3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan utama dan isolat bakteri. Bahan utama yang digunakan adalah histidin. Bahan lain yang digunakan adalah metabolit bakteri yaitu *Nitrococcus* sp dan *Acinetobacter* sp yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Media TSB, aquabidest, aquadest, Nacl, air ledeng, kertas label, koran, tali, kapas, korek api, tissue, sarung tangan, masker, sabun cair.

3.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari peralatan penelitian, peralatan pembiakan bakteri dan peralatan pengenceran. Peralatan penelitian antara lain: gelas ukur, pipet serologis, sprayer, erlenmeyer, beaker glass, spatula, bola hisap, aerator, botol plastik, selang aerator, autoklaf, bunsen, timbangan analitik. Peralatan pembiakan dan pengenceran bakteri, antara lain: kulkas, laminar flow, tabung reaksi, rak tabung reaksi bertutup, erlenmeyer, pipet volume, beaker glass, timbangan digital, gelas arloji, osse, laminaran, gelas ukur, spatula, bunsen, botol semprot, nampan, inkubator, autoklaf, *haemocytometer*.

3.3 Metode Penelitian

Tahap pertama penelitian ini digunakan metode eksperimen. Metode eksperimen adalah kegiatan percobaan untuk melihat hasil Menurut Singarimbun dan Effendi (1983), penelitian eksperimental lebih mudah dilakukan di laboratorium karena alat-alat yang khusus dan lengkap dapat tersedia, dimana pengaruh luar dapat dengan mudah dicegah selama eksperimen. Penelitian dapat dilakukan tanpa atau dengan kelompok pembanding.

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 I dan penelitian II. Penelitian pendahuluan yang dilakukan terdiri dari 2 tahap yaitu tahap I adalah pembiakkan bakteri, pengenceran bakteri, pembuatan metabolit sekunder dan pembuatan larutan histidin. penelitian tahap II adalah mencari lama waktu aerasi yang terbaik dari histidin murni.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bahwa penambahan metabolit dari bakteri *Nitrococcus* sp dan *Acinetobacter* sp mampu mempengaruhi pembentukan histamin dari histidin murni dan untuk mengetahui lama waktu proses metabolit dari bakteri *Nitrococcus* sp dan *Acinetobacter* sp dalam memberikan hasil yang maksimal pada pembentukan histamin dari histidin murni.

3.3.1 Penelitian I

3.3.1.1 Pembiakkan Bakteri

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

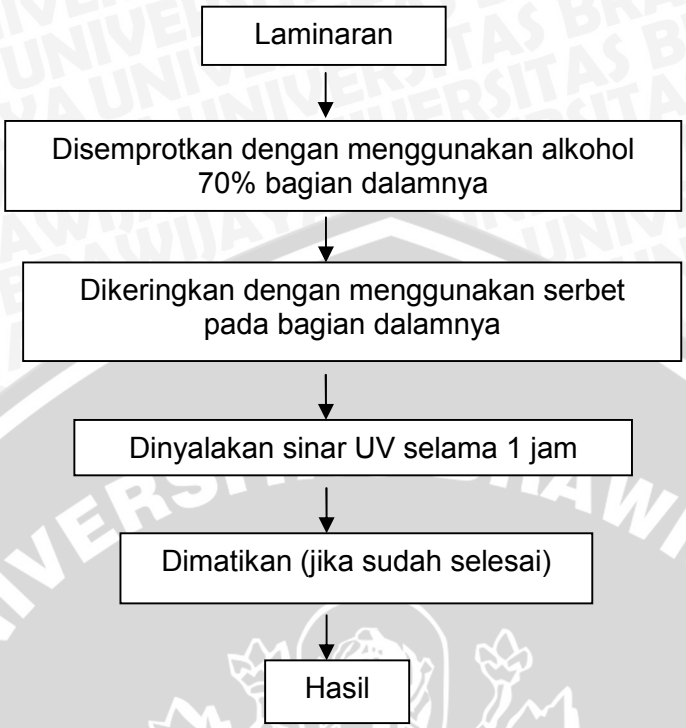
cara direbus, sterilisasi menggunakan uap panas dilakukan pada suhu dan tekanan yang tinggi di dalam autoklaf. Mesin ini beroperasi pada suhu 121^0C dan dapat membunuh mikroba (Nicklin *et al.,* 1999). Selain itu alat yang harus disterilkan yaitu laminaran, dengan cara menyemprot bagian dalamnya menggunakan cairan aseptis (alkohol 70%), kemudian dikeringkan semua bagiannya menggunakan serbet bersih agar aseptis, ditutup kaca laminaran setelah itu menekan tombol UV untuk menghidupkan sinar UV pada alat yang berfungsi sebagai pensteril laminaran selama 1 jam. Sambil menunggu laminaran selesai disterilkan, kemudian larutan untuk perkembangbiakan bakteri *Nitrococcus* sp dan *Acinetobacter* sp yaitu media TSB dibuat. Pertama yaitu menimbang media TSB sebanyak 18 gram menggunakan timbangan digital. Kemudian media TSB dimasukkan kedalam beaker glass 1000 ml dan diberi aquadest sebanyak 600 ml, lalu diaduk dengan spatula sampai homogen. Kemudian didapatkan media cair lalu dimasukkan kedalam erlenmeyer, masing-masing erlenmeyer sebanyak 100 ml media cair. Setelah itu disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121^0C 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 1 dibawah ini :

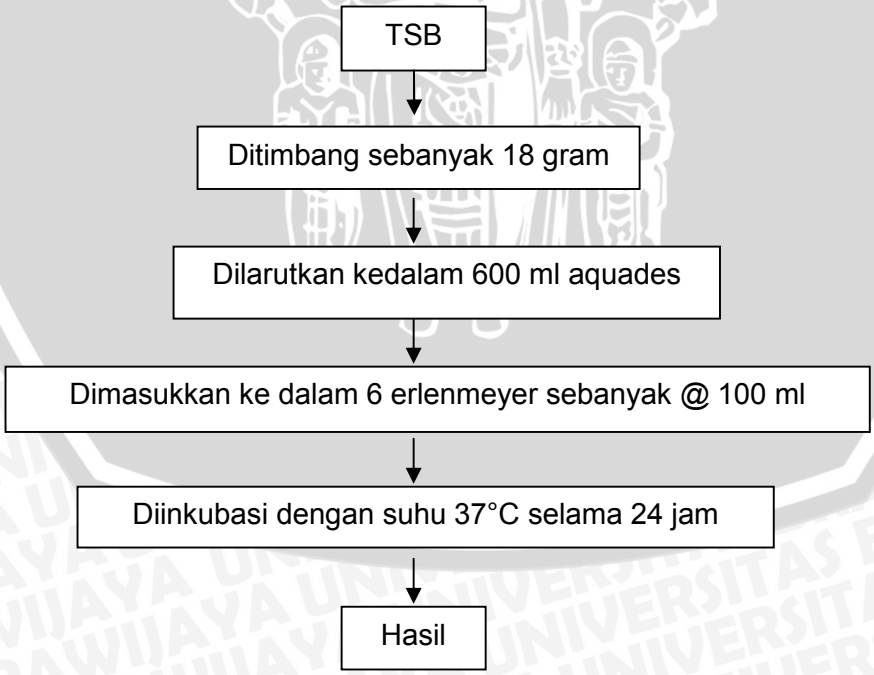
Tabel 1. Komposisi Medium Tryptone Soya Broth (TSB)

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

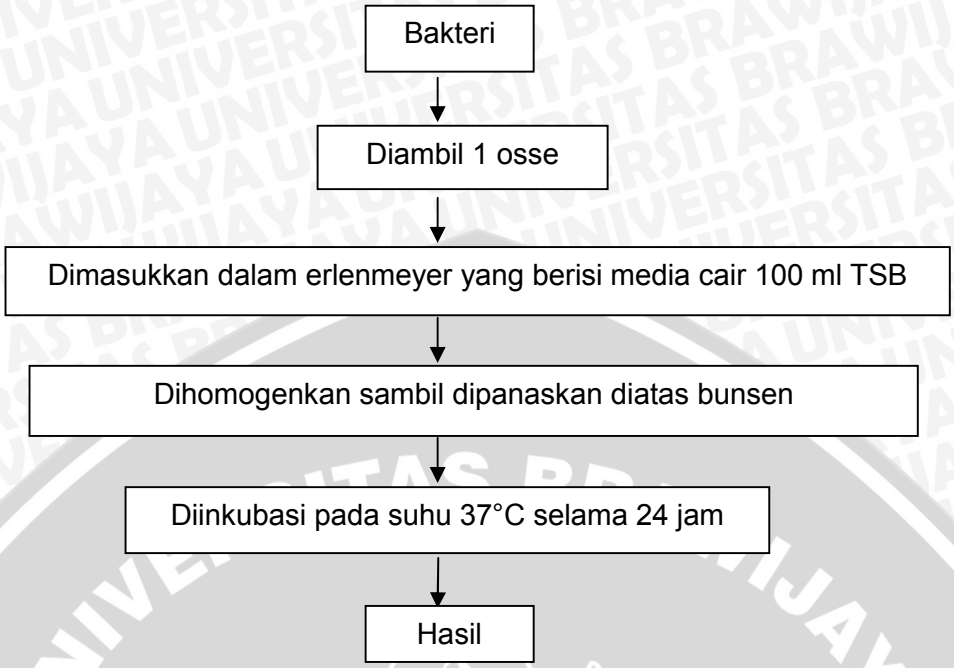
Setelah 1 jam, sinar UV pada laminaran dimatikan kemudian lampu laminaran dinyalakan untuk memudahkan penglihatan pada saat penanaman bakteri. Bagian dalam laminaran disemprot dengan alkohol agar aseptis. kemudian tangan disemprot juga agar tidak terjadi kontaminasi saat penanaman bakteri setelah itu digunakan sarung tangan agar lebih steril. Kemudian bunsen dinyalakan dan diletakkan ke dalam laminaran beserta isolat murni bakteri *Nitrococcus* sp dan *Acinotebacter* sp beserta media cair yang diletakkan di rak tabung reaksi. Lalu pada bagian ujung osse disemprot dengan alkohol dan dipanaskan diatas bunsen sampai osse memerah. Hal tersebut dilakukan untuk menghindari kontaminasi alat pada saat penanaman bakteri. Kemudian diambil sampel bakteri yang akan dibiakkan, dibuka tutup tabung sambil dipanaskan diatas bunsen untuk menjaga kondisi tetap aseptis. Osse disentuhkan di media isolat bakteri untuk mengurangi panas dari osse sehingga bakteri yang diambil tidak mati. Selanjutnya yaitu mengambil sebanyak 1 osse bakteri dengan cara menggores isolat dan dimasukkan kedalam media cair baru yang telah disiapkan (osse digoreskan di permukaan saja agar tidak terjadi kontaminasi, karena hanya bagian ujung osse yang disterilkan). Bakteri yang telah diinokulasi pada media baru, kemudian dipanaskan lagi pada bagian permukaan erlenmeyernya diatas bunsen dan segera ditutup. Osse dipanaskan diatas bunsen pada bagian ujungnya agar kembali steril saat digunakan untuk membiakkan bakteri yang lain. Kemudian erlenmeyer dihomogenkan agar bakteri dapat bercampur dengan media, setelah itu diinkubator dalam suhu 37^0C selama 24 jam. Setelah diinkubator, dilihat ada atau tidak endapan pada media, jika terdapat endapan berarti pembiakan telah berhasil dilakukan. Tabung reaksi diberi label nama bakteri yang telah dibiakkan agar tidak terjadi kesalahan pada saat pengamatan perlakuan. Prosedur kerja sterilisasi alat, pembuatan media cair dan peremajaan bakteri dapat dilihat pada Gambar 8, 9, dan 10.



Gambar 8. Prosedur Kerja Sterilisasi Alat



Gambar 9. Prosedur Kerja Pembuatan Media Cair



Gambar 10. Prosedur Kerja Peremajaan Bakteri

3.3.1.2 Pengenceran Bakteri

Dalam melakukan pengenceran dan penanaman, kondisi lingkungan di sekitarnya harus aseptis agar mikroorganisme yang tumbuh nantinya benar-benar mikroorganisme yang berasal dari sampel yang diuji. Adapun cara pengkondisian aseptis adalah dengan menyalakan bunsen dan menyemprotkan alkohol. Agar tidak tertukar maka setiap tabung reaksi diberi tanda dengan menggunakan label.

Laminaran yang akan digunakan sebagai tempat pembiakan bakteri disterilkan dengan cara menyemprot bagian dalamnya denganmenggunakan cairan aseptis (alkohol 70%), kemudian di bersihkan semua bagiannya menggunakan serbet bersih agar aseptis, ditutup kaca laminaran dan menekan tombol UV untuk menghidupkan sinar UV pada alat yang berfungsi sebagai pensteril laminaran selama 1 jam. Langkah pertama yang dilakukan adalah membuat larutan pengenceran yaitu dengan menimbang serbuk NaCl

menggunakan timbangan digital sebanyak 1,944 gram. Kemudian NaCl dimasukkan ke dalam beaker glass 500 ml dan diberi aquades sebanyak 216 ml, lalu di aduk hingga homogen menggunakan spatula. Media cair tersebut dimasukkan kedalam 24 tabung reaksi bertutup, masing-masing tabung diberi sebanyak 9 ml. Tabung reaksi bertutup yang berisi media cair disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121^0C tekanan 1 atm selama 15 menit dengan tujuan menghilangkan kontaminan yang ada pada media. Setelah disterilisasi, media cair didiamkan sampai dingin agar botol tidak pecah ketika diberi perlakuan lebih lanjut. Karena pengenceran dilakukan sampai 10^{-6} dari 2 bakteri *(Acinotebacter baumanii* dan *Nitrococcus* sp*)*.

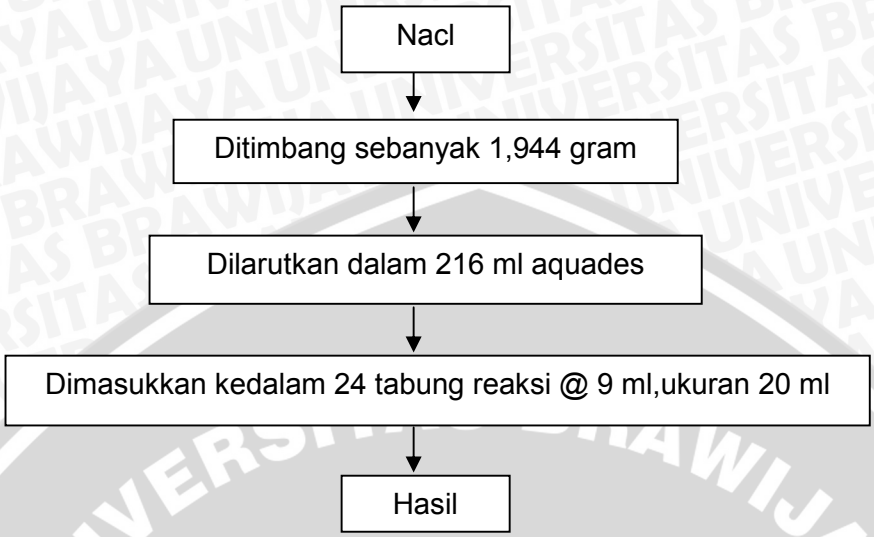
Sinar UV pada laminaran dimatikan setelah 1 jam, dan lampu pada laminaran dinyalakan untuk memudahkan penglihatan pada saat pengenceran bakteri. Bagian dalam laminaran disemprot dengan cairan aseptis, kemudian tangan yang telah terpasang sarung tangan disemprot juga agar tidak ada kontaminasi saat penanaman bakteri. Bunsen yang telah dinyalakan diletakkan ke dalam laminaran beserta isolat murni bakteri yang sudah diremajakan yaitu : *Nitrococcus* sp dan *Acinetobacter* sp dan media cair pengenceran yang ditaruh di rak tabung reaksi. Pipet volume 1 ml pada bagian ujungnya disemprot dengan cairan aseptis dan dipanaskan diatas bunsen. Hal tersebut dilakukan untuk menghindari kontaminasi alat pada saat penanaman bakteri. Diambil sampel bakteri yang sudah diremajakan sebanyak 1 ml dengan menggunakan pipet volume, kemudian dibuka tutup tabung media cair pengenceran sambil dipanaskan diatas bunsen untuk menjaga kesterilan / kondisi tetap aseptis dan 1 ml bakteri tersebut di masukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml NaCl sebagai larutan pengencer yang bersifat isotonis (pengenceran 10^{-1}) dan di homogenkan tabung agar tercampur rata setelah itu di lakukan pengeceran bertingkat yang bertujuan untuk mengurangi kepadatan mikroba, adapun cara

melakukan pengeceran bertingkat adalah dengan mengambil sebanyak 1 ml larutan pada tabung reaksi 10^{-1} menggunakan pipet volume yang sebelumnya telah di sterilisasi di atas bunsen. Larutan yang di ambil dari tabung reaksi 10^{-1} tersebut lalu di masukan pada tabung reaksi 10^{-2} dan di homogenkan. Pengeceran di lakukan sampai 10^{-6} dengan cara yang sama seperti pengenceran sebelumnya. Dalam melakukan pengenceran kita juga dapat menggunakan rumus : $N_1.V_1 = N_2.V_2$

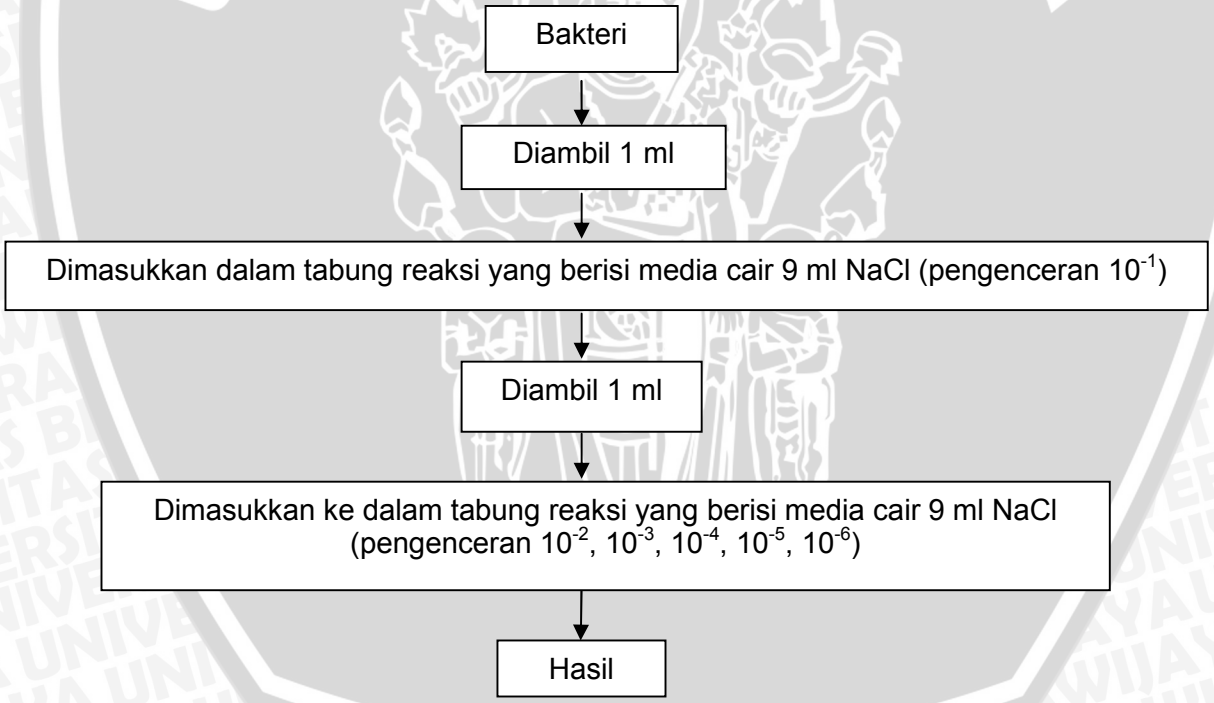
Tujuan dari pengenceran adalah untuk mengurangi kepadatan mikroba yang akan ditanam. Menurut Fardiaz (1993), bahan pangan yang diperkirakan mengandung lebih dari 300 sel mikroba pada per ml, per gram atau per cm permukaan memerlukan perlakuan pengenceran sebelum ditumbuhkan pada medium agar didalam cawan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

Proses pengenceran adalah mencapai larutan pekat (konsentrasi tinggi) dengan cara menambahkan pelarut agar diperoleh volume akhir yang lebih besar (Brady, 1999). Menurut Dwijoseputro (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 11 dan 12.



Gambar 11. Prosedur Kerja Pembuatan Larutan Pengenceran

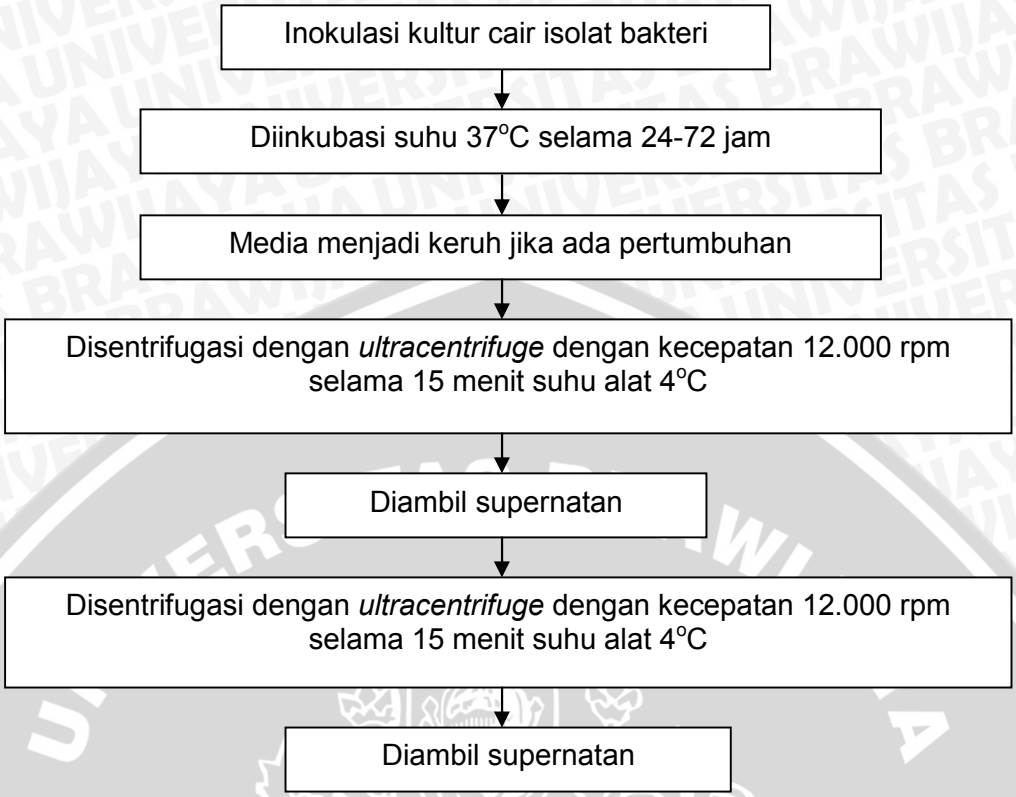


Gambar 12. Prosedur Kerja Pengenceran Bakteri

3.3.1.3 Pembuatan Metabolit Sekunder

Langkah awal yang dilakukan untuk pembuatan metabolit sekunder yaitu menginokulasi kultur cair isolat bakteri dengan menggunakan media TSB pada

erlenmeyer, kemudian diinkubasi dengan suhu 37^0C selama 24-72 jam. Hasil yang didapat adalah media akan menjadi keruh, hal ini dikarenakan bakteri tersebut mengalami pertumbuhan. Proses selanjutnya adalah disentrifugasi menggunakan alat *ultracentrifuge* dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit dengan suhu 4^0C, pada saat proses akan terjadi kerusakan pada metabolit yang ditandai dengan hilangnya nutrisi-nutrisi didalamnya, untuk itu digunakan suhu 4^0C supaya terhindar dari kerusakan-kerusakan didalamnya. Tahapan proses sentrifugasi ini dilakukan sebanyak dua kali, hal ini dikarenakan untuk mendapatkan supernatan yang benar-benar murni. Fase Pertumbuhan Logaritmik (Eksponensial), terjadi setelah mikroba menyesuaikan diri dengan lingkungannya yakni pada fase adaptasi dan fase permulaan pembiakan, maka sel jasad renik membelah dengan cepat, dimana pertambahan jumlahnya mengikuti kurva logaritmik. Pada fase ini sel kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh medium tempat tumbuhnya seperti pH dan kandungan nutrient, suhu dan kelembaban udara. Pada fase ini sel membutuhkan energi yang lebih banyak dibandingkan dengan fase lainnya, selain itu sel paling sensitif terhadap keadaan lingkungannya (Waluyo, 2004). Prosedur kerja pembuatan metabolit sekunder dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 13. Pembuatan Metabolit Sekunder

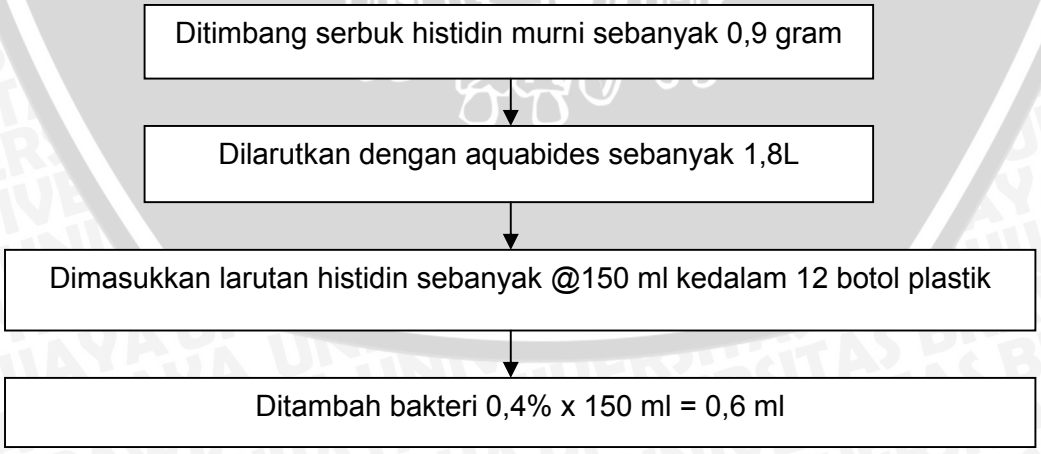
Pemanenan sampel berupa metabolit primer dan sekunder bakteri *Nitrococcus* sp dan *Acinetobacter* sp dilakukan berdasarkan metode Noviani *et al.* (2009) Setelah dilakukan pengamatan fase-fase pertumbuhan bakteri *Nitrococcus* sp dan *Acinetobacter* sp, maka kita dapat mengetahui pada jam ke berapakah bakteri tersebut memasuki fase eksponensial. Sampel metabolit primer dipanen pada fase eksponensial. Fase eksponensial dipilih karena pada fase ini merupakan fase pertumbuhan tertinggi dari bakteri itu sendiri. Menurut Nurwantoro (2003), populasi total bakteri cenderung meningkat seiring dengan pertambahan lama waktu penyimpanan. Hal ini dapat diakibatkan bakteri sedang berada dalam fase eksponensial. Semakin banyak bakteri yang dihasilkan maka akan semakin banyak pula metabolit yang dapat dipanen dari bakteri tersebut. Sementara sampel metabolit sekunder yang berupa media dipanen pada fase yang sama yaitu fase eksponensial. Setelah bakteri mancapai pertumbuhan

terbanyak pada fase eksponensial, selanjutnya bakteri akan memasuki fase stasioner karena nutrisi yang ada di dalam media telah habis. Untuk mempertahankan agar dirinya tetap hidup, maka metabolit primer yang tersisa dalam tubuh bakteri dikeluarkan sehingga terbentuklah metabolit sekunder

Tahap pemanenan metabolit sekunder ini dilakukan karena bakteri memproduksi metabolit sekunder keluar dan dilepaskan pada media pertumbuhannya. Menurut Kunaepah (2008), apabila nutrisi pada substrat mulai habis (fase stasioner), mikroba menghasilkan senyawa yang kemungkinan memiliki aktivitas antibakteri, yang dikeluarkan pada substrat untuk mempertahankan kondisi fisiologis.

3.3.1.4 Pembuatan Larutan Histidin

Pada pembuatan larutan histidin ini digunakan konsentrasi 500 ppm, langkah awal yang dilakukan adalah serbuk histidin di masukkan ke dalam botol plastik yang dilarutkan dengan aquabides sebanyak 150 ml, dan kemudian ditambahkan metabolit bakteri sebanyak 0,6 ml. Pada tahapan ini alasan menggunakan aquabides dikarenakan lebih murni dari pada aquades. Proses ini dapat dilihat pada Gambar 14.

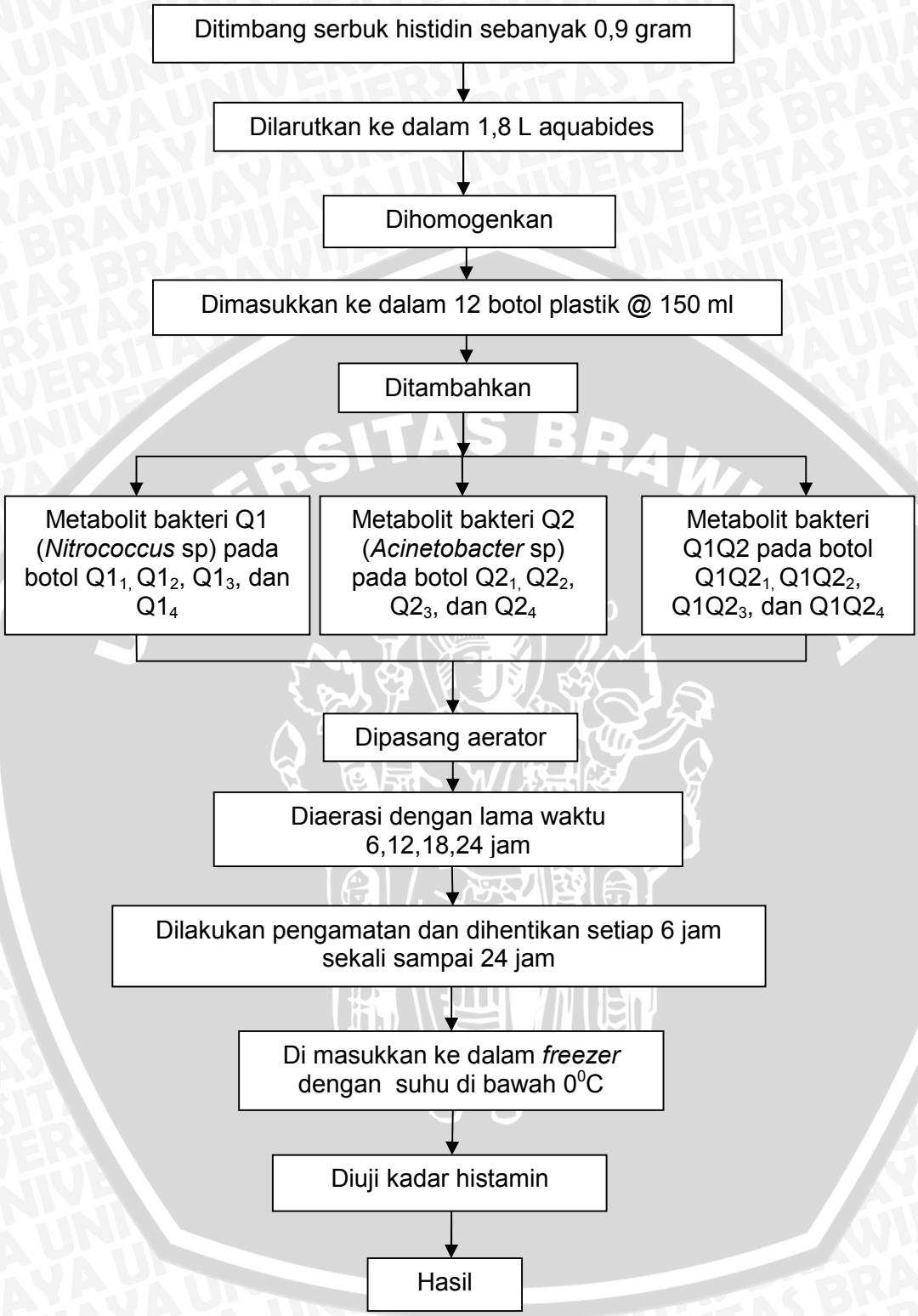


Gambar 14. Proses Pembuatan Histidin

3.3.2 Penelitian Tahap II (Aerasi)

Tahap awal yang dilakukan adalah larutan histidin dimasukkan kedalam 12 botol plastik masing-masing diisi 150 ml larutan histidin. Botol-botol plastik tadi kemudian diaerasi menggunakan aerator untuk pengkondisian oksigen di dalam botol agar metabolit dapat hidup. Kemudian dimasukkan metabolit dari 2 jenis bakteri yang berbeda ke dalam masing-masing botol plastik yang berisi larutan histidin tersebut. Konsentrasi bakteri yang digunakan, yakni sebesar 0,4% dari jumlah larutan histidin yang digunakan. Berdasarkan penelitian sebelumnya bahwa konsentrasi 0,4% lebih efektif. Metabolit bakteri *Nitrococcus* sp sebanyak 0,6 ml dimasukkan kedalam botol plastik Q1. Metabolit bakteri *Acinetobacter* sp sebanyak 0,6 ml dimasukkan kedalam botol plastik Q2. Tahap selanjutnya metabolit dari bakteri *Nitrococcus* sp dan *Acinetobacter* sp tadi dikombinasi masing-masing sebanyak 0,2 ml dimasukkan kedalam botol plastik yang diberi tanda Q1+Q2. Larutan histidin yang telah ditambah metabolit bakteri kemudian diaerasi selama 6 jam pertama yang diberi tanda $Q1_1$ (untuk metabolit bakteri *Nitrococcus* sp), $Q2_1$ (untuk metabolit bakteri *Acinetobacter* sp), dan $Q1Q2_1$ (untuk kombinasi metabolit bakteri *Nitrococcus* sp dan *Acinetobacter* sp). Perlakuan tersebut berlaku juga untuk perlakuan waktu 12 jam, 18 jam dan 24 jam. Sedangkan proses penyimpanan selama 24 jam tidak bisa dikatakan sebagai perlakuan, karena digunakan sebagai faktor pengamatan saja. Penelitian ini dilakukan dengan 3 kali ulangan. Setiap selesai perlakuan, botol disimpan di *freezer* dengan suhu dibawah 0^oC dengan tujuan untuk mengamankan histamin yang terbentuk agar tidak meningkat. Menurut Mahendradatta dan Langkong (2003), histamin yang disimpan pada suhu 0^oC 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^oC,

bagaimanapun aktivitas enzimatik akan tetap berlanjut menghasilkan produksi amin selanjutnya. Prosedur kerja aerasi larutan histidin dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Prosedur Kerja Aerasi Larutan Histidin + Metabolit Bakteri

Penelitian tahap II ini bertujuan untuk mengetahui perlakuan penambahan metabolit 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 metabolit bakteri yang digunakan, yakni penambahan metabolit dari bakteri *Nitrococcus* sp dan *Acinetobacter* sp.

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 :

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

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

t 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.

3.3.3 Rancangan Percobaan

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

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

3. Jika pada percobaa 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 deah rancangan percobaan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rancangan percobaan bentuk RAL faktorial

Perlakuan		Ulangan		
Bakteri 0,4 % (A)	Lama Aerasi (jam) (P)	1	2	3
Q1	D1	Q1D1	Q1D1	Q1D1
	D2	Q1D2	Q1D2	Q1D2
	D3	Q1D3	Q1D3	Q1D3
	D4	Q1D4	Q1D4	Q1D4
Q2	D1	Q2D1	Q2D1	Q2D1
	D2	Q2D2	Q2D2	Q2D2
	D3	Q2D3	Q2D3	Q2D3
	D4	Q2D4	Q2D4	Q2D4
Q3	D1	Q3D1	Q3D1	Q3D1
	D2	Q3D2	Q3D2	Q3D2
	D3	Q3D3	Q3D3	Q3D3
	D4	Q3D4	Q3D4	Q3D4

Keterangan :

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

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

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

Dimana :

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

μ = nilai rata-rata umum

α_i = pengaruh faktor perlakuan utama

β_j = pengaruh faktor perlakuan kedua

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

ε_{ijk} = kesalahan percobaan

Hasil dari analisa dilanjutkan dengan analisa sidik ragam (ANOVA). Bentuk analisa sidik ragam dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Tabel sidik ragam pada rancangan acak legkap (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 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 spektrofluorometri. Analisis pengujian histamin secara kuantitatif ini menggunakan metode spektrofluorometri sesuai SNI 2354. 10 tahun 2009.

Dimana menurut Wanenoor (2010), metode spektrofluorometri 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. Fluroresensi akan nampak jelas apabila penyerapan sinar pada daerah ultraviolet dan melepaskannya dalam daerah gelombang nampak.

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

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

Prosedur Analisis

- Timbang ± 10 ml sampel dalam *beaker glass* 250 ml dan tambahkan 50 ml metanol, blender hingga homogen
- Panaskan di atas *waterbath* selama 15 menit pada suhu 60º 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 16.

Gambar 16. *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 17.

Gambar 17. *Stirrer-plate*

Persiapan Kolom Resin

- Masukkan *glasswool* ke dalam kolom resin setinggi ±1,5 cm
- Masukkan resin dalam medium air ke kolom resin setinggi ± 8 cm, pertahankan volume air yang berada di atas resin ± 1cm, jangan dibiarkan kering. Resin dapat dilihat pada Gambar 18.

Gambar 18. 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 19.

Gambar 19. *Glasswool*

Pemurnian Sampel

- Pipet 1 ml *filtrate* contoh , masukkan dalam kolom resin, kran kolom resin dalam posisi terbuka biarkan aliran menetes (hasil elusi) ditampung dalam labu takar 50 ml

- Tambahkan aquades pada saat tinggi cairan ± 1 cm di atas resin dan biarkan cairan terelusi. Lakukan seterusnya hingga hasil elusi dalam labu takar tepat 50 ml. Hasil elusi (contoh) dapat disimpan dalam refrigerator

Pembentukan Senyawa Turunan (derivatisasi)

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

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

Perhitungan

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

$$y = a + bx$$

keterangan :

y = fluoresensi sampel;

a = intersep;

b = slope;

x = konsentrasi sampel yang akan dihitung

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

Keterangan :

A = konsentrasi (X) yang akan didapat dalam perhitungan (µg/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 varabel 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.