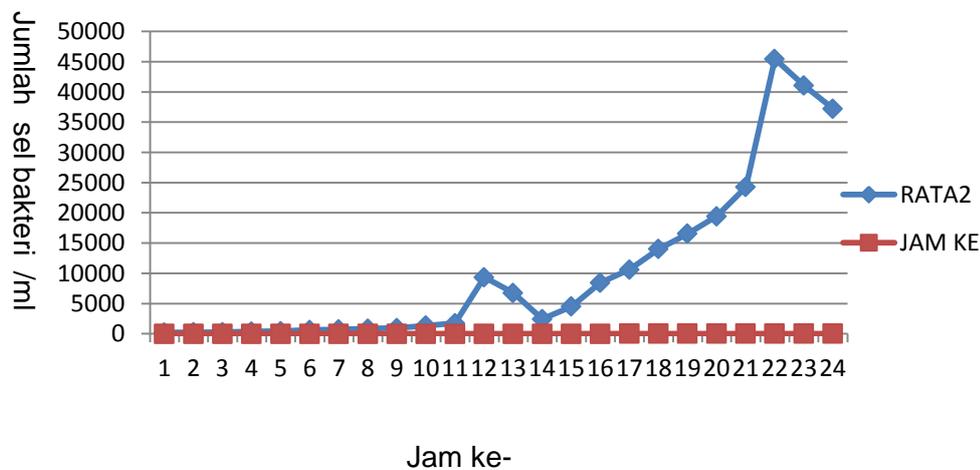
Kurva pertumbuhan *Bacillus* sp.



- *Enterobacter* sp.

JAM KE	X1	X2	RATA2	Σ Sel / ml	Log Σ Sel / ml	X1	X2	RATA2
1	138	293	215.5	3,9.10 <sup>6</sup>	2,3	138	293	215.5
2	246	248	247	4,8.10 <sup>6</sup>	2,4	246	248	247
3	298	215	256.5	6,1.10 <sup>6</sup>	2,4	298	215	256.5
4	379	358	368.5	8,5.10 <sup>6</sup>	2,6	379	358	368.5
5	304	537	420.5	1,0.10 <sup>7</sup>	2,6	304	537	420.5
6	645	618	631.5	2,7.10 <sup>7</sup>	2,8	645	618	631.5
7	742	696	719	4,5.10 <sup>7</sup>	2,8	742	696	719
8	844	870	857	4,6.10 <sup>7</sup>	2,9	844	870	857
9	1024	903	963.5	5,6.10 <sup>7</sup>	3,0	1024	903	963.5
10	1330	1380	1355	8,6.10 <sup>7</sup>	3,1	1330	1380	1355
11	1758	1740	1749	9,8.10 <sup>7</sup>	3,2	1758	1740	1749
12	9760	8920	9340	9,3.10 <sup>7</sup>	4,0	9760	8920	9340
13	1740	11770	6755	1,1.10 <sup>8</sup>	3,8	1740	11770	6755
14	2413	2445	2429	1,4.10 <sup>8</sup>	3,4	2413	2445	2429
15	4514	4539	4526.5	1,5.10 <sup>8</sup>	3,6	4514	4539	4526.5
16	8630	8290	8460	2,7.10 <sup>8</sup>	3,9	8630	8290	8460
17	10820	10380	10600	3,8.10 <sup>8</sup>	4,0	10820	10380	10600
18	13510	14540	14025	5,1.10 <sup>8</sup>	4,1	13510	14540	14025
19	16270	16810	16540	1,7.10 <sup>8</sup>	4,2	16270	16810	16540
20	19420	19430	19425	1,9.10 <sup>8</sup>	4,3	19420	19430	19425
21	23120	25400	24260	2,4.10 <sup>8</sup>	4,4	23120	25400	24260
22	43200	47700	45450	4,5.10 <sup>9</sup>	4,6	43200	47700	45450
23	41580	40560	41070	4,1.10 <sup>9</sup>	4,6	41580	40560	41070
24	36690	37750	37220	3,7.10 <sup>8</sup>	4,6	36690	37750	37220

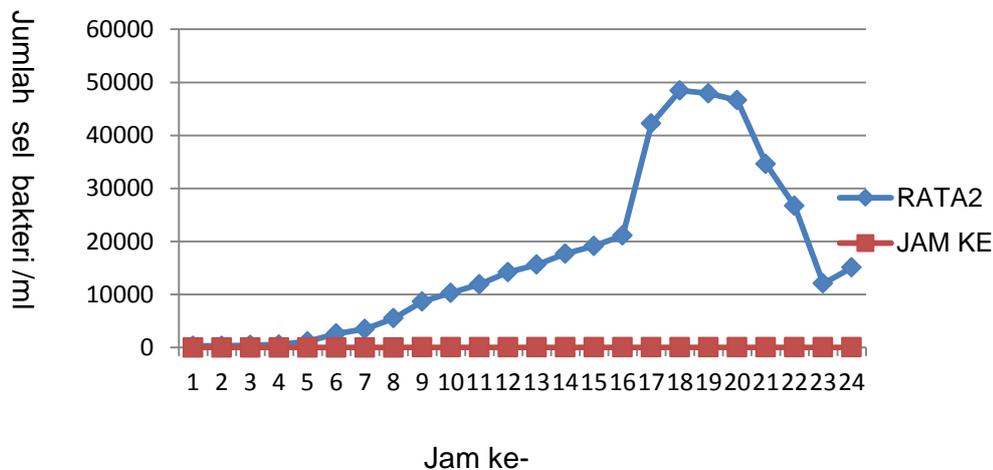
Kurva pertumbuhan *Enterobacter* sp.



- *Planococcus* sp.

JAM KE	X1	X2	RATA2	$\Sigma$ Sel / ml	Log $\Sigma$ Sel / ml	X1	X2	RATA2
1	287	291	289	$2,9 \cdot 10^6$	2,5	287	291	289
2	315	302	308.5	$3,1 \cdot 10^6$	2,5	315	302	308.5
3	428	444	436	$4,4 \cdot 10^6$	2,6	428	444	436
4	557	526	541.5	$5,4 \cdot 10^6$	2,7	557	526	541.5
5	1038	1230	1134	$1,2 \cdot 10^7$	3,0	1038	1230	1134
6	2460	2750	2605	$2,6 \cdot 10^7$	3,4	2460	2750	2605
7	3320	3660	3490	$3,5 \cdot 10^7$	3,5	3320	3660	3490
8	5740	5240	5490	$5,4 \cdot 10^7$	3,7	5740	5240	5490
9	8460	8850	8655	$8,7 \cdot 10^7$	3,9	8460	8850	8655
10	9910	10670	10290	$1,0 \cdot 10^7$	4,0	9910	10670	10290
11	11500	12300	11900	$1,2 \cdot 10^7$	4,1	11500	12300	11900
12	14780	13610	14195	$1,4 \cdot 10^8$	4,1	14780	13610	14195
13	15460	15800	15630	$1,6 \cdot 10^8$	4,2	15460	15800	15630
14	17870	17530	17700	$1,8 \cdot 10^8$	4,2	17870	17530	17700
15	19490	18760	19125	$1,9 \cdot 10^8$	4,3	19490	18760	19125
16	21790	20450	21120	$2,1 \cdot 10^8$	4,3	21790	20450	21120
17	42870	41560	42215	$4,2 \cdot 10^9$	4,6	42870	41560	42215
18	42110	40780	41445	$4,1 \cdot 10^9$	4,6	48110	48780	48445
19	40030	40820	40425	$4,0 \cdot 10^9$	4,6	48030	47820	47925
20	40390	40820	40605	$4,1 \cdot 10^9$	4,6	46390	46820	46605
21	34950	34270	34610	$3,4 \cdot 10^8$	4,5	34950	34270	34610
22	27610	25750	26680	$2,7 \cdot 10^8$	4,2	27610	25750	26680
23	21790	2310	12050	$2,1 \cdot 10^7$	4,1	21790	2310	12050
24	16340	13810	15075	$1,7 \cdot 10^7$	4,2	16340	13810	15075

Kurva pertumbuhan *Planococcus* sp.



Lampiran 2. Proses pembuatan larutan histidin



Serbuk histidin



Aquabides



**Memasukkan serbuk histidin kedalam erlenmeyer 1000 ml**



**Menambahkan aquabides kedalam erlenmeyer 1000 ml**



**Penghomogenan larutan histidin**



Lampiran 3. Proses penambahan bakteri



Bakteri *Bacillus megaterium*



Bakteri *Enterobacter gergoviae*



Bakteri *Planococcus citreus*



Kombinasi ketiga bakteri (*Bacillus megaterium*, *Enterobacter gergoviae*, dan *Planococcus citreus*)



**Pengambilan bakteri dengan menggunakan pipet volum 1 ml**



**Memasukkan bakteri kedalam larutan histidin 150 ml**

Lampiran 4. Gambar proses aerasi



## Lampiran 5. Hasil uji histamin dari limbah pemindangan

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

REPORT OF TESTING  
Serial No : 02 / 08 / RU / 2011

Date of Received : August 25 , 2011  
Date of Test : August 25 , 2011  
Quantity / Condition of samples : 41 samples  
Company : Universitas Brawijaya

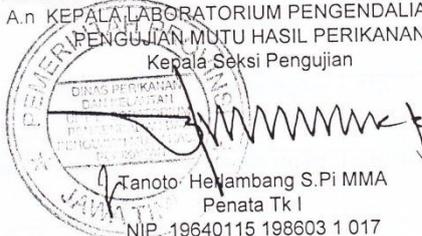
### TEST RESULT

No	Kode	Parameter	Result	Reference	Method
1	A1 Limbah	Histamin	59.20 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
2	A2 Limbah	Histamin	56.32 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
3	A3 Limbah	Histamin	64.20 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
4	A4 Limbah	Histamin	53.41 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
5	B1 Limbah	Histamin	71.27 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
6	B2 Limbah	Histamin	83.79 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
7	B3 Limbah	Histamin	79.08 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
8	B4 Limbah	Histamin	84.49 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
9	C1 Limbah	Histamin	51.26 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
10	C2 Limbah	Histamin	59.07 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
11	C3 Limbah	Histamin	71.42 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
12	C4 Limbah	Histamin	73.98 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
13	D1 Limbah	Histamin	64.24 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
14	D2 Limbah	Histamin	50.88 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
15	D3 Limbah	Histamin	52.15 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
16	D4 Limbah	Histamin	59.71 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009

No	Kode	Parameter	Result	Reference	Method
17	E1 Limbah	Histamin	36.23 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
18	E2 Limbah	Histamin	34.81 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
19	E3 Limbah	Histamin	33.05 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
20	E4 Limbah	Histamin	38.43 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
21	F1 Limbah	Histamin	179.74 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
22	F2 Limbah	Histamin	153.75 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
23	F3 Limbah	Histamin	181.15 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
24	F4 Limbah	Histamin	176.27 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
25	G1 Limbah	Histamin	45.92 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
26	G2 Limbah	Histamin	41.72 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
27	G3 Limbah	Histamin	47.97 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
28	G4 Limbah	Histamin	41.48 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
29	H1 Limbah	Histamin	58.83 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
30	H2 Limbah	Histamin	70.77 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
31	H3 Limbah	Histamin	73.60 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
32	H4 Limbah	Histamin	76.27 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
33	I1 Limbah	Histamin	64.52 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
34	I2 Limbah	Histamin	87.44 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
35	I3 Limbah	Histamin	69.19 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
36	I4 Limbah	Histamin	70.54 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009

No	Kode	Parameter	Result	Reference	Method
37	J1 Limbah	Histamin	39.54 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
38	J2 Limbah	Histamin	41.17 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
39	J3 Limbah	Histamin	39.79 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
40	J4 Limbah	Histamin	39.95 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
41	- Limbah	Histamin	21.87 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009

Place and Date of issued , Surabaya September 12, 2011  
 A.n KEPALA LABORATORIUM PENGENDALIAN DAN  
 PENGUJIAN MUTU HASIL PERIKANAN  
 Kepala Seksi Pengujian



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



## Lampiran 6. Hasil uji histamin dari histidin murni

PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR  
 DINAS PERIKANAN DAN KELAUTAN  
 LABORATORIUM PENGENDALIAN DAN PENGUJIAN MUTU HASIL PERIKANAN  
 PROVINCIAL LABORATORY FOR FISH INSPECTION AND QUALITY CONTROL IN SURABAYA, EAST JAVA INDONESIA  
 JL. PAGESANGAN II No, 58 B Tlp. ( 031 ) 8274092, 8274693, 8274694, Fax No ( 031 ) 8280115  
 SURABAYA INDONESIA

REPORT OF TESTING  
 Serial No: 07 / 2 / RU / 2011

Date of Received : Desember 05 , 2011  
 Date of Test : Desember 07 , 2011  
 Quantity / Condition of samples : 69 samples  
 Company : Universitas Brawijaya

### TEST RESULT

No	Kode	Parameter	Result	Reference	Method
1	A1 (1)	Histamin	3.54	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
2	A1 (2)	Histamin	1.30	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
3	A1 (3)	Histamin	3.45	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
4	A1 (4)	Histamin	1.95	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
5	A123 (1)	Histamin	1.61	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
6	A123 (2)	Histamin	1.09	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
7	A123 (3)	Histamin	3.33	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
8	A123 (4)	Histamin	3.81	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
9	A2 (1)	Histamin	16.73	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
10	A2 (2)	Histamin	2.85	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
11	A2 (3)	Histamin	2.78	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
12	A2 (4)	Histamin	0.26	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
13	A3 (1)	Histamin	0.04	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
14	A3 (2)	Histamin	7.23	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
15	A3 (3)	Histamin	1.53	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
16	A3 (4)	Histamin	12.55	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009

No	Kode	Parameter	Result	Reference	Method
17	B1 (1)	Histamin	0.12	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
18	B1 (2)	Histamin	1.19	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
19	B1 (3)	Histamin	33.55	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
20	B1 (4)	Histamin	0.20	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
21	B12 (1)	Histamin	2.89	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
22	B12 (2)	Histamin	6.90	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
23	B12 (3)	Histamin	3.26	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
24	B12 (4)	Histamin	2.43	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
25	B2 (1)	Histamin	6.19	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
26	B2 (3)	Histamin	0.31	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
27	B2 (2)	Histamin	8.68	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
28	B2 (4)	Histamin	4.22	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
29	P1 (1)	Histamin	1.04	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
30	P1 (4)	Histamin	5.20	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
31	P1 (2)	Histamin	5.37	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
32	P1 (3)	Histamin	5.45	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
33	P12 (1)	Histamin	4.57	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
34	P12 (2)	Histamin	4.17	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
35	P12 (3)	Histamin	5.47	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
36	P12 (4)	Histamin	2.85	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009

N.	Kode	Parameter	Result	Reference	Method
37	P123 (2)	Histamin	5.10	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
38	P123 (1)	Histamin	0.73	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
39	P123 (3)	Histamin	3.93	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
40	P123 (4)	Histamin	1.11	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
41	P13 (1)	Histamin	3.57	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
42	P 13(2)	Histamin	4.52	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
43	P 13 (3)	Histamin	0.66	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
44	P13(4)	Histamin	1.73	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
45	P2 (1)	Histamin	6.13	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
46	P2 (2)	Histamin	0.02	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
47	P2 (3)	Histamin	7.31	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
48	P2 (4)	Histamin	2.37	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
49	P23 (1)	Histamin	1.50	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
50	P23 (2)	Histamin	0.78	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
51	P23 (3)	Histamin	0.47	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
52	P23 (4)	Histamin	3.59	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
53	P3 ( 1 )	Histamin	3.14	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
54	P3 ( 2 )	Histamin	2.59	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
55	P3 ( 3 )	Histamin	3.29	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
56	P3 (4)	Histamin	26.72	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
57	Q1 (1)	Histamin	2.33	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
58	Q1 (2)	Histamin	6.15	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
59	Q1 (3)	Histamin	1.77	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009

No	Kode	Parameter	Result	Reference	Method
62	Q12 (2)	Histamin	0.60	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
63	Q12 (3)	Histamin	1.72	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
64	Q12 (4)	Histamin	3.33	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
65	Q2 (1)	Histamin	1.67	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
66	Q2 (2)	Histamin	7.96	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
67	Q2 (3)	Histamin	0.70	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
68	Q2 (4)	Histamin	22.75	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
69	KONTROL	Histamin	0.05	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009

Place and Date of issued , Surabaya September 12, 2011

A.n. KEPALA LABORATORIUM PENGENDALIAN DAN  
PENGUJIAN MUTU HASIL PERIKANAN  
Kepala Seksi Pengujian



*[Signature]*  
Janoto Herlambang S.Pi MMA  
Penata Tk I  
NIP. 19640115 198603 1 017



REPORT OF HISTAMINE DETERMINATION (SNI 2354.10-2009)

Prepared By Chemistry Laboratory

to : P.Hadi

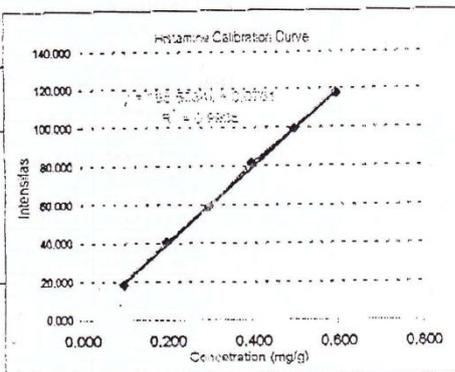
Quantitation results file:C:\FLWINLAB\DATA\Uji Histamine.rpt  
Generated on :17-12-2011 at time:14:51:19

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 (mg/kg)	Intens.	BG	Factor
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	117.886	2.62	1



Fit equation:

$Y = 199,5034 X + 0.0781$

$a = 0.0781$

$b = 199.5034$

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

Test Number	Test Code	Intensity	Weight (Grams)	Conc. (mg/kg)	Test Decision
1	A 1(2)	0.596	10.0639	1.2962	Accepted
2	A1(1)	2.248	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)	3.288	10.0533	6.1886	Accepted
19	B2(3)	0.201	10.0878	0.3069	Accepted
20	B1(1)	0.124	10.0451	0.1151	Accepted
21	B1(2)	0.554	10.0858	1.1885	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	0.2816	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)	0.321	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 Pebruari 2012  
 Tanggal uji : 6 Pebruari 2012  
 Tanggal Selesai : 7 Pebruari 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 Pebruari 2012

Manajer Teknis  
  
  



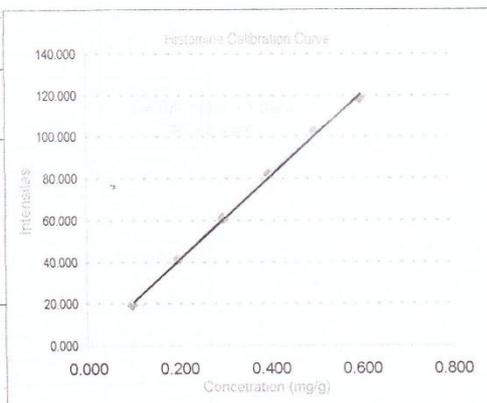

Quantitation results file:C:\FLWINLAB\DATA\Uji Histamine.rpt  
Generated on :07-02-2012 at time:13:11:39

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 (mg/kg) = ((Y - a) x 5000) / (wxb)

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



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 7. Kadar histamin dari histidin murni

PERLAKUAN	ULANGAN			JUMLAH	RERATA
	1	2	3		
A1P1	3,54	3,64	3,64	10,82	3,61
A1P2	1,30	1,24	1,24	3,78	1,26
A1P3	3,45	3,76	3,76	10,97	3,66
A1P4	1,95	1,15	1,15	4,25	1,42
A2P1	16,73	16,32	16,32	49,37	16,46
A2P2	2,84	2,80	2,80	8,44	2,81
A2P3	2,78	2,26	2,26	7,30	2,43
A2P4	0,26	0,37	0,37	1,0	0,33
A3P1	0,04	0,40	0,40	0,84	0,28
A3P2	7,28	7,20	7,20	21,68	7,23
A3P3	1,53	2,23	2,23	5,99	2,0
A3P4	12,55	13,05	13,05	38,65	12,88
A4P1	1,61	1,42	1,42	4,45	1,48
A4P2	1,09	0,61	0,61	2,31	0,77
A4P3	3,33	3,21	3,21	9,75	3,25
A4P4	3,81	3,10	3,10	10,01	3,34
<b>TOTAL</b>	64,09	62,76	62,76	189,61	

Tabel dua arah

Perlakuan	Lama waktu aerasi				Jumlah	Rerata
	P1	P2	P3	P4		
Penambahan bakteri						
A1	10,82	3,78	10,97	4,25	29,82	2,49
A2	49,37	8,44	7,30	1,00	66,11	5,51
A3	0,84	21,68	5,99	38,65	67,16	5,60
A4	4,45	2,31	9,75	10,01	26,52	2,21
Jumlah	65,48	36,21	34,01	53,91	189,61	
Rerata	5,46	3,02	2,83	4,49		

**Tabel sidik ragam**

Sumber Keragaman (SK)	Derajat Bebas (db)	Jumlah Kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	F hit.	Ket.	F tabel	
						5%	1%
Ulangan	2	0,0725	0,0362	0,0204	ns	3,32	5,39
Perlakuan	15	884	58,9333	33,1477	signf	2,01	2,70
Galat	30	53,3416	1,7779				
Total	47	937,4141					

**Tabel uji BNT Pengaruh penambahan bakteri (A)**

Rerata (A)		A4	A1	A2	A3	Notasi	BNT 5%
		2,21	2,49	5,51	5,60		
A4	2,21	-				a	2,22
A1	2,49	0,28	-			ab	
A2	5,51	3,30	3,02	-		b	
A3	5,60	3,39	3,11	0,09	-	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	