

repository.ub.ac.id

**PENGARUH PENAMBAHAN KOMBINASI METABOLIT BAKTERI
Bacillus sp, *Enterobacter* sp dan *Planococcus* sp DALAM
PEMBENTUKAN HISTAMIN DARI HISTIDIN MURNI SECARA *IN VITRO***

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

Oleh:

**TULUS BACHTIAR HIDAYAT
NIM. 0710830035**



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

repository.ub.ac.id

**PENGARUH PENAMBAHAN KOMBINASI METABOLIT BAKTERI
Bacillus sp, *Enterobacter* sp dan *Planococcus* sp DALAM
PEMBENTUKAN HISTAMIN DARI HISTIDIN MURNI SECARA *IN VITRO***

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

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Meraih Gelar Sarjana

Oleh:

TULUS BACHTIAR HIDAYAT

NIM. 0710830035



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



LAPORAN SKRIPSI

PENGARUH PENAMBAHAN KOMBINASI METABOLIT BAKTERI *Bacillus* sp,
Enterobacter sp dan *Planococcus* DALAM PEMBENTUKAN HISTAMIN DARI
HISTIDIN MURNI SECARA *IN VITRO*

Oleh :

TULUS BACHTIAR HIDAYAT

NIM. 0710830035

Mengetahui,

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I

Dosen Penguji I

Dr. Ir. Happy Nursyam, Ms

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

NIP. 19600322 198601 1 001

NIP. 19640919 198903 1 002

Tanggal:

Tanggal :

Dosen Pembimbing II

Dosen Penguji II

Ir. Yahya, Mp

Eko Waluyo, S.pi, M.sc

NIP. 19630706 199003 1 003

NIP. 19800424 200501 1 001

Tanggal:

Tanggal :

Mengetahui,

Ketua Jurusan

Dr. Ir. Happy Nursyam, MS

NIP. 19600322 198601 1 001

Tanggal :

RINGKASAN

TULUS BACHTIAR HIDAYAT. Skripsi Tentang Pengaruh Penambahan Kombinasi Metabolit Bakteri *Bacillus* sp, *Enterobacter* sp dan *Planococcus* Dalam Pembentukan Histamin Dari Histidin Murni Secara *In Vitro* (dibawah bimbingan **Dr. Ir. Happy Nursyam, MS.** dan **Ir. Yahya, MP.**)

Histidin adalah asam amino esensial, memiliki muatan positif imidazol kelompok fungsional. Merupakan salah satu dari 22 asam amino dasar yang ada dalam protein (Wikipedia, 2010). Histamin dihasilkan dari perombakan histidin yang merupakan prekursor histamin. Ada dua macam histidin dalam daging ikan, yaitu histidin bebas yang akan diubah menjadi histamin dan histidin terikat dalam protein (Sims *et al.*, 1992). Ditambahkan oleh Wibowo (2007), Histamin merupakan senyawa amin yang dihasilkan dari proses dekarboksilasi histidin bebas (α -amina- β -inidosal asam propionat).

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Dasar Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, dan Laboratorium Pengendalian dan Pengujian Mutu Hasil Perikanan (LPPMHP) Surabaya pada bulan Agustus – Desember 2011.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada kelompok eksperimen. Analisis pengujian histamin secara kuantitatif ini menggunakan metode spektrofotometri sesuai SNI 2354. 10 tahun 2009.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kombinasi metabolit bakteri *Bacillus* sp, *Enterobacter* sp, dan *Planococcus* sp mampu menguraikan histidin menjadi histamin dengan kemampuan yang berbeda. Untuk perlakuan penambahan kombinasi metabolit bakteri terbaik terdapat pada kombinasi metabolit bakteri *Bacillus* sp dan *Enterobacter* sp dan untuk perlakuan waktu aerasi terbaik yaitu pada 12 jam.

Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai penguraian histidin menjadi histamin dengan menggunakan metode lain, perlakuan yang berbeda, metabolit yang berbeda, dan manfaat penelitian ini terhadap masyarakat.

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Warrahmatullahi Wabarokatuh,

Segala puji syukur kehadiran Tuhan yang Maha Esa sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan skripsi ini dengan judul "Pengaruh Penambahan Kombinasi Metabolit Bakteri *Bacillus* sp, *Enterobacter* sp dan *Planococcus* Dalam Pembentukan Histamin Dari Histidin Murni Secara *In Vitro*". Laporan skripsi ini dibuat sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Penulis menyadari skripsi tidak akan selesai dengan lancar tanpa bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Allah S.W.T atas segala kemudahan yang diberikan
2. Semua keluarga dirumah
3. Bapak Dr. Happy Nursyam, MS selaku dosen pembimbing I
4. Bapak Ir. Yahya MP selaku dosen pembimbing II
5. Prof. Ir. Sukoso, M.sc. Ph.d selaku dosen penguji I
6. Eko Waluyo, S.pi, M.sc selaku dosen penguji II
7. Teman-teman THP angkatan 2007 yang selalu setia membantu dan memberi dukungan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik.
8. Semua pihak yang telah membantu hingga terselesainya skripsi ini dengan baik.

Penulis berharap laporan ini dapat bermanfaat bagi para pembaca sekalian, khususnya kepada mahasiswa Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, untuk dijadikan sebagai tambahan wawasan. Sebagai manusia biasa pastilah penyusun tidak luput dari kesalahan dalam pembuatan laporan ini, sehingga penyusun mengharapkan kritik dan saran dari pembaca sekalian.

Wassalam'alaikum Warrahmatullahi Wabarokatuh

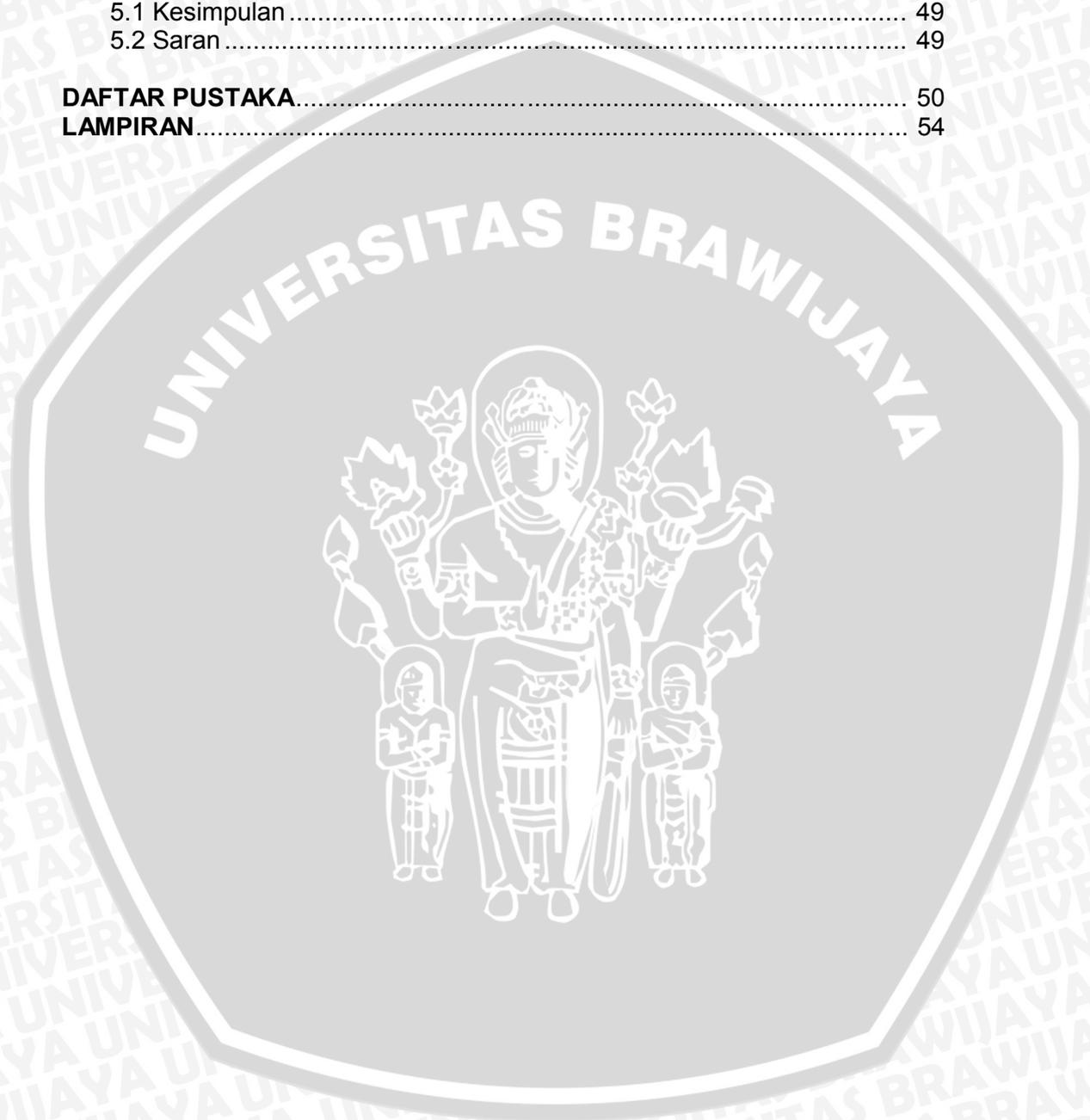
Malang, Januari 2012

Penyusun

DAFTAR ISI

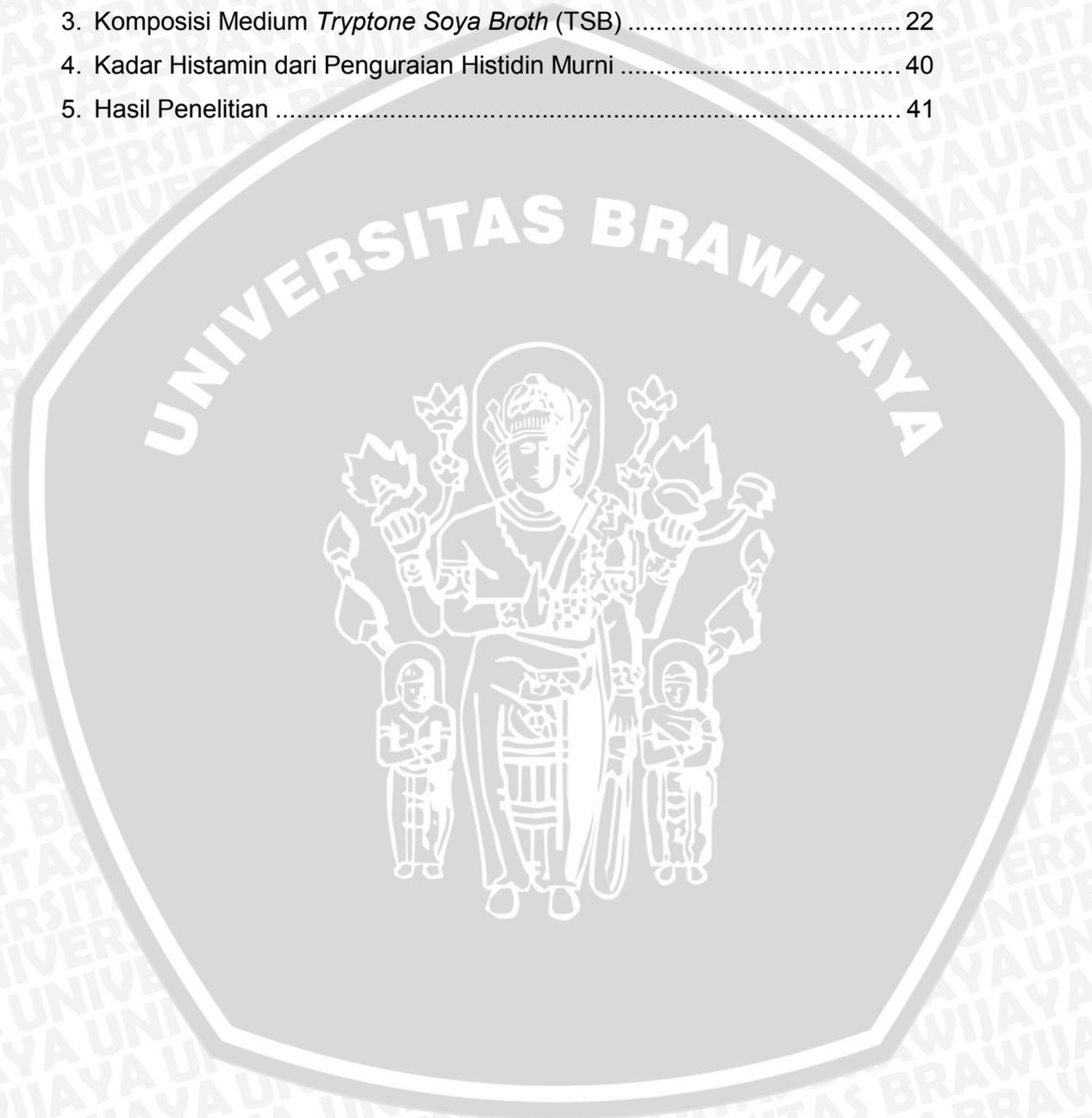
	Hal
KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	ii
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR LAMPIRAN	vi
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Kegunaan Penelitian	4
1.5 Hipotesis	5
1.6 Tempat dan Waktu	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Histidin	6
2.2 Histamin	7
2.3 Bakteri.....	8
2.3.1 Bakteri Penghasil Histamin.....	8
2.3.1.1 <i>Bacillus</i> sp.....	9
2.3.1.2 <i>Enterobacter</i> sp	10
2.3.1.3 <i>Planococcus</i> sp.....	11
2.4 <i>In Vitro</i>	12
2.5 Isolasi Bakteri.....	13
2.6 Metabolit Bakteri	13
2.6.1 Metabolit Primer	13
2.6.2 Metabolit Sekunder	14
2.7 Spektrofotometri.....	14
3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	17
3.1 Bahan Penelitian	17
3.2 Alat Penelitian	17
3.3 Metode Penelitian.....	18
3.3.1 Rancangan Penelitian	19
3.4 Prosedur Penelitian.....	21
3.4.1 Penelitian Tahap I (Pembiasaan Bakteri)	21
3.4.2 Penelitian Tahap II (Pengenceran Bakteri)	25
3.4.3 Pembuatan Metabolit Sekunder	28
3.4.4 Penelitian Tahap III (Pembuatan Larutan Histidin)	30
3.4.5 Penelitian Tahap IV (Aerasi).....	30
3.5 Pengujian Histamin	35
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	40
4.1 Hasil Pengamatan.....	40
4.2 Pembahasan.....	42
4.2.1 Analisa Uji Histamin	42

4.2.2 Pengaruh Penambahan Metabolit Bakteri Terhadap Kadar Histamin	46
4.2.3 Pengaruh Lama Aerasi Terhadap Kadar Histamin Yang Dihasilkan	47
4.2.4 Perlakuan Terbaik	47
5. KESIMPULAN DAN SARAN	49
5.1 Kesimpulan	49
5.2 Saran	49
DAFTAR PUSTAKA	50
LAMPIRAN	54



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Rancangan percobaan bentuk RAL faktorial.....	20
2. Tabel sidik ragam pada rancangan acak legkap (RAL) faktorial.....	21
3. Komposisi Medium <i>Tryptone Soya Broth</i> (TSB)	22
4. Kadar Histamin dari Penguraian Histidin Murni	40
5. Hasil Penelitian	41

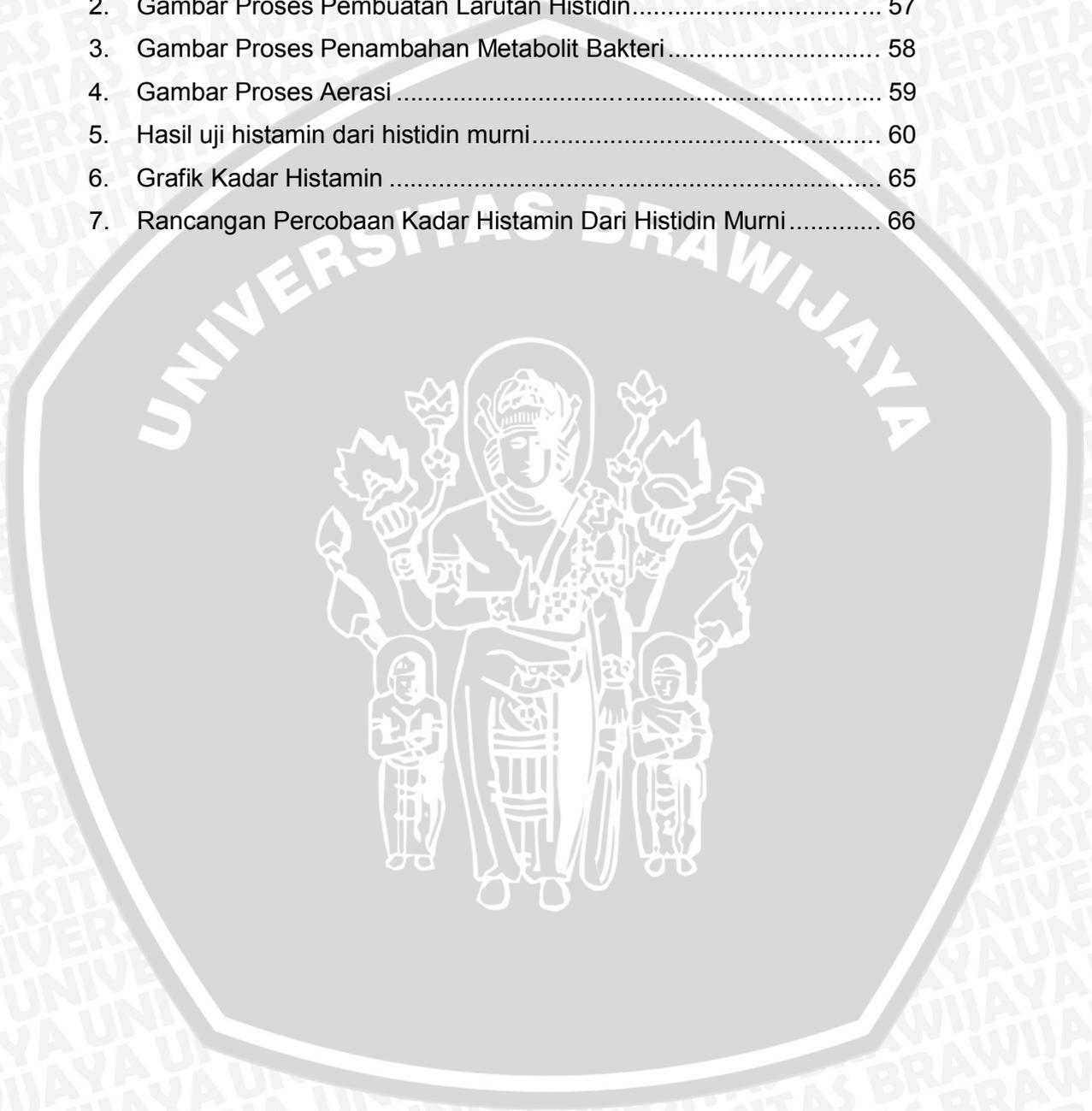


DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Perubahan histidin menjadi histamin	8
2. <i>Bacillus</i> sp	9
3. <i>Enterobacter</i> sp	10
4. <i>Planococcus</i> sp	11
5. Diagram optik fluorometer	15
6. Alat Spektrofotometri.....	16
7. Prosedur Kerja Sterilisasi Alat	24
8. Prosedur Kerja Pembuatan Media Cair	24
9. Prosedur Kerja Peremajaan Bakteri	25
10. Prosedur Kerja Pembuatan Larutan Pengenceran	27
11. Prosedur Kerja Pengenceran Bakteri	28
12. Pembuatan Metabolit Sekunder	29
13. Skema Kerja Pembuatan Larutan Histidin	30
14. Skema Kerja Aerasi Larutan Histidin Murni Dengan Ulangan.....	33
15. Spektrofluorometer	34
16. <i>Waterbath</i>	35
17. <i>Stirrer-plate</i>	36
18. Resin.....	36
19. <i>Glasswool</i>	37
20. Grafik pengaruh jenis bakteri terhadap kadar histamin.....	46
21. Grafik pengaruh lama aerasi terhadap kadar histamin.....	47

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kurva pertumbuhan bakteri	54
2. Gambar Proses Pembuatan Larutan Histidin.....	57
3. Gambar Proses Penambahan Metabolit Bakteri.....	58
4. Gambar Proses Aerasi	59
5. Hasil uji histamin dari histidin murni.....	60
6. Grafik Kadar Histamin	65
7. Rancangan Percobaan Kadar Histamin Dari Histidin Murni.....	66



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Histidin adalah asam amino esensial, memiliki muatan positif imidazol kelompok fungsional. Merupakan salah satu dari 22 asam amino dasar yang ada dalam protein. Histidin pertama kali diisolasi oleh dokter Jerman Albrecht Kossel pada tahun 1896. Histidin adalah asam amino esensial pada manusia dan mamalia lainnya. Pada awalnya diketahui hanya penting bagi bayi tapi setelah dilakukan penelitian lebih lanjut, menetapkan bahwa itu juga penting bagi manusia dewasa (Wikipedia, 2010). Histidin menjadi prekursor histamin, suatu amina yang berperan dalam sistem saraf, dan karnosin, suatu asam amino. Terdapat dua enantiomer histidin yaitu D-histidin dan L-histidin, namun yang lebih dominan adalah L-histidin (Agustiana, 2010). Histidin dapat diubah menjadi histamin selama proses pembusukan oleh bakteri pembentuk histamin yang mengandung enzim histidin dekarboksilase. Pembentukan histamin sering disebabkan oleh suhu ikan yang tinggi setelah penangkapan (Guizani *et al.*, 2005).

Histamin 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. Di bawah kondisi optimum, jumlah histamin dihasilkan melalui autolisis biasanya kurang dari 10-5 mg/100 g daging ikan. Selain itu produksi histamin juga dipengaruhi oleh suhu dan pH lingkungan (Witiak *et al.*, 1981; Kimata, 1961 dalam Rispayeni, 2005). Histamin dihasilkan dari perombakan histidin yang merupakan prekursor histamin. Ada dua macam histidin dalam daging ikan, yaitu histidin bebas yang akan

diubah menjadi histamin dan histidin terikat dalam protein (Sims *et al.*, 1992). Ditambahkan oleh Wibowo (2007), Histamin merupakan senyawa amin yang dihasilkan dari proses dekarboksilasi histidin bebas (α -amina- β -inidosal asam propionat). Proses pembentukan histamin pada ikan sangat dipengaruhi oleh aktivitas enzim *L-Histidine Decarboxylase* (HDC).

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*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Pedicoccus*, *Photobacterium*, *Salmonella*, *Shigella*, dan *Streptococcus* menunjukkan aktivitas dekarboksilase asam amino (Kanki *et al.*, 2002 dalam Allen 2004).

Bacillus sp. adalah bakteri berbentuk batang, bakteri gram positif dan salah satu Eubacteria terbesar yang ditemukan di tanah. Kelompok bakteri ini sering ditemukan dalam rantai di mana sel-sel yang bergabung bersama-sama dengan polisakarida pada dinding sel. *Bacillus* sp. mampu bertahan dalam beberapa kondisi lingkungan yang ekstrim seperti gurun karena membentuk spora. Dimana terdapat kondisi yang menguntungkan spora dapat bertahan (Wikipedia, 2011). *Enterobacter* sp. merupakan bakteri gram negative. Sitrat dan asetat dapat digunakan sebagai sumber karbon satu – satunya. Suhu optimum pertumbuhannya 37°C. dijumpai dalam limbah, tanah dan beberapa perairan alamiah. *Enterobacter* sp. berbentuk bulat, dengan diameter 0.6-1 μ m. merupakan jenis bakteri fakultatif anaerobik (Pelezar dan Chan, 1988). *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).

Metabolit sekunder pada suatu organisme hidup (natural product) merupakan suatu senyawa kimia yang diproduksi sebagai respon terhadap

lingkungannya, salah satunya sebagai sistem pertahanan diri. Senyawa kimia yang dilepaskan ini bersifat toksik terhadap lingkungannya, namun metabolit sekunder ini berpotensi sebagai anti virus, anti bakteri, anti malaria, anti inflamasi, anti oksidan, dan antikanker (Sijabat, 2009).

Penelitian ini dilaksanakan untuk mengetahui pengaruh kombinasi metabolit bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. dan *Planococcus* sp. terhadap pembentukan histamin dari histidin murni dengan tehnik In-Vitro karena penelitian ini untuk mengetahui yang terjadi diluar organisme dan cenderung untuk memfokuskan pada organ, jaringan, sel, komponen sel, protein dan biomolekul sehingga digunakan tehnik In-Vitro pada penelitian ini. Dalam pengujian histamin menggunakan metode spektrofotometri yaitu mempunyai prinsip mengekstrak kadar histamin dari sampel contoh dengan menggunakan metanol, sekaligus mengkonversinya kedalam bentuk OH, selanjutnya zat-zat histamin tersebut dimurnikan menggunakan resin penukar ion dan diubah kebentuk derivatnya dengan senyawa OPT, lalu diukur besar *fluoresensi* histamin secara fluorometri pada panjang gelombang exitasi 350 nm dan emisi 444 nm (SNI, 2009).

1.2 Rumusan Masalah

Pada penelitian pendahuluan yaitu bakteri dimasukkan dalam limbah pemindangan. Diduga bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. dan *Planacoccus* sp. merupakan bakteri dekarboksilase karena menghasilkan histamin pada uji histamin dengan sampel limbah pemindangan. Metabolit bakteri diduga menghasilkan histamin lebih besar. Kombinasi antar metabolit bakteri diduga juga dapat mempengaruhi kadar histamin yang dihasilkan. Oleh karena itu, dilakukan penelitian mengenai pengaruh kombinasi metabolit bakteri dekarboksilase (*Bacillus* sp, *Enterobacter* sp. dan *Planacoccus* sp.) terhadap

penguraian histidin murni secara *in-vitro*. Dari uraian tersebut didapatkan permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah kombinasi antara metabolit bakteri *Bacillus* sp. + *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp. + *Planococcus* sp., *Enterobacter* sp + *Planococcus* sp. dan *Bacillus* sp. + *Enterobacter* sp. + *Planococcus* sp. dapat mempengaruhi kuantitas histamin yang dihasilkan?
2. Apakah dengan perlakuan waktu yang berbeda dapat mempengaruhi kuantitas histamin yang dihasilkan?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui pengaruh dari penambahan kombinasi antara metabolit bakteri *Bacillus* sp. + *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp. + *Planococcus* sp., *Enterobacter* sp. + *Planococcus* sp. dan *Bacillus* sp. + *Enterobacter* sp. + *Planococcus* sp terhadap penguraian histidin menjadi histamin.
2. Untuk mengetahui kuantitas histamin yang dihasilkan dengan perlakuan waktu yang berbeda dan penyimpanan pada suhu dingin(dibawah 0°C).

1.4 Kegunaan Penelitian

Untuk memberikan informasi tentang penambahan kombinasi metabolit bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. dan *Planococcus* sp. dalam aplikasi *in-vitro* untuk mengurai histidin menjadi histamin sehingga dapat diteliti lebih lanjut tentang manfaat aplikasi kepada masyarakat

1.5 Hipotesis

1. Diduga penambahan kombinasi antara metabolit bakteri *Bacillus* sp. + *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp. + *Planococcus* sp., *Enterobacter* sp. + *Planococcus* sp. dan *Bacillus* sp. + *Enterobacter* sp. + *Planococcus* sp. dapat mempengaruhi kuantitas histamin yang dihasilkan.
2. Perlakuan waktu yang berbeda mempengaruhi kuantitas histamin yang dihasilkan.

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Dasar Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, dan Laboratorium Pengendalian dan Pengujian Mutu Hasil Perikanan (LPPMHP) Surabaya pada bulan Agustus – Desember 2011.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Histidin

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

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 aminodecarboxylase dan transaminase, untuk pyridoxal phosphat co-enzyme juga dihambat (Widiastuty, 2004).

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).

2.2 Histamin

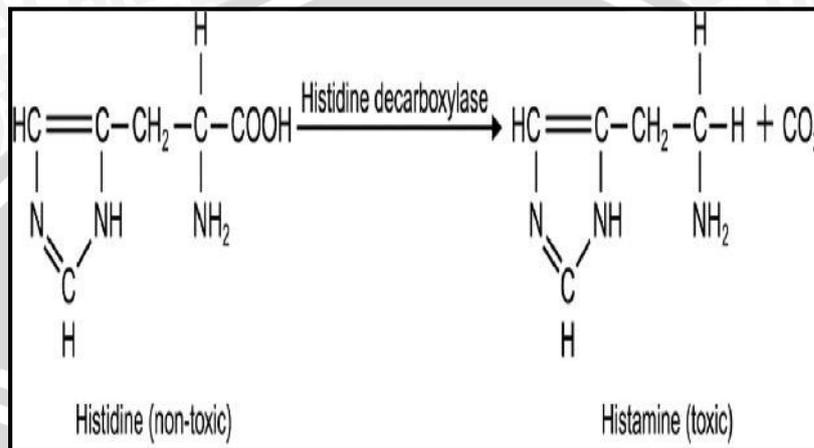
Histidin merupakan satu dari 20 asam amino dasar yang ada dalam protein. Bagi manusia histidin merupakan asam amino yang esensial bagi anak-anak. Rantai samping imidazol dan nilai pKa yang relative netral (yaitu 6,0) berarti bahwa perubahan sedikit saja pada pH sel akan mengubah muatannya. Sifat ini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

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 merupakan salah satu amin biogenik yang mempunyai pengaruh terhadap efek fisiologis manusia (Aflal *et. al.* 2006). Histamin merupakan perubahan dari histidin yang terbentuk di dalam makanan karena aktivitas bakteri penghasil enzyme histidin dekarboksilase (Taylor dan Behling, 1982).

Histamin merupakan senyawa yang penting dalam racun scromboid (racun yang ada didalam ikan jenis scromboidae), tetapi gejalanya tidak tampak ketika diaplikasikan dengan obat anti-histamin. Histamin bukan hanya senyawa

yang responsive untuk racun scromboid, karena tidak begitu beracun bila ikan tersebut dimakan secara langsung atau dalam keadaan segar. Racun histamin akan bertambah ketika bersama dengan senyawa amin yang lain, seperti putrescine dan cadaverin (Rodriguez *et al.*, 1994).

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 organisme yang paling banyak jumlahnya dan lebih tersebar luas dibandingkan makhluk hidup lain. Bakteri memiliki ratusan ribu spesies yang hidup di darat hingga lautan dan pada tempat-tempat yang ekstrim. Bakteri ada yang menguntungkan tetapi ada pula yang merugikan. Bakteri memiliki ciri-ciri yang membedakannya dengan makhluk hidup yang lain. Bakteri adalah organisme uniseluler dan prokariot serta umumnya tidak memiliki klorofil dan berukuran renik (mikroskopis) (Adhie, 2007).

2.3.1 Bakteri Penghasil Histamin

Bakteri penghasil histamin adalah bakteri yang dapat menghasilkan enzim histidin dekarboksilase, suatu enzim yang diperlukan dalam proses dekarboksilasi, perubahan dari histidin menjadi histamin. Bakteri penghasil

histamin jenisnya sangat banyak, kebanyakan berasal dari famili *Enterobacteriaceae* yang banyak terdapat pada isi perut ikan (Indriati, 2008).

2.3.1.1 *Bacillus* sp

Klasifikasi bakteri *Bacillus* sp dalam Zipcodezoo (2011^a), adalah sebagai berikut :

Kerajaan	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Famili	: Bacillaceae
Genus	: <i>Bacillus</i>
Spesies	: <i>Bacillus</i> sp



Gambar 2. *Bacillus* sp

Menurut Hold, *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 µm/ lebih pada beberapa strain. *Bacillus megaterium* 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.

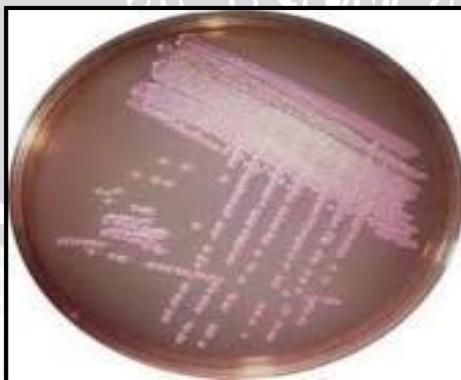
Pada media agar biasanya berwarna kuning pada inkubasi lama pertumbuhan dan medium menjadi coklat atau hitam.

Bacillus sp adalah berbentuk batang, Gram-positif, membentuk Endospora, spesies bakteri digunakan sebagai inokulan tanah di pertanian dan hortikultura. *Bacillus megaterium* adalah bakteri berbentuk batang dan salah satu Eubacteria terbesar yang ditemukan di tanah. Kelompok bakteri ini sering ditemukan dalam rantai di mana sel-sel yang bergabung bersama-sama dengan polisakarida pada dinding sel. *Bacillus megaterium* mampu bertahan dalam beberapa kondisi lingkungan yang ekstrim seperti gurun karena membentuk spora. Dimana terdapat kondisi yang menguntungkan spora dapat bertahan. Kadang-kadang ini bakteri tertentu dapat ditemukan pada permukaan umum yang sering disentuh (Wikipedia, 2011^b).

2.3.1.2 *Enterobacter* sp

Klasifikasi bakteri *Enterobacter gergoviae* dalam Zipcodezoo (2011^b), adalah sebagai berikut :

Kerajaan	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Enterobacter</i>
Spesies	: <i>Enterobacter</i> sp



Gambar 3. *Enterobacter* sp

Enterobacter sp bakteri gram negative, motil dengan bantuan flagellum peritrikus. Sitrat dan asetat dapat digunakan sebagai sumber karbon satu – satunya. Suhu optimum pertumbuhannya 37°C. dijumpai dalam limbah, tanah dan beberapa perairan alamiah. *Enterobacter* sp berbentuk bulat, dengan diameter 0.6-1µm. merupakan jenis bakteri fakultatif anaerobik (Pelezar dan Chan, 1988).

Enterobacter sp tidak memfermentasi D-sorbitol. Untuk penghasil β-xilosidase dan gelatinase hasil dari bakteri ini adalah negatif dan positif. Bakteri ini merupakan bakteri penghasil ODC dan LDC, tetapi tidak menghasilkan ADH. *Enterobacter gergoviae* 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).

2.3.1.3 *Planococcus* sp

Klasifikasi bakteri *Planococcus* sp dalam Zipcodezoo (2011^o), adalah sebagai berikut :

Kerajaan	: Animalia
Filum	: Arthropoda
Kelas	: Insecta
Ordo	: Hemiptera
Famili	: Pseudococcidae
Genus	: <i>Planococcus</i>
Spesies	: <i>Planococcus</i> sp



Gambar 4. *Planococcus* sp

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). Apabila bakteri hidup dalam suatu organisme hidup dapat bersifat patogen karena organisme tersebut dapat menjadi sumber makanannya (Pelczar dan Chan, 1986). Menurut Rodriguez (1988) *Planococcus* sp. dapat ditemukan pada tanah yang *hiper* salin, barang-barang yang mengandung garam tinggi dan makanan laut makarel. Penyebarannya ke dalam tanaman dapat melalui sumber air yang digunakan dalam penyiraman atau dari media tanam yang digunakan.

Menurut Holt *et al*, 1994, bentuk sel *Planococcus* sp adalah bulat, dengan ukuran diameter 1,0-1,2 μm , memiliki sel tunggal, motil, setiap sel biasanya memiliki satu atau dua flagella, tetapi ada juga yang memiliki tiga atau empat flagella, tidak ada pembentukan spora, dan termasuk gram positif. Bersifat chemoorganotrophs (system metabolisme berhubungan dengan pernafasan tidak pernah berfermentasi, tidak bisa memproduksi asam atau gas dari glukosa, maltose, laktosa, sukrosa. Hidup pada suhu 20°C - 37°C, dapat ditemukan di air laut, tetapi biasanya sering ditemukan di daerah muara.

2.4 *In Vitro*

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

Kultur *In Vitro* adalah suatu teknik untuk mengisolasi, sel, protoplasma, jaringan, dan organ dan menumbuhkan bagian tersebut pada nutrisi yang

mengandung zat pengatur tumbuh tanaman pada kondisi aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman sempurna kembali (Hamdan, 2008).

2.5 Isolasi Bakteri

Isolasi merupakan salah satu tahapan seleksi mikroba yang sangat potensial dalam suatu industri atau penelitian. Isolasi adalah cara yang dilakukan untuk mengidentifikasi jenis bakteri tertentu dari kelimpahan dan morfologinya. Sementara tujuan isolasi adalah untuk mendapatkan atau menumbuhkan jenis mikroorganisme tertentu. (Hast, 1992).

Isolasi digunakan untuk menambahkan pertumbuhan bakteri dan tidak membunuh bakteri tersebut. Metode isolasi yang banyak digunakan adalah pelapisan piring, media nutrisi yang paling baik yaitu agar yang dituangkan pada media steril (Dart, 2003).

Isolasi dapat dilakukan dengan menggunakan dua metode yaitu metode cawan tuang dan metode cawan tebar.

2.6 Metabolit Bakteri

Metabolit adalah intermediet dan produk dari metabolisme. Proses sintesis yang terjadi pada makhluk hidup termasuk bakteri adalah untuk menghasilkan metabolit primer dan metabolit sekunder. Kedua senyawa inilah yang diproduksi oleh bakteri dalam siklus hidupnya.

2.6.1 Metabolit Primer

Untuk menjaga kelangsungan hidup dan pertahanan dirinya, sponge menghasilkan metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit primer (DNA,

lemak, protein, karbohidrat) digunakan untuk pertumbuhan dan kelangsungan hidup (Sijabat, 2009).

Metabolit primer adalah senyawa yang termasuk produk akhir yang mempunyai berat molekul rendah dan dihasilkan pada fase eksponensial oleh mikroba. Senyawa digunakan sebagai bahan dasar pembangun makromolekul atau dikonversikan menjadi koenzim. Contohnya asam-asam organik seperti asam sitrat, asam fumarat dan asam amino (Dharma, 2005). Ditambahkan oleh (Kunaepah, 2008), Metabolit primer adalah senyawa-senyawa kimia yang dihasilkan oleh mikroba dan dibutuhkan oleh mikroba tersebut untuk pertumbuhannya. Metabolit primer antara lain asam laktat dan alkohol.

2.6.2 Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder pada suatu organisme hidup (natural product) merupakan suatu senyawa kimia yang diproduksi sebagai respon terhadap lingkungannya, salah satunya sebagai sistem pertahanan diri. Senyawa kimia yang dilepaskan ini bersifat toksik terhadap lingkungannya, namun metabolit sekunder ini berpotensi sebagai anti virus, anti bakteri, anti malaria, anti inflamasi, anti oksidan, dan antikanker (Sijabat, 2009).

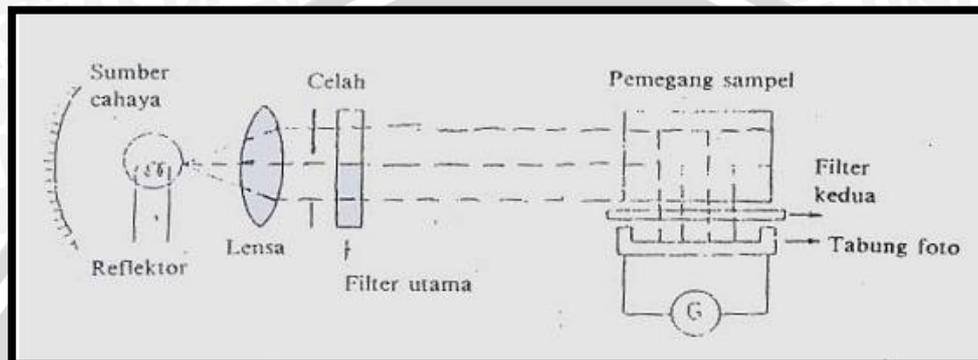
Menurut Dharma (2005), mikroba mampu mensintesis senyawa metabolit sekunder pada fase pertumbuhan stasioner. Senyawa metabolit sekunder tersebut digunakan sebagai nutrisi darurat untuk mempertahankan hidupnya. Metabolit sekunder dapat tergolong sebagai antibiotik biopestisida, mikotoksin, pigmen, alkaloid dan enzim.

2.7 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).

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

Metoda spektrofluorometri 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

repository.ub.ac.id

terbatas pada senyawa-senyawa yang berfluoresensi atau yang dapat dibuat berfluoresensi (Noviarty, 2007).



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



3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain terdiri dari bahan utama dan bahan tambahan. Bahan utama yang digunakan adalah serbuk histidin murni. Bahan tambahan yang digunakan adalah metabolit bakteri *Enterobacter* sp. yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Bakteri tersebut didapat dari lingkungan perairan limbah pemindangan. Dan metabolit bakteri endogenous mangrove yaitu *Bacillus* sp. serta bakteri *Planacoccus* sp. Media TSB untuk pertumbuhan *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp. dan *Planacoccus* sp., aquades, larutan NaCl, kertas saring, air ledeng, tissue, sarung tangan, sabun cair, waring, dan masker. Sedangkan untuk pengujian histamin dibutuhkan yaitu metanol, *glasswool*, aquades NaOH 1 N, HCl 0,1 N, resin penukar ion jenis *Dowex* 1-X8 50-10 mesh, *Orto-ptalatdikarbosildehyd* (OPT) 0,1 %, larutan standart histamin, larutan kerja, dan asam phospat (H_3PO_4) 3,57 N.

3.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu terdiri dari peralatan pembiakan bakteri sampai proses aerasi dan peralatan analisa kadar histamin. Peralatan pembiakan dan pengenceran bakteri, antara lain :laminar flow, tabung reaksi, kulkas, gelas arloji , rak tabung reaksi bertutup, pipet volum, *beaker glass*, timbangan digital, jarum osse, erlenmeyer, laminaran, gelas ukur, spatula, bunsen, botol semprot, nampan, inkubator, autoklaf. Peralatan aerasi larutan histidin yang digunakan adalah botol plastik dan seperangkat aerator. Sedangkan untuk pengujian kadar histamin, antara lain: corong dan botol *filtrat* contoh, kertas saring kasar, plastik, karet pengikat; kolom resin 20 cm x 0,8 cm,

reservoir 2 cm x 5 cm; labu takar 25 ml, 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml; pipet volumetric, spektrofotometer, *stirer-plate*, tabung reaksi 5 ml bertutup, timbangan analitis, *waterbath*.

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan yaitu eksperimen. Menurut Surachmad (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. 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.

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

3.3.1 Rancangan Penelitian

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 skema rancangan percobaan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rancangan percobaan bentuk RAL faktorial

Perlakuan		Ulangan		
Bakteri 0,4 % (P)	Lama Aerasi (jam) (Q)	1	2	3
P12	Q1	P12Q1	P12Q1	P12Q1
	Q2	P12Q2	P12Q2	P12Q2
	Q3	P12Q3	P12Q3	P12Q3
	Q4	P12Q4	P12Q4	P12Q4
P13	Q1	P13Q1	P13Q1	P13Q1
	Q2	P13Q2	P13Q2	P13Q2
	Q3	P13Q3	P13Q3	P13Q3
	Q4	P13Q4	P13Q4	P13Q4
P23	Q1	P23Q1	P3Q1	P3Q1
	Q2	P23Q2	P3Q2	P3Q2
	Q3	P23Q3	P3Q3	P3Q3
	Q4	P23Q4	P23Q4	P23Q4
P123	Q1	P123Q1	P123Q1	P123Q1
	Q2	P123Q2	P123Q2	P123Q2
	Q3	P123Q3	P123Q3	P123Q3
	Q4	P123Q4	P123Q4	P123Q4

Keterangan :

- P (1;2, 1;3, 2;3, 1;2;3) = Jenis gabungan metabolit bakteri yang digunakan dengan penambahan sebanyak 0,4% (ml)
- Q (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-...

μ = nilai rata-rata umum

- α_i = pengaruh faktor perlakuan utama
- β_j = pengaruh faktor perlakuan kedua
- $(\alpha\beta)_{ij}$ = pengaruh interaksi perlakuan pertama dan kedua
- ϵ_{ijk} = kesalahan percobaan

Hasil dari analisa dilanjutkan dengan analisa sidik ragam (ANOVA). Bentuk analisa sidik ragam dapat dilihat pada Tabel 2.

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

Sumber keragaman	Db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
Ulangan						
Perlakuan						
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 (Pembiakan Bakteri)

Penelitian tahap I yaitu pembiakan bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. 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). Stabilitas panas dari bakteri yang tidak bisa dihilangkan dengan cara direbus, sterilisasi

menggunakan uap panas dilakukan pada suhu dan tekanan yang tinggi di dalam autoklaf. Mesin ini beroperasi pada suhu 121°C dan dapat membunuh mikroba (Nicklin *et. al*, 1999). Adapun alat yang harus disterilkan yaitu laminaran, dengan cara menyemprot bagian dalamnya dengan cairan aseptis (alkohol 70%), selanjutnya 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 *Planacoccus sp.* yaitu media TSB. Pertama yaitu menimbang media TSB sebanyak 18 gram menggunakan timbangan digital. Kemudian media TSB dimasukkan kedalam erlenmeyer 1000 ml dan diberi aquades sebanyak 600 ml, lalu diaduk dengan spatula sampai homogen. Kemudian didapatkan media cair, lalu dimasukkan kedalam masing-masing erlenmeyer sebanyak 100 ml. Setelah itu disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit dengan tujuan menghilangkan kontaminan yang ada pada media. Setelah disterilisasi, media cair didiamkan sampai dingin agar botol tidak pecah ketika diberi perlakuan lebih lanjut.

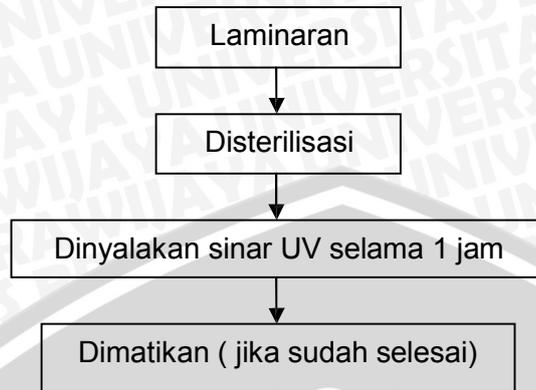
Adapun komposisi dari media TSB dapat dilihat pada tabel 3 dibawah ini :

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

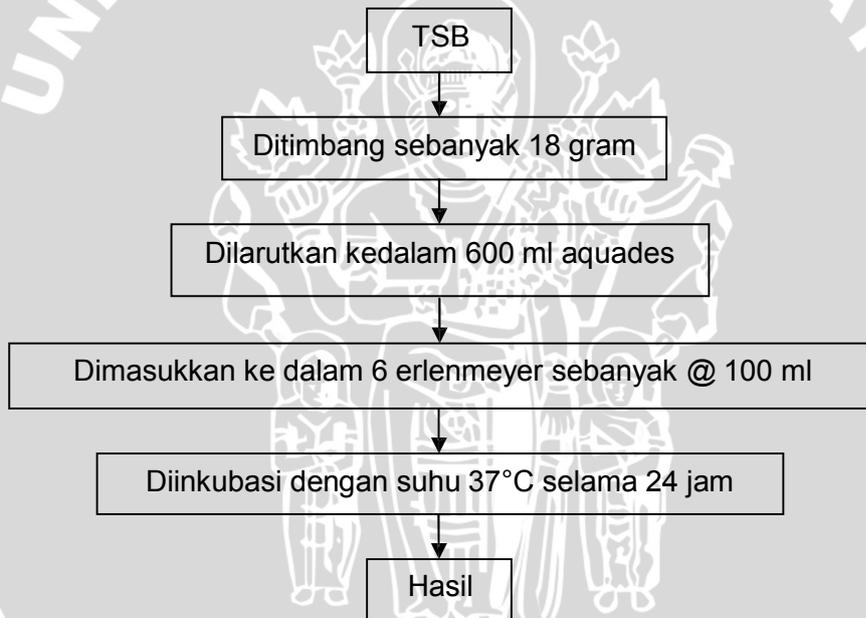
Formula	Gram per Liter
<i>Pandreatic Digest of Casein</i>	17
<i>Papaic Digest of Soybean Meal</i>	3
<i>Sodium Chloride</i>	5
<i>Dibasic Potassium phosphate</i>	2,5
<i>Dextrose</i>	2,5

Kemudian 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 di atas bunsen bagian permukaan erlenmeyernya dan segera ditutup. Jarum osse dipanaskan di atas bunsen lagi bagian ujungnya agar kembali steril saat digunakan untuk membiakkan bakteri yang lain. Setelah itu, bakteri dan media dihomogenkan, lalu diinkubator pada suhu 37⁰ C selama 24 jam. Setelah diinkubator, 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 sterilisasi alat, pembuatan media cair dan peremajaan bakteri dapat dilihat pada gambar 7, 8, dan 9.

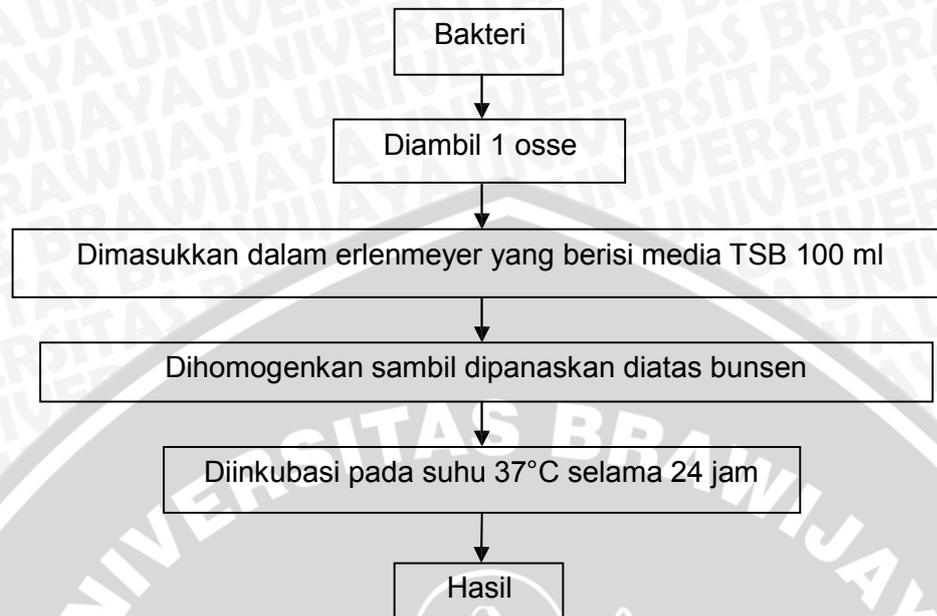
Gambar 7. Prosedur Kerja Sterilisasi Alat



Gambar 8. Prosedur Kerja Pembuatan Media Cair



Gambar 9. Prosedur Kerja Peremajaan Bakteri



3.4.2 Penelitian Tahap II (Pengenceran Bakteri)

Kondisi lingkungan di sekitarnya harus aseptis dalam melakukan pengenceran dan penanaman agar mikroorganisme yang tumbuh nantinya benar-benar mikroorganisme yang berasal dari sampel yang diuji. Dilakukan pengkondisian aseptis dengan menyalakan bunsen dan menyemprotkan alkohol. Agar tidak tertukar maka setiap erlenmeyer diberi tanda menggunakan kertas label.

Kemudian laminaran disterilkan dengan cara menyemprot bagian dalamnya dengan cairan aseptis (alkohol 70%) yang akan digunakan sebagai tempat pembiakan bakteri selanjutnya 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 2,961 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 120° C tekanan 1 atm selama 15 menit dengan tujuan menghilangkan kontaminan yang ada pada media. Setelah disterilisasi, media cair didiamkan sampai dingin agar botol tidak pecah ketika diberi perlakuan lebih lanjut. Karena pengenceran dilakukan sampai 10⁻⁶ dari 3 bakteri (*Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* sp.) dan dilakukan secara duplo maka dibutuhkan 36 tabung.

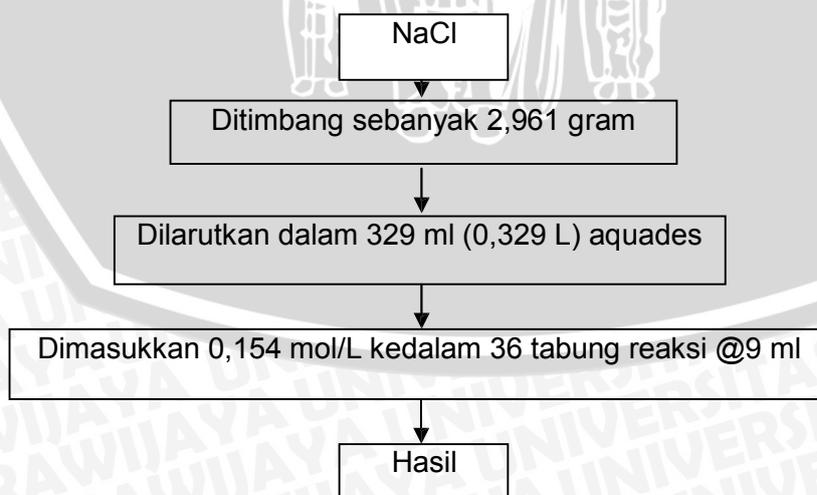
Setelah 1 jam Sinar UV pada laminaran dimatikan dan lampu pada laminaran dinyalakan untuk memudahkan penglihatan pada saat pengenceran bakteri. Bagian dalam laminaran disemprot dengan cairan aseptis, kemudian tangan yang telah dipasang sarung tangan disemprot juga agar tidak ada kontaminasi saat penanaman 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 ditaruh 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 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 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 $N_1.V_1 = N_2.V_2$

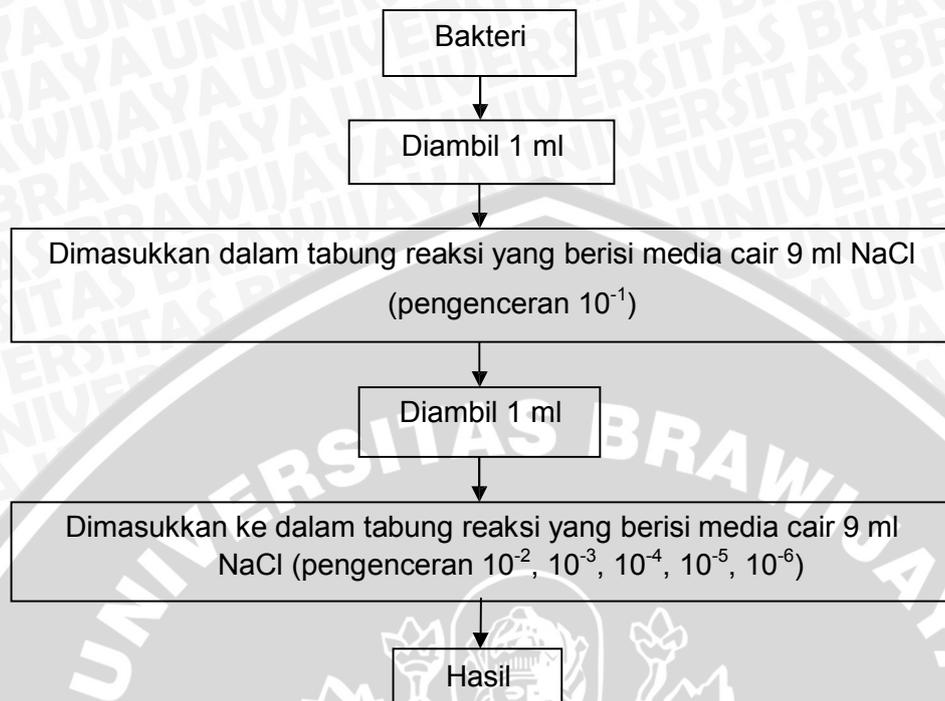
Tujuan dari pengenceran adalah untuk mengurangi kepadatan mikroba yang akan ditanam. Menurut Fardiaz (1993), bahan pangan yang diperkirakan mengandung lebih dari 300 sel mikroba pada per ml, per gram atau per cm permukaan memerlukan perlakuan pengenceran sebelum ditumbuhkan pada medium agar didalam cawan petri, sehingga setelah inkubasi akan terbentuk koloni dalam cawan petri, sehingga stelah inkubasi akan terbentuk koloni dalam jumlah yang dapat dihitung. Ditambahkan oleh 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 bakteri dapat dilihat pada gambar 10 dan 11.

Gambar 10. Prosedur Kerja Pembuatan Larutan Pengenceran



Gambar 11. Prosedur Kerja Pengenceran Bakteri



3.4.3 Pembuatan Metabolit Sekunder

Langkah awal dalam pembuatan metabolit sekunder yaitu menginokulasi kultur cair isolat bakteri dengan menggunakan media TSB pada Erlenmeyer, kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C 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°C, pada saat proses akan terjadi kerusakan pada metabolit yang ditandai dengan hilangnya nutrisi-nutrisi didalamnya, untuk itu digunakan suhu 4°C supaya terhindar dari kerusakan-kerusakan didalamnya. Tahapan proses sentrifugasi ini dilakukan sebanyak dua kali, hal ini dikarenakan untuk mendapatkan supernatan yang benar-benar murni. Sebelum pembuatan metabolit sekunder, dilakukan proses identifikasi bakteri melalui fase pertumbuhan bakteri (fase eksponensial). 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 nutrisi, 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).

Menurut hasil penelitian diketahui bahwa fase eksponensial ditunjukkan pada jam ke-19 sehingga pada jam tersebut dilakukan pemanenan bakteri dimana metabolit primer dan metabolit sekunder dipanen pada jam ke-19 karena pada fase ini jumlah pertumbuhan bakteri terbanyak. Pemanenan sampel berupa metabolit primer dan sekunder bakteri *Bacillus* sp, *Enterobacter* sp dan *planococcus* sp yang memiliki aktivitas antimikroba dilakukan berdasarkan metode Nofiani *et al.*, (2009), yang dimodifikasi. Prosedur kerja pembuatan metabolit sekunder dapat dilihat pada gambar 12.

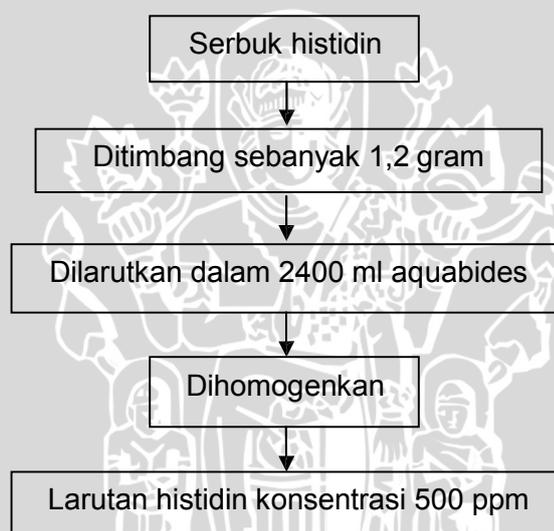
Gambar 12. Pembuatan Metabolit Sekunder



3.4.4 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 dengan ketelitian 0,0001 gram. Serbuk histidin kemudian dilarutkan dalam 2400 ml atau 2,4 L aquabides. Kemudian dihomogenkan dengan menggunakan spatula agar serbuk histidin dan aquabides homogen. Prosedur kerja pembuatan larutan histidin dapat dilihat pada gambar 13.

Gambar 13. Skema Kerja Pembuatan Larutan Histidin



3.4.5 Penelitian Tahap IV (Aerasi)

Larutan histidin kemudian dimasukkan ke dalam 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 kombinasi metabolit 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. Kombinasi metabolit Bakteri tersebut yaitu *Bacillus* sp. dan *Enterobacter* sp., metabolit bakteri *Bacillus* sp dan *Planococcus* sp., metabolit Bakteri *Enterobacter* sp, dan *Planococcus* sp. masing-masing sebanyak 0,3 ml. Dan kombinasi metabolit bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., dan *Planococcus* sp. masing-masing sebanyak 0,2 ml untuk menghindari kesalahan kemudian diberi tanda dengan kertas label dan dihomogenkan agar antara metabolit bakteri dan histidin yang telah dilarutkan dalam aquabides dapat homogen. Langkah selanjutnya adalah diberi perlakuan yaitu diaerasi dengan waktu 6, 12, 18, dan 24 jam, digunakan waktu yang berbeda untuk mengetahui perbedaan tingkat kadar histamin. Setelah 6 jam sekali, proses aerasi dihentikan dan dimasukkan kedalam freezer dengan suhu dibawah 0°C, hal ini bertujuan untuk menghentikan proses pengurian histamin menjadi histidin. Prosedur tersebut diulang sebanyak 3 kali ulangan dengan langkah yang sama. Langkah selanjutnya adalah dilakukan pengujian kadar histmin di BLPMHP (Balai Laboratorium Pengujian Mutu Hasil Perikanan) Surabaya.

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 :

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

Analisa data pada penelitian ini menggunakan uji t tidak berpasangan :

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

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

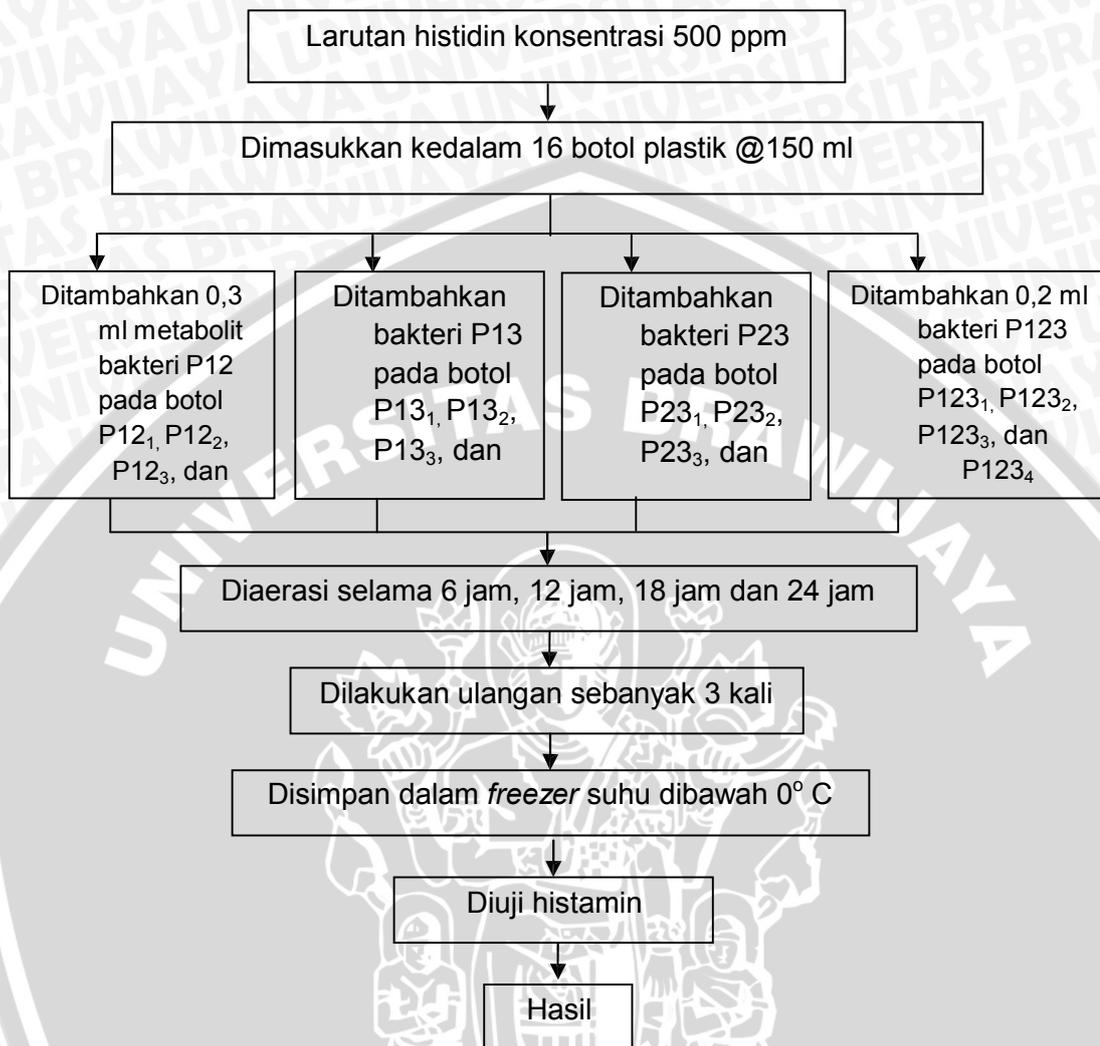
$$t \text{ hitung} = \left| A - B \right| \frac{\sqrt{\frac{1}{n-1} + \frac{1}{m-1}}}{\sqrt{JKS}}$$

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.

Bahwa histamin dapat diproduksi oleh histidin dekarboksilase meskipun bakteri sangat sedikit (Yamanaka *et al.* 1987 dalam Risna, 2003). 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 (Baranowski *et al.*, 1985 dalam Risna, 2003). Prosedur kerja aerasi larutan histidin dapat dilihat pada gambar 14.

Gambar 14. Skema Kerja Aerasi Larutan Histidin Murni Dengan Ulangan



Keterangan :

P1 = Metabolit bakteri *Bacillus* sp.

P2 = Metabolit bakteri *Enterobacter* sp.

P3 = Metabolit bakteri *Planococcus* sp.

1 = Perlakuan 6 jam

2 = Perlakuan 12 jam

3 = Perlakuan 18 jam

4 = Perlakuan 24 jam

3.5 Pengujian Histamin

Sampel larutan histidin yang telah dilakukan aerasi selama 6 jam, 12 jam, 18 jam, dan 24 jam kemudian diuji kadar histaminnya (biogenik amin) secara kuantitatif menggunakan metode spektrofotometri. Analisis pengujian histamin secara kuantitatif ini menggunakan metode spektrofotometri sesuai SNI 2354.10 tahun 2009. 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 (Wanenoer, 2010).

Prinsip metode pengujian histamin secara spektrofotometri menurut SNI 2354.10:2009 dilakukan dengan mengekstrak histamin dari jaringan daging contoh menggunakan metanol dan sekaligus mengkonversi histamin ke dalam bentuk OH. Zat-zat histamin selanjutnya dimurnikan melalui resin penukar ion dan diubah ke bentuk derivatnya dengan senyawa OPT. Besarnya *fluoresensi* histamin diukur secara fluorometri pada panjang gelombang excitasi 350 nm dan emisi 444 nm. Alat spektrofotometri dapat dilihat pada gambar 15.



Gambar 15. Spektrofotometer

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 methanol, blender hingga homogen
- Panaskan di atas *waterbath* selama 15 menit pada suhu 60 °C dijaga sampel dalam kondisi tertutup, dinginkan hingga suhu kamar.
- Tuangkan sampel ke dalam labu takar 100 ml dan tepatkan hingga volume labu dengan methanol
- 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 $\pm 1,5$ cm
- Masukkan resin dalam medium air ke kolom resin setinggi ± 8 cm, pertahankan volume air yang berada di atas resin ± 1 cm, jangan dibiarkan kering. Resin dapat dilihat pada gambar 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 \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 50ml 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 H₃PO₄ 3,57 N, kocok

- Lakukan pengukuran *fluorescence* terhadap sampel, standar dan blanko sesegera mungkin dengan alat spektrofлуorometer 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 histamine dalam (µg/g) atau mg/kg sampel.

- Konsentrasi histamine (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 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 .



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Pengamatan

Hasil penelitian analisa kadar histamin pada histidin murni dengan metode spektrofotometri yang sesuai dengan SNI 01-2354.10-2009 dengan panjang gelombang exitasi: 350 nm dan emisi : 444 nm yang telah diberi kombinasi metabolit dari bakteri *Bacillus* sp, *Enterobacter* sp dan *Planococcus* sp yang diaerasi dengan waktu 6, 12, 18 dan 24 jam dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Kadar Histamin dari Penguraian Histidin Murni

No	Kode Sampel	Perlakuan											
		6 Jam (mg/kg)			12 Jam (mg/kg)			18 Jam (mg/kg)			24 Jam (mg/kg)		
		Data			Data			Data			Data		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	Kontrol	0,05											
1	P12	4,57	4,54	4,54	4,17	4,50	4,50	5,47	3,40	3,40	2,85	2,70	2,70
2	P13	3,57	3,60	3,60	4,52	4,50	4,50	0,66	0,50	0,50	1,73	1,90	1,90
3	P23	1,50	1,44	1,44	0,78	0,84	0,84	0,47	0,50	0,50	3,59	3,64	3,64
4	P123	0,73	0,68	0,68	5,10	5,89	5,89	3,93	3,82	3,82	1,11	2,64	3,64

Keterangan:

P1 = Metabolit bakteri *Bacillus* sp

P2 = Metabolit bakteri *Enterobacter* sp

P3 = Metabolit bakteri *Planococcus* sp

Tabel 5. Hasil Penelitian

Perlakuan		Ulangan		
Bakteri 0,4 % (P)	Lama Aerasi (jam) (Q)	1	2	3
P12	Q1	4,57	4,54	4,54
	Q2	4,17	4,50	4,50
	Q3	5,47	3,40	3,40
	Q4	2,85	2,70	2,70
P13	Q1	3,57	3,60	3,60
	Q2	4,52	4,50	4,50
	Q3	0,66	0,50	0,50
	Q4	1,73	1,90	1,90
P23	Q1	1,50	1,44	1,44
	Q2	0,78	0,84	0,84
	Q3	0,47	0,50	0,50
	Q4	3,59	3,64	3,64
P123	Q1	0,73	0,68	0,68
	Q2	5,10	5,89	5,89
	Q3	3,93	3,82	3,82
	Q4	1,11	2,64	2,64

Keterangan :

P12Q1 :Aerasi selama 6 jam dengan penambahan metabolit bakteri *Bacillus* sp. dan *Enterobacter* sp.

P12Q2 :Aerasi selama 12 jam dengan penambahan metabolit bakteri *Bacillus* sp. dan *Enterobacter* sp.

P12Q3 :Aerasi selama 18 jam dengan penambahan metabolit bakteri *Bacillus* sp. dan *Enterobacter* sp.

P12Q4 :Aerasi selama 24 jam dengan penambahan metabolit bakteri *Bacillus* sp. dan *Enterobacter* sp.

P13Q1 :Aerasi selama 6 jam dengan penambahan metabolit bakteri *Bacillus* sp. dan *Planococcus* sp.

P13Q2 :Aerasi selama 12 jam dengan penambahan metabolit bakteri *Bacillus* sp. dan *Planococcus* sp.

P13Q3 :Aerasi selama 18 jam dengan penambahan metabolit bakteri *Bacillus* sp. dan *Planococcus* sp.

P13Q4 :Aerasi selama 24 jam dengan penambahan metabolit bakteri *Bacillus* sp. dan *Planococcus* sp.

P23Q1 :Aerasi selama 6 jam dengan penambahan metabolit bakteri *Enterobacter* sp. dan *Planococcus* sp.

P23Q2 :Aerasi selama 12 jam dengan penambahan metabolit bakteri *Enterobacter* sp. dan *Planococcus* sp.

P23Q3 :Aerasi selama 18 jam dengan penambahan metabolit bakteri *Enterobacter* sp. dan *Planococcus* sp.

P23Q4 :Aerasi selama 24 jam dengan penambahan metabolit bakteri *Enterobacter* sp. dan *Planococcus* sp.

P123Q1 :Aerasi selama 6 jam dengan penambahan metabolit bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. dan *Planococcus* sp.

P123Q2 :Aerasi selama 12 jam dengan penambahan metabolit bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. dan *Planococcus* sp.

P123Q3 :Aerasi selama 18 jam dengan penambahan metabolit bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. dan *Planococcus* sp.

P123Q4 :Aerasi selama 24 jam dengan penambahan metabolit bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. dan *Planococcus* sp.

4.2 Pembahasan

4.2.1 Analisa Uji Histamin

Pengujian histamin ini dilaksanakan di Laboratorium Pengujian dan Pengawasan Mutu Hasil Perikanan (LPMHP) Surabaya. Pengujian histamin ini menggunakan metode spektrofotometri.

Histamin 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 gratis asam amino melalui aksi anaerob (J.E. Sander, 1996). Dalam Danur (1993) disebutkan bahwa, histamin adalah senyawa biogenik amin yang sering terbentuk pada ikan pindang. Senyawa ini terbentuk akibat proses

dekarboksilasi histidin yang banyak terdapat di dalam tubuh ikan oleh enzim dekarboksilase mikroba. Pengujian kadar histamin dengan hanya menggunakan histidin murni yang ditambahkan metabolit bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. dan *Planococcus* sp. mempunyai maksud untuk mengetahui pengaruh metabolit bakteri *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. dan *Planococcus* sp. yang secara dominan merupakan bakteri dekarboksilase yaitu bakteri yang dapat menghasilkan histamin.

Pengujian kadar histamin dapat ditentukan menggunakan beberapa metode antara lain metode Spektrofluorometri dan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Pada penelitian ini digunakan metode Spektrofluorometri karena metode ini hasilnya lebih cepat dan ekonomis. Metode spektrofluorometri mempunyai prinsip mengekstrak kadar histamin dari sampel contoh dengan menggunakan metanol, sekaligus mengkonversinya kedalam bentuk OH, selanjutnya zat-zat histamin tersebut dimurnikan menggunakan resin penukar ion dan diubah kebentuk derivatnya dengan senyawa OPT, lalu diukur besar *fluoresensi* histamin secara fluorometri pada panjang gelombang excitasi 350 nm dan emisi 444 nm.

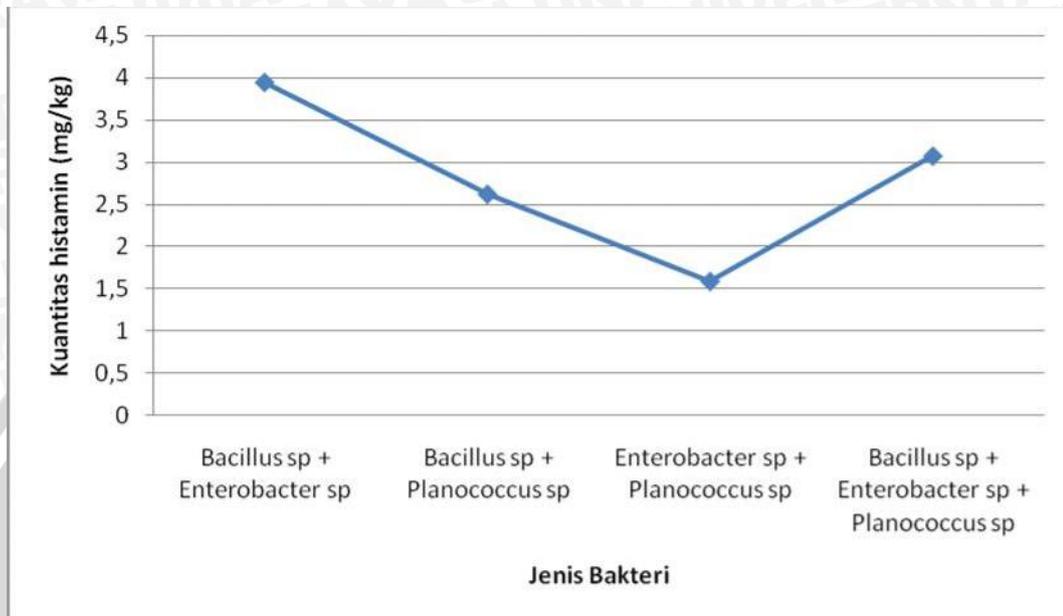
Berdasarkan pengujian histamin pada Tabel 4 menggunakan metode spektrofluorometri secara kuantitatif, yaitu 1,2 gr histidin murni yang dilarutkan dengan 2,4 liter aquabidestilata dengan penambahan kombinasi metabolit bakteri *Bacillus* sp, *Enterobacter* sp, *Planococcus* sp yang diberi perlakuan yaitu diaerasi dengan waktu 6, 12, 18, dan 24 jam. Diperoleh hasil untuk kombinasi metabolit bakteri *Bacillus* sp dan *Enterobacter* pada perlakuan 6 jam pertama memiliki nilai 4,57 mg/kg, pada perlakuan 12 jam 4,17 mg/kg, perlakuan 18 jam 5,47 mg/kg dan pada perlakuan 24 jam memiliki nilai sebesar 2,85 mg/kg. Sedangkan untuk data ke 2 didapatkan hasil kadar histamin untuk perlakuan 6 jam pertama 4,54 mg/kg, pada perlakuan 12 jam didapatkan hasil 4,50 mg/kg,

perlakuan 18 jam 3,40 mg/kg dan pada perlakuan 24 jam memiliki nilai sebesar 2,70 mg/kg. Untuk data yang ketiga memiliki nilai yang sama dengan data yang kedua, dari ketiga data tersebut hasil yang diperoleh tidak jauh berbeda. Dari hasil kombinasi metabolit bakteri *Bacillus* sp dan *Enterobacter* sp dalam menguraikan histidin menjadi histamin memiliki nilai yang cenderung naik turun selama 24 jam dan memiliki nilai maksimal 5,47 mg/kg. Diperoleh hasil untuk kombinasi metabolit bakteri *Bacillus* sp dan *Planococcus* sp pada perlakuan 6 jam pertama memiliki nilai sebesar 3,57 mg/kg, untuk perlakuan 12 jam memiliki nilai sebesar 4,52 mg/kg, perlakuan 18 jam memiliki nilai sebesar 0,66 mg/kg. Dan perlakuan 24 jam memiliki nilai sebesar 1,73 mg/kg. Untuk data kedua didapatkan hasil kadar histamin pada perlakuan 6 jam memiliki nilai sebesar 3,60 mg/kg, perlakuan 12 jam memiliki nilai sebesar 4,50 mg/kg, perlakuan 18 jam memiliki nilai sebesar 0,50 mg/kg dan untuk perlakuan 24 jam memiliki nilai sebesar 1,90 mg/kg. Sedangkan untuk data ketiga memiliki nilai sama dengan data kedua, dari ketiga data tersebut dapat disimpulkan kombinasi metabolit bakteri *Bacillus* sp dan *Planococcus* sp cenderung mengalami naik turun yang memiliki nilai maksimal 4,50 mg/kg dalam penguraian histidin menjadi histamin. Diperoleh hasil untuk kombinasi metabolit bakteri *Enterobacter* sp dan *Planococcus* sp pada perlakuan 6 jam pertama memiliki nilai sebesar 1,50 mg/kg, pada perlakuan 12 jam memiliki nilai sebesar 0,78 mg/kg, sedangkan pada perlakuan 18 jam memiliki nilai sebesar 0,47 mg/kg dan pada perlakuan yang terakhir dengan waktu 24 jam memiliki nilai sebesar 3,59 mg/kg. Dari hasil data kedua memiliki kandungan histamin sebesar 1,44 mg/kg untuk perlakuan 6 jam, untuk perlakuan 12 jam memiliki nilai sebesar 0,84 mg/kg, untuk perlakuan 18 jam memiliki nilai sebesar 0,50 mg/kg dan untuk perlakuan 24 jam memiliki nilai sebesar 3,64. Pada data ketiga memiliki nilai yang sama dengan data kedua dari ketiga data tersebut memiliki perbedaan nilai yang tidak jauh berbeda. Dari

hasil ini kombinasi metabolit bakteri *Enterobacter* sp dan *Planococcus* sp dalam menguraikan histidin menjadi histamin memiliki nilai yang cenderung naik turun yaitu turun pada perlakuan 12 dan 18 jam dan naik pada perlakuan 24 jam yang memiliki nilai maksimal 3,64 mg/kg. Dan yang terakhir adalah kombinasi metabolit bakteri *Enterobacter* sp, *Enterobacter* sp dan *Planococcus* sp pada perlakuan 6 jam pertama memiliki nilai sebesar 0,73 mg/kg, pada perlakuan 12 jam memiliki nilai sebesar 5,10 mg/kg, sedangkan pada perlakuan 18 jam memiliki nilai sebesar 3,93 mg/kg dan pada perlakuan yang terakhir dengan waktu 24 jam memiliki nilai sebesar 1,11 mg/kg. Dari hasil data kedua memiliki kandungan histamin sebesar 0,68 mg/kg untuk perlakuan 6 jam, untuk perlakuan 12 jam memiliki nilai sebesar 5,89 mg/kg, untuk perlakuan 18 jam memiliki nilai sebesar 3,82 mg/kg dan untuk perlakuan 24 jam memiliki nilai sebesar 2,64. Pada data ketiga memiliki nilai yang sama dengan data kedua dari ketiga data tersebut memiliki perbedaan nilai yang tidak jauh berbeda. Dari hasil ini kombinasi metabolit bakteri *Bacillus* sp, *Enterobacter* sp dan *Planococcus* sp dalam menguraikan histidin menjadi histamin memiliki nilai yang cenderung naik turun yaitu naik pada perlakuan 12 dan mengalami penurunan pada perlakuan 18 dan 24 jam yang memiliki nilai maksimal 5,89 mg/kg. Tidak terdapat hubungan yang konsisten antara jumlah bakteri penghasil histamin dengan kadar histamin yang dihasilkan pada beberapa sampel ikan asap dipasar ikan Auckland (Fletcher *et al*, 1998). Ditambahkan oleh Bennour *et al*, (1991), yang menyatakan bahwa produksi histamin tidak selalu berkorelasi dengan besarnya jumlah bakteri penghasil histamin, tetapi lebih berkaitan dengan kemampuan bakteri tersebut mensintesis histidin dekarboksilase.

4.2.2 Pengaruh Penambahan Metabolit Bakteri Terhadap Kadar Histamin

Pengaruh penambahan metabolit bakteri terhadap kadar histamin yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar di bawah ini :



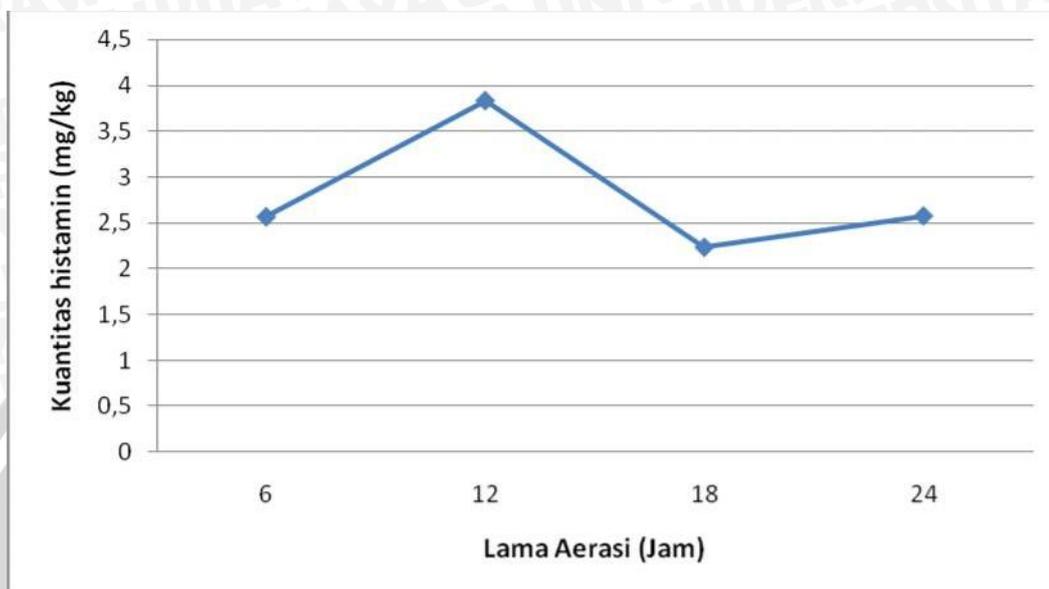
Gambar 20. Grafik pengaruh jenis bakteri terhadap kadar histamin

Dari grafik di atas dapat dilihat bahwa ada perbedaan tingkat kemampuan antara kombinasi metabolit bakteri yang satu dengan yang lain untuk menguraikan histidin murni menjadi histamin. Dari grafik di atas kombinasi metabolit bakteri *Bacillus* sp dan *Enterobacter* sp memiliki kemampuan yang maksimal untuk menguraikan histidin murni menjadi histamin. Sedangkan untuk kombinasi metabolit bakteri *Enterobacter* sp dan *Planococcus* sp mempunyai kemampuan yang rendah dalam menguraikan histidin murni menjadi histamin. Dari hasil di atas dapat disimpulkan bahwa kombinasi metabolit bakteri tersebut mampu menguraikan histidin murni menjadi histamin.

Bakteri penghasil histamin adalah bakteri yang dapat menghasilkan enzim histidin dekarboksilase, suatu enzim yang diperlukan dalam proses dekarboksilasi, perubahan dari histidin menjadi histamine (Indriati *et al.*, 2006).

4.2.3 Pengaruh Lama Aerasi Terhadap Kadar Histamin Yang Dihasilkan

Pengaruh lama aerasi terhadap kadar histamin yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar di bawah ini :



Gambar 21. Grafik pengaruh lama aerasi terhadap kadar histamin

Dari grafik di atas dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan terhadap tingkat lama aerasi untuk penguraian histidin murni menjadi histamin. Sehingga dapat disimpulkan bahwa kadar histamin yang tertinggi terdapat pada perlakuan 12 Jam. Sedangkan nilai histamin yang terendah terdapat pada perlakuan 18 jam. Histamin merupakan perubahan dari histidin yang terbentuk di dalam makanan karena aktivitas bakteri penghasil enzim histidin dekarboksilase (Taylor dan Behling, 1982). Ditambahkan pula oleh Guizani *et al.*, (2005), bahwa histidin dapat diubah menjadi histamin selama proses pembusukan oleh bakteri pembentuk histamin yang mengandung enzim histidin dekarboksilase.

4.2.4 Perlakuan Terbaik

Dapat disimpulkan dari hasil analisa statistik dari 4 perlakuan waktu yang berbeda yaitu 6 jam, 12 jam, 18 jam, dan 24 jam dengan penambahan kombinasi metabolit bakteri dihasilkan kombinasi metabolit bakteri *Bacillus* sp dan

Enterobacter sp dan pada lama aerasi 12 jam yang mempunyai kadar histamin tertinggi. Perlakuan yang memiliki nilai tertinggi tersebut didukung dari grafik pada Gambar 22 dan 23. Hal ini dikarenakan kombinasi metabolit dari bakteri *Bacillus* sp dan *Enterobacter* sp memiliki aktivitas enzim dekarboksilase lebih besar dibandingkan dengan kombinasi bakteri lainnya.

Bakteri penghasil histamin termasuk pada golongan *Enterobacteriaceae*, beberapa *vibrio* sp, *Clostridium* dan *Lactobacillus* sp. Penghasil histamin paling banyak adalah *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* dan *Hafina alvei* (Huss, 1994; dalam Indahwidiastuti, 2010). Bakteri yang memiliki enzim histidin dekarboksilase atau biasa disebut bakteri penghasil histamine sebagian besar termasuk ke dalam famili Enterobacteriaceae (Kusmarwati, 2008).

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.

Ketiga bakteri tersebut termasuk golongan bakteri dekarboksilase sesuai dengan pernyataan Staruszkiewicz (2002) dalam Allen (2004), berbagai bakteri yang mampu menghasilkan enzim histidin dekarboksilase (HDC) termasuk famili Enterobactericeae dan Bacillaceae. Selain itu, bakteri-bakteri tersebut merupakan kelompok bakteri penghasil enzim histidin dekarboksilase (HDC), yang berfungsi untuk mengubah asam amino histidin menjadi histamin sehingga kadar histaminnya semakin meningkat.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang pembentukan histamin dari histidin murni oleh kombinasi metabolit bakteri dekarboksilase (*Bacillus sp*, *Enterobacter sp*, dan *Planococcus sp*) secara *in-vitro* dapat disimpulkan antara lain:

- Penambahan kombinasi metabolit bakteri *Bacillus sp.*, *Enterobacter sp.*, dan *Planococcus sp.* mampu menguraikan histidin menjadi histamin.
- Panggabungan (kombinasi) metabolit bakteri *Bacillus sp* dan *Enterobacter sp* sangat efektif dalam penguraian histidin menjadi histamin.
- Perlakuan waktu yang berbeda mempengaruhi kadar histamin yang dihasilkan berdasarkan kemampuan dari jenis-jenis metabolit bakteri dalam mensintesis histidin dekarboksilase. Berdasarkan hasil penelitian perlakuan 12 jam efektif dalam penguraian histidin murni menjadi histamin.

5.2 Saran

Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai penguraian histidin menjadi histamin dengan menggunakan metode lain, perlakuan yang berbeda, metabolit yang berbeda, dan manfaat penelitian ini terhadap masyarakat.

DAFTAR PUSTAKA

- Adhie. 2007. **Bakteri, Ciri-ciri, Struktur, Perkembangbiakan, Bentuk dan Manfaatnya**. <http://www.WordPress.com> weblog. Diakses tanggal 5 April 2010.
- 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.
- 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
- Bennour, M., marrakchi, A.E., Bouchriti, N., Hamama, A. And Quadaa, M.E. 1991. **Chemical and Microbiological assessment of Mackerel (*Scomber scombrusti*) stored in ice**. J Food Prot. 54:789-792
- Danur, I. A. I. 1993. **Mempelajari Metode Reduksi Kadar Histamin Dalam Pembuatan Pindang Tongkol**. Fakultas Teknologi Pertanian InstitutPertanianBogor.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
- Dharma, Bodhi. 2005. **Mikrobiologi Industri**. Jakarta.
- 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.
- Guizani, N; A. A. Moza; M. A. Ismail; M. Ann and S. R. Mohammad. 2005. **The Effect of Storage Temperature and Histamine Production and The Freshness of Yellowfin Tuna (*Thunus albacares*)**. Journal Food Research International.

Hamdan. 2008. **Kultur Jaringan**. [http:// hamdan.blogspot.html](http://hamdan.blogspot.html). diakses tanggal 1 Desember 2011 pukul 20.54 WIB.

Hast, O. 1992. **Mikrobiologi untuk Umum**. Raja Grafindo Persada. Jakarta.

Holt JC, Bergey DH (1994). **Bergey's manual of determinative bacteriology** (edisi ke-9th ed.). Baltimore: Williams & Wilkins. ISBN 0-683-00603-7.

Huss. 1994. **Bakteri Penghasil Histamin**. www.damandiri.or.id/file/indahwidiastuty_ipbbab2.pdf. Diakses pada tanggal 07 Juli 2010. Pukul 07.15 WIB.

Indriati, N dan Arifah, K. 2008. **Penggunaan Ekstrak Daun Sirih Untuk Menghambat Pertumbuhan Bakteri Penghasil Histamin**. Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan Vol.4.

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.

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 Departement of Human Service. [www. Fodsafety.vic.gov.au](http://www.Fodsafety.vic.gov.au)

Kunaepah, Uun. 2008. **Pengaruh Lama Fermentasi Dan Konsentrasi Glukosa Terhadap Aktivitas Antibakteri, Polifenol Total Dan Mutu Kimia Kefir Susu Kacang Merah**. Program Pascasarjana Universitas Diponegoro. Semarang

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.

Nazir, M. 1989. **Metode Penelitian**. PT. Ghalia Indonesia. Jakarta.

Nicklin, Y. K., Gloema, C and T. Fogel. 1999. **Microbiology**. Blog Scientit Publisher.

Nofiani, R., Siti, N. Ajuk, S. 2009. **Aktivitas Antimikroba Ekstrak Metanol Bakteri Berasosiasi Spons dari Pulau Lemukutan, Kalimantan Barat**. Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Tanjungpura. Pontianak.

Noviarty. 2007. **Kalibrasi Alat Spektrofluorometer Luminesen Ls-5b Menggunakan Bahan Standar Ovalen**. Pusat Teknologi Bahan Bakar Nuklir, BATAN. Tangerang.

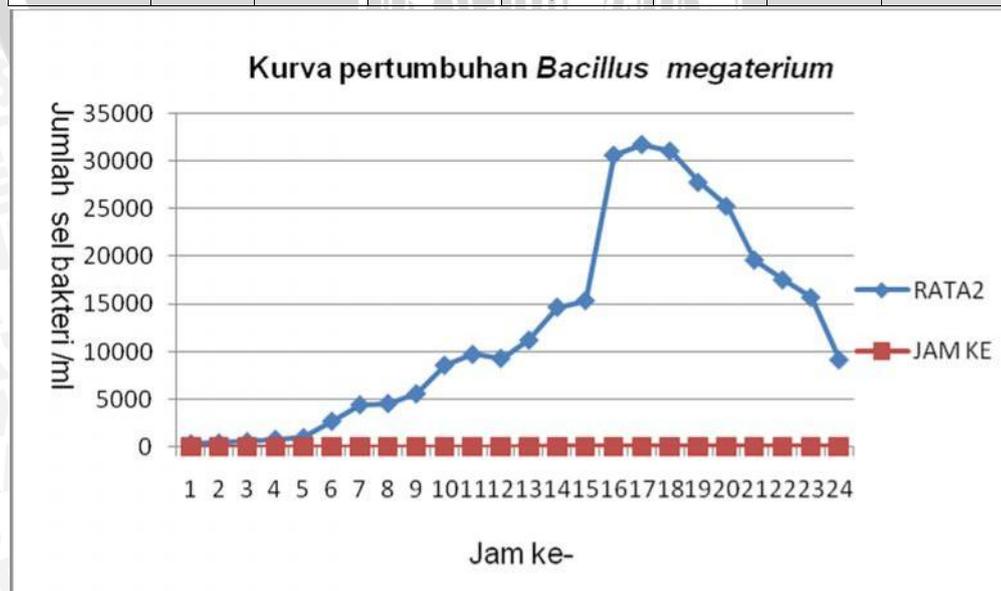
- Pelczar, M.J dan Chan, E.C.S. 2009. **Dasar-dasar Mikrobiologi 2**. Penerjemah Hadioetomo, R.S; Imas, T;Tjotrosomo, S.S; Angka, S.L. Penerbit Universitas Indonesia (UI Press). Jakarta.
- Perkin; Elmer. 1981. **Operator's Manual Luminescence Spectrometer LS-5**. Beaconsfield, Bucking-hamshire. England.
- Putera, D. 2010. **Perbedaan *In Vivi*, *In Vitro* dan *Ex Vivo***. <http://farmasiblogku.blogspot.com>. Diakses tanggal 17 desember 2011 pukul 21.15 WIB.
- Risna , A., M. Mahendradatta dan J. Langkong. 2003. **Studi Perubahan Mutu Pada Burger Ikan Cakalang (*Katsuwonus pelamis I*) Selama Penyimpanan Dingin**.Teknologi Hasil Pertanian Universitas Hasanuddin. Makasar.
- Rispayeni. 2005. **Bakteri Pembetuk Histamin pada Peda Kembang Perempuan (*Rastrelliger neglectus*) Selama proses pengolahan**. Skripsi Sarjana Sains. Fakultas Biologi, Universitas nasional, Jakarta. 55 pp.
- 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.
- Rodwell, V. W; Robert, K. M; Peter, A. M; dan Daryl, K. G. 2003. **Biokimia Harper**. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hal 333.
- Sander,J.E. 1996. **Development of Biogenic Amine During Fermentation of Poultr Carcasses**. Depamnent of Avian Medicine, College of Veterinay Medicine, The University of Georgia, Athens, GA 30602-4875.
- Sijabat, Lanceria. 2009. **Pengaruh Pemberian Ekstrak Sponge *Haliclona sp* terhadap Aktivitas Proliferasi Sel dengan Metode Hitung AgNOR pada Sel *Adenocarcinoma Mammae* Mencit C3H**. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang.
- Sims, G. G; G. Farn and R. K. York. 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 Survai**. Edisi Revisi. LP3ES. Jakarta.
- SNI. 2009.**Penentuan Kadar Histamin dengan Spektroflorometri dan Kromatografi Kinerja Tinggi (KCKT) pada Produk Perikanan**. Standar Nasional Indonesia Nomor 2354.10:2009. Jakarta

- Taylor, S. L dan Behling, A. R. **Bacterial Histamine Production as a Function of Temperature and Time of Incubation**. Journal of Food Science, Volume 4.
- Waluyo, L. 2004. **Mikrobiologi Umum**. Penerbit Universitas Muhamadiyah. Malang.
- 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/indahwidiastuty_ipbbab2.pdf. Diakses pada tanggal 07 Juli 2010. Pukul 07.15 WIB.
- Widiastuty, I. 2004. Histidin Dekarboksilase. 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^a. **Histidin**. <http://id.wikipedia.org/wiki/Histidin>. Diakses pada tanggal 23 Oktober 2011 pukul 07.53 WIB.
- _____. 2011^b. **Bacillus sp**. http://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_megaterium. Diakses pada tanggal 24 Oktober 2011 pukul 05.30 WIB.
- Zipcodezoo. 2011^a. **Bacillus megaterium**. http://www.zipcodezoo.com/Bacteria/B/Bacillus_megaterium/. Diakses pada tanggal 10 Desember 2011 pukul 14.23 WIB
- _____. 2011^b. **Enterobacter gergoviae**. http://www.zipcodezoo.com/Bacteria/E/Enterobacter_gergoviae/. Diakses pada tanggal 10 Desember 2011 pukul 14.23 WIB
- _____. 2011^c. **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*

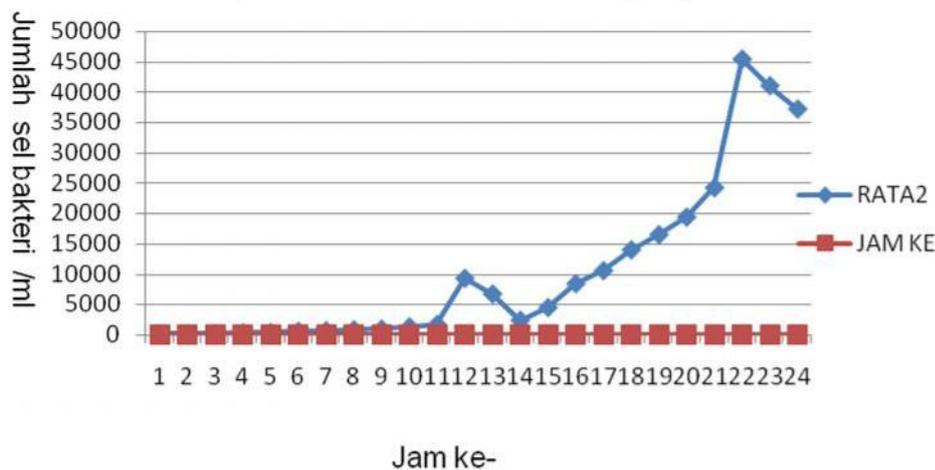
JAM KE	X1	X2	RATA2	Σ Sel / ml	X1	X2	RATA2
1	385	396	390.5	$3,9 \cdot 10^6$	385	396	390.5
2	469	482	475.5	$4,8 \cdot 10^6$	469	482	475.5
3	599	616	607.5	$6,1 \cdot 10^6$	599	616	607.5
4	798	899	848.5	$8,5 \cdot 10^6$	798	899	848.5
5	1040	1037	1038.5	$1,0 \cdot 10^7$	1040	1037	1038.5
6	2640	2850	2745	$2,7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



- *Enterobacter* sp

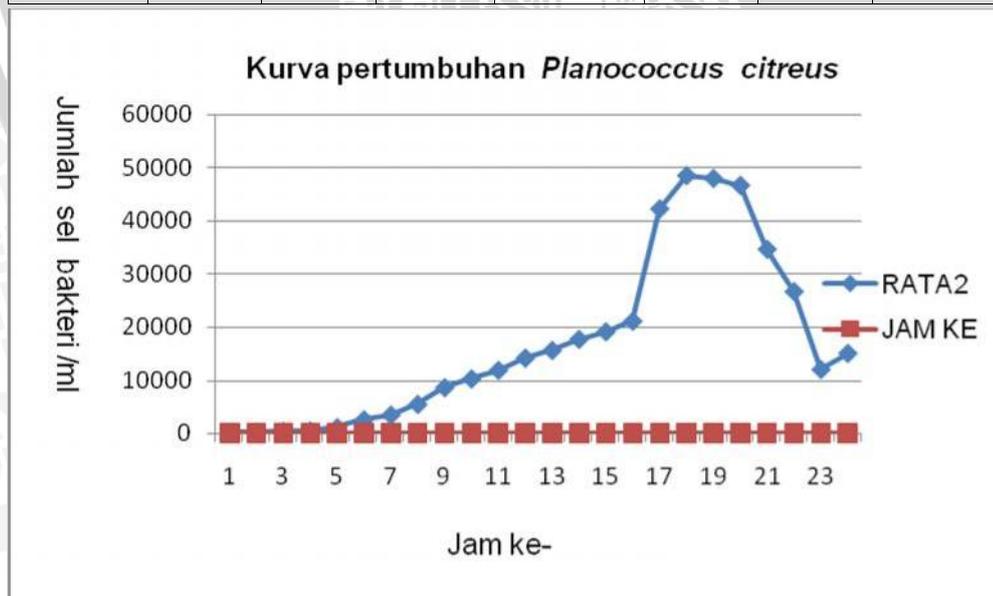
JAM KE	X1	X2	RATA2	Σ Sel / ml	X1	X2	RATA2
1	138	293	215.5	$3,9 \cdot 10^6$	138	293	215.5
2	246	248	247	$4,8 \cdot 10^6$	246	248	247
3	298	215	256.5	$6,1 \cdot 10^6$	298	215	256.5
4	379	358	368.5	$8,5 \cdot 10^6$	379	358	368.5
5	304	537	420.5	$1,0 \cdot 10^7$	304	537	420.5
6	645	618	631.5	$2,7 \cdot 10^7$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

Kurva pertumbuhan *Enterobacter gergoviae*



- *Planococcus* sp

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



Lampiran 2. Gambar Proses Pembuatan Larutan Histidin

1



2



3



4



5

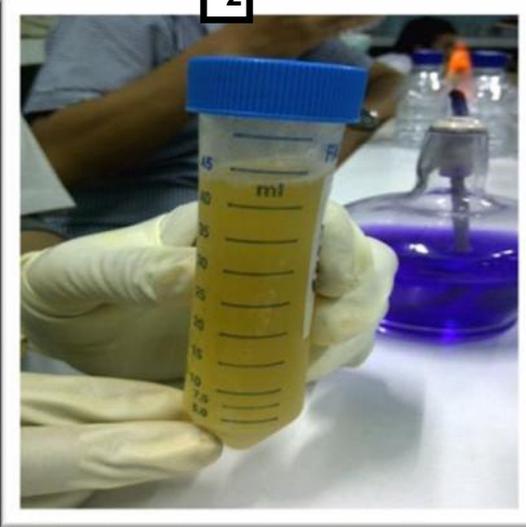


Lampiran 3. Gambar Proses Penambahan Metabolit Bakteri

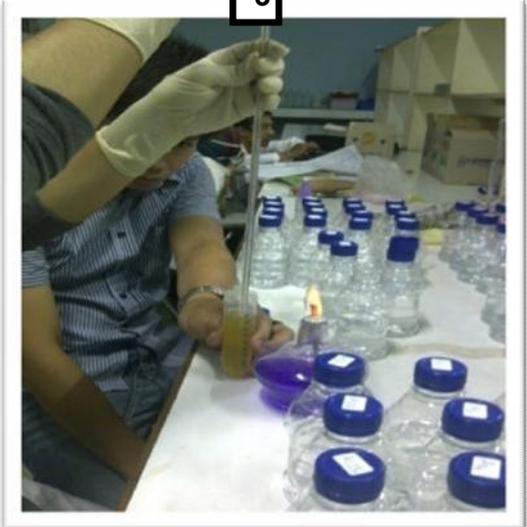
1



2



3



Lampiran 4. Gambar proses aerasi



Lampiran 5. Hasil uji histamin dari histidin murni

FROM : LPPMHP BUI

NO. : 0333417815

Dec. 19 2011 10:25PM P1

REPORT OF HISTAMINE DETERMINATION (SNI 2354.10-2009)

Prepared By Chemistry Laboratory

to : P.Hadi

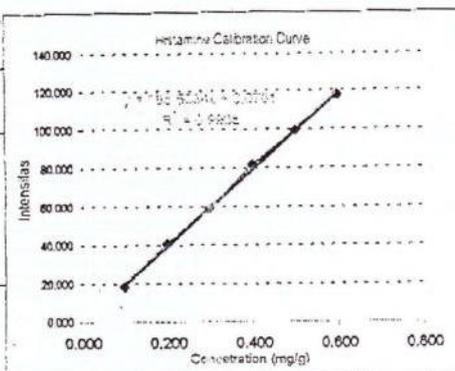
Quantitation results file:C:\FLWINLAB\DATA\Uji Histamine.rpt
Generated on :17-12-2011 at time:14:51:19

Measurement conditions
Method: C:\FLWINLAB\METHODS\CONC.MTH
Comments: Default concentration method

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

Reference sample results

Std#	Conc (mg/kg)	Factor	Intens.	BG	Factor
STD 1	0.100		16.534	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		61.843	2.62	1
STD 5	0.500		99.197	2.62	1
STD 6	0.600		117.888	2.62	1



Fit equation:

$$Y = 199.5034 X + 0.0781$$

$$a = 0.0781 \quad b = 199.5034$$

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

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)	3.298	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	10.0850	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	0.2818	Accepted
26	B12(4)	1.052	10.0885	2.4316	Accepted
27	B12(3)	1.380	10.0667	3.2576	Accepted
28	B2(4)	2.521	10.1051	4.2176	Accepted

REPORT OF HISTAMINE DETERMINATION (SNI 2354.10-2009)

Prepared By Chemistry Laboratory

to: P. Hadi

29	B1 (3)	13.495	10.0730	33.5502	Accepted
30	P2 (2)	0.088	10.0918	0.0247	Accepted
31	P2 (1)	2.530	10.0634	6.1371	Accepted
32	P3 (1)	2.081	10.0348	3.1413	Accepted
33	P123 (1)	0.370	10.0808	0.7294	Accepted
34	P23 (1)	0.678	10.0907	1.4975	Accepted
35	P1 (2)	2.972	10.0517	5.3716	Accepted
36	P13 (1)	1.500	10.0257	3.5724	Accepted
37	P123 (2)	2.116	10.0596	5.1027	Accepted
38	P1 (1)	0.492	10.0486	1.0375	Accepted
39	P23 (4)	1.516	10.0910	3.5892	Accepted
40	P1 (4)	2.558	10.0693	6.2035	Accepted
41	P123 (4)	0.521	10.0729	1.1075	Accepted
42	P3 (2)	1.117	10.0902	2.5934	Accepted
43	P12 (2)	1.747	10.0749	4.1725	Accepted
44	p12 (1)	1.905	10.0741	4.5678	Accepted
45	P1 (3)	2.255	10.0663	5.4472	Accepted
46	P13 (2)	1.878	10.0400	4.5156	Accepted
47	P3 (4)	10.749	10.0592	26.7202	Accepted
48	P23 (3)	0.266	10.0564	0.4706	Accepted
49	P3 (3)	1.391	10.0375	3.2946	Accepted
50	P23 (2)	0.331	10.0718	0.7825	Accepted
51	P12 (4)	1.971	10.0896	2.8493	Accepted
52	P12 (3)	2.262	10.0605	5.4678	Accepted
53	P13 (3)	0.341	10.0825	0.6568	Accepted
54	P123 (3)	2.394	10.0353	3.9278	Accepted
55	P13 (4)	0.769	10.0559	1.7306	Accepted
56	P2 (4)	1.023	10.0428	2.3699	Accepted
57	P2 (3)	2.996	10.0547	7.3098	Accepted
58	Q2 (2)	3.256	10.0612	7.9560	Accepted
59	Q1 (2)	3.290	10.0896	6.1463	Accepted
60	Q1 (1)	1.009	10.0824	2.3256	Accepted
61	Q12 (4)	1.412	10.0861	3.3312	Accepted
62	Q2 (3)	0.360	10.0778	0.7046	Accepted
63	Q12 (1)	0.749	10.0329	1.6844	Accepted
64	Q2 (1)	0.747	10.0683	1.6734	Accepted
65	Q1 (3)	0.783	10.0507	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 : lppmhobanyuwangi@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 : Spektroflorometri 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



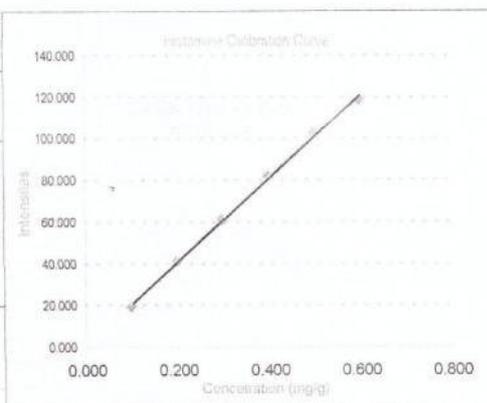
Quantitation results file:C:\FLWINLAB\DATA\Uji Histamine.rpt
Generated on :07-02-2012 at time:13:11:39

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

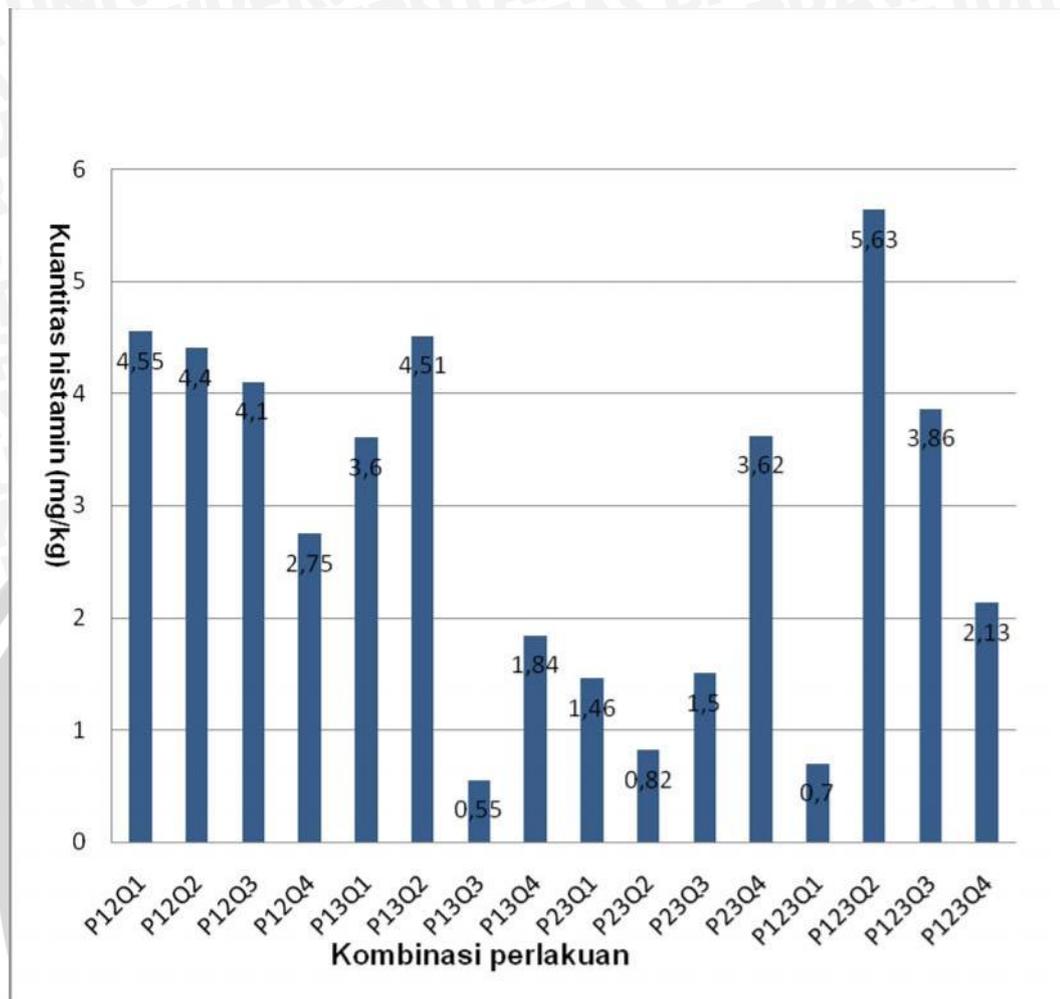
X (mg/kg) = ((Y - a) x 5000) / (wxb)

Test Number	Test Code	Intensity	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 6. Grafik Kadar Histamin



Keterangan :

- P1 = Metabolit bakteri *Bacillus* sp
- P2 = Metabolit bakteri *Enterobacter* sp
- P3 = Metabolit bakteri *Planococcus* sp
- Q1 = Aerasi selama 6 jam
- Q2 = Aerasi selama 12 jam
- Q3 = Aerasi selama 18 jam
- Q4 = Aerasi selama 24 jam

Lampiran 7. Rancangan Percobaan Kadar Histamin Dari Histidin Murni

PERLAKUAN	ULANGAN			JUMLAH	RERATA
	1	2	3		
P12Q1	4,57	4,54	4,54	13,65	4,55
P12Q2	4,17	4,50	4,50	13,17	4,39
P12Q3	5,47	3,40	3,40	12,27	4,09
P12Q4	2,85	2,70	2,70	8,25	2,75
P13Q1	3,57	3,60	3,60	10,77	3,59
P13Q2	4,52	4,50	4,50	13,52	4,51
P13Q3	0,66	0,50	0,50	1,66	0,55
P13Q4	1,73	1,90	1,90	5,53	1,84
P23Q1	1,50	1,44	1,44	4,38	1,46
P23Q2	0,78	0,84	0,84	2,46	0,82
P23Q3	0,47	0,50	0,50	1,47	0,49
P23Q4	3,59	3,64	3,64	10,87	3,62
P123Q1	0,73	0,68	0,68	2,09	0,70
P123Q2	5,10	5,89	5,89	16,88	5,62
P123Q3	3,93	3,82	3,82	11,57	3,85
P123Q4	1,11	2,64	2,64	6,39	2,13
TOTAL	44,75	45,09	45,09	134,93	

Tabel dua arah

Perlakuan	Lama waktu aerasi				Jumlah	Rerata
	Q1	Q2	Q3	Q4		
Penambahan bakteri						
P12	13,65	13,17	12,27	8,25	47,34	3,94
P13	10,77	13,52	1,66	5,53	31,48	2,62
P23	4,38	2,46	1,47	10,87	19,18	1,6
P123	2,09	16,88	11,57	6,39	36,93	3,1
Jumlah	30,89	46,03	26,97	31,04	134,93	
Rerata	2,6	3,83	2,25	2,6		

Tabel sidik ragam

Sumber Keragaman (SK)	Derajat Bebas (db)	Jumlah Kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	F hit.	Ket.	F tabel	
						5%	1%
Ulangan	2	0,00482	0,00241	0,00018	ns	3,32	5,39
Perlakuan	15	127,40	8,493	0,66310	signf	2,01	2,70
Galat	30	384,26	12,808				
Total	47	511,66					

Tabel uji BNT Pengaruh penambahan bakteri (P)

Rerata (P)		P23	P13	P123	P12	Notasi	BNT 5%
		1,60	2,62	3,07	3,94		
P23	1,60	-				a	5,96
P13	2,62	1,02	-			ab	
P123	3,07	1,47	0,45	-		abc	
P12	3,94	2,34	1,32	0,87	-	abcd	

Tabel uji BNT Pengaruh lama aerasi (Q)

Rerata (Q)		Q3	Q1	Q4	Q2	Notasi	BNT 5%
		2,25	2,57	2,58	3,83		
Q3	2,25	-				a	5,96
Q1	2,57	0,32	-			ab	
Q4	2,58	0,33	0,01	-		abc	
Q2	3,83	1,58	1,26	1,25	-	abcd	