

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1. Alat dan Bahan

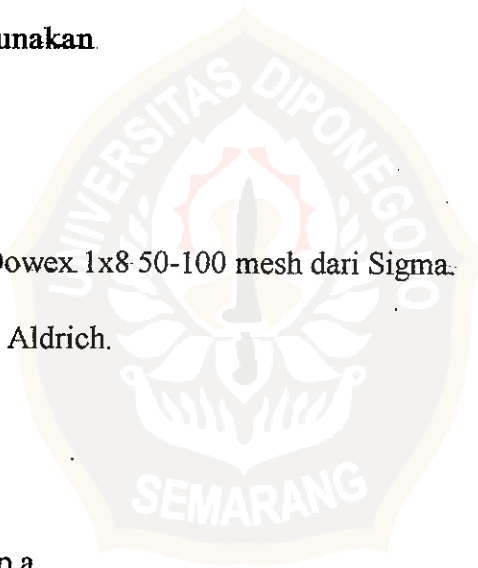
##### 3.1.1. Peralatan yang digunakan

1. Penggojok listrik Vortex-2 merk Genic.
2. Kolom kromatografi 200x7 mm merk Bistabil.
3. Waterbath merk Memmert.
4. Blender-jar merk Ultra Turrax T-25.
5. Stomacher Lab - blender 400.
6. Hot plate stirer merk Magne-4.
7. Timbangan listrik Mettler AE-200.
8. Refrigerator merk Decby S.
9. Refrigerator (4<sup>0</sup>C) merk Super Jet Cool.
10. Luminesensi spektrometer 30 merk Perkin Elmer.
11. Autoklaf merk ALP
12. Inkubator (35<sup>0</sup>C) merk Precision.
13. Oven merk Memmert-854.
14. Coloni counter merk Quebec.
15. Laminar airflow merk Lab Conco.
16. Pengasap elektrik merk Afos.
17. Alat-alat gelas untuk analisa.

18. Kertas saring.
19. Gunting.
20. Pinset.
21. Plastik steril.
22. Botol semprot.
23. Spiritus.
24. Spatula.
25. Termometer.

### **3.1.2. Bahan yang digunakan**

1. Ikan tongkol.
2. Metanol p.a.
3. Resin penukar ion Dowex 1x8 50-100 mesh dari Sigma.
4. Ortoptalaldehid dari Aldrich.
5. Asam fosfat p.a.
6. Asam klorida p.a.
7. Natrium hidroksida p.a.
8. Histamin dihidroklorida dari Merck.
9. Alkohol 70 %
10. Tripton dari Difco.
11. Yeast ekstrak dari Difco.
12. Natrium klorida dari Merck.
13. Bacto agar dari Difco.



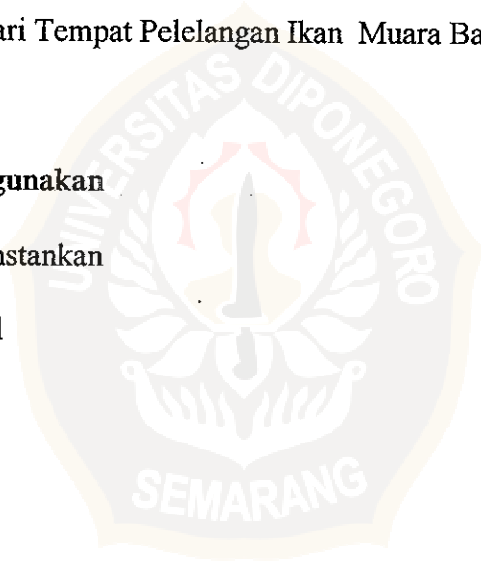
14. Bromcresol purple dari Merck.
15. Bacto pepton dari Difco.
16. L-histidin dihidroklorida dari Merck.
17. Aquades.
18. Serabut kelapa.
19. Batok kelapa.
20. Es.

### 3.2. Sumber sampel

Ikan tongkol diambil dari Tempat Pelelangan Ikan Muara Baru Jakarta.

### 3.3. Variabel yang digunakan

- a. Variabel yang dikonstankan
  - berat ikan tongkol
  - jenis ikan tongkol
  - suhu pengasapan
- b. Variabel berubah
  - waktu pengasapan
- c. Variabel yang diukur
  - konsentrasi histamin
  - jumlah bakteri pembentuk histamin



### 3.4. Cara Kerja <sup>(3,6,7)</sup>

#### 3.4.1. Persiapan sampel

Ikan tongkol segar dalam bentuk utuh dicuci dengan air tawar bersih. Dalam wadah plastik diletakkan ikan tongkol tersebut, dan disusun es, ikan, es. Kemudian wadah plastik yang berisi es dan ikan tongkol diberi sedikit garam dan dimasukkan dalam refrigerator. Pada saat akan diasap, ikan tongkol dicuci, dihilangkan bagian isi perut dan kepala. Setelah itu dagingnya dipotong menjadi 2 bagian.

#### 3.4.2. Proses Pengasapan

Dimasukkan serabut dan batok kelapa kedalam mesin pengasap dengan perbandingan 1 : 1. Setelah itu dinyalakan api, dan dibiarkan asap menyebar ke dalam lemari pengasap. Setelah suhunya konstan  $\pm 60^{\circ}\text{C}$ , dimasukkan ikan tongkol ke dalam tempat pengasapan dan ditaruh pada rak-rak pengasapan yang telah disiapkan.

#### 3.4.3. Preparasi larutan

##### a. NaOH 1 N

Sebanyak 4 g natrium hidroksida dilarutkan dengan aquades menjadi 100 mL larutan.

##### b. HCl 0,1 N

Sebanyak 8 mL asam klorida 12,5 N dilarutkan dengan aquades menjadi 1000 mL larutan.

**c.  $H_3PO_4$  3,57 N**

Sebanyak 238 mL asam fosfat 15 N dilarutkan dengan aquades menjadi 1000 mL larutan.

**d. Ortoptalaldehid (OPT) 0,1 %**

Sebanyak 0,1 g OPT dilarutkan dengan metanol menjadi 100 mL larutan.

**e. Histamin standar**

a. Larutan histamin standar 1 ppm.

Diambil 1 mL larutan histamin standar ( histamin dihidroklorida ) 1000 ppm, dimasukkan dalam labu takar 1000 mL dan ditambahkan dengan larutan HCl 0,1 N sampai batas volume.

b. Larutan histamin standar 0,04 ppm; 0,08 ppm; 0,16 ppm dan 0,32 ppm.

Diambil 1, 2, 4, dan 8 mL larutan 1 ppm ke dalam labu takar 25 mL dan ditambahkan dengan larutan HCl 0,1 N sampai batas volume.

**f. Pepton 0,1 %**

Untuk setiap 100 mL larutan, dilarutkan 0,1 g bacto pepton dengan 100 mL aquades dalam erlenmeyer 250 mL. Larutan dicampur menggunakan magnetic stirrer, tutup erlenmeyer dengan kapas dan kertas sampul, ikat dengan karet. Sedangkan untuk membuat larutan pengencer (untuk mengencerkan sampel), diambil 9 mL larutan pepton 0,1 % dan dimasukkan ke dalam botol-botol pengenceran, ditutup kencang. Larutan disterilisasi pada suhu  $121^{\circ}C$  selama 15 menit, dinginkan pada suhu kamar dan ditaruh dalam refrigerator.

#### **3.4.4. Preparasi Resin Penukar Ion**

Ditimbang 3 g resin untuk setiap kolom menggunakan beker gelas, ditambahkan 15 mL NaOH 2 N / 1 g resin, diaduk dengan stirer selama 30 menit, dicuci dengan aquades sebanyak 3 kali, sehingga didapatkan resin terlarut dalam aquades.

#### **3.4.5. Penentuan Panjang Gelombang Optimum Eksitasi dan Emisi Larutan Standar Histamin**

##### **a. Penentuan Panjang Gelombang Optimum Emisi**

Larutan standar histamin dihidroklorida ( 0,08 ppm ) diukur fluoresensinya pada panjang gelombang emisi 420-460 nm dan panjang gelombang eksitasi 350 nm, hingga diperoleh panjang gelombang optimum dengan fluoresensi terbesar.

##### **b. Penentuan Panjang Gelombang Optimum Eksitasi**

Larutan standar histamin dihidroklorida ( 0,08 ppm ) diukur fluoresensinya pada panjang gelombang eksitasi 300-400 nm dan panjang gelombang emisi 444 nm, hingga diperoleh panjang gelombang optimum dengan fluoresensi terbesar.

#### **3.4.6. Penentuan Kurva Standar Histamin**

Larutan standar histamin dengan konsentrasi bervariasi diukur fluoresensinya pada panjang gelombang optimum, kemudian dibuat kurva standar dan persamaan garis kurvanya.

### 3.4.7. Preparasi Sampel Ikan Tongkol

Sebanyak 10 g sampel ikan yang telah diasapi ditambah dengan 50 mL metanol di dalam beker gelas, diblender sampai homogen, beker ditutup plastik, dimasukkan dalam waterbath pada 60<sup>0</sup>C selama 15 menit, didinginkan pada suhu kamar. Setelah dingin, dilarutkan dengan 50 mL metanol, disaring dan diambil filtratnya.

### 3.4.8. Pemisahan Histamin dengan Kromatografi Penukar Ion

Dimasukkan glasswool ke dalam kolom kromatografi setinggi  $\pm 1,5$  cm. Kemudian dimasukkan resin ke dalam kolom setinggi  $\pm 8$  cm, dipertahankan volume air yang berada di atas resin  $\pm 1$  cm. Diletakkan labu takar 50 mL yang berisi 5 mL HCl 1 N di bawah kolom untuk menampung eluet. Selanjutnya diambil 1 mL filtrat sampel, dimasukkan dalam kolom, kran kolom dibuka dan dibiarkan eluet menetes ( 9-10 tetesan/menit ). Setelah tinggi cairan  $\pm 1$  cm diatas resin, ditambahkan aquades dan dibiarkan cairan berelusi. Eluet yang dihasilkan ditaruh dalam refrigerator.

### 3.4.9. Penentuan Histamin dalam Ikan Tongkol

Disiapkan tabung reaksi duplo, ditambahkan berturut-turut: 10 mL HCl 0,1 N; 5 mL sampel, kocok; 3 mL NaOH 1N, kocok; 2 mL ortoptalaldehid 0,1 %, kocok; 3 mL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 3,57 N, kocok. Kemudian sampel diukur serapannya pada panjang gelombang eksitasi dan emisi optimum.

#### 3.4.10. Pembuatan Niven Agar Cair

Untuk setiap 100 mL larutan, dilarutkan 0,5 g tripton; 0,5 g yeast ekstrak; 2 g L-histidin dihidroklorida; 0,5 g natrium klorida; 1,5 g agar, 0,006 g bromcresol purple dengan 100 mL aquades dalam erlenmeyer 250 mL. Kemudian dicampur dan dipanaskan larutan diatas hot plate stirer sampai mendidih. Setelah mendidih, diangkat dan dinginkan agar cair pada suhu kamar. Setelah dingin, diatur pH larutan menjadi 6 dengan menambahkan NaOH 0,1 N atau HCl 0,1 N. Tutup erlenmeyer dengan kapas dan kertas sampul, diikat dengan karet, kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Setelah disterilisasi, dinginkan pada suhu kamar dan ditaruh dalam refrigerator.

#### 3.4.11. Ekstraksi Sampel

Ditimbang 10 g ikan secara aseptis, yaitu pinset dan gunting yang digunakan untuk memotong ikan terlebih dahulu dicelupkan pada alkohol 70 % lalu dipijarkan dalam nyala spiritus. Ikan yang telah ditimbang ditaruh dalam plastik steril. Ditambahkan 90 mL larutan pepton 0,1 % ke dalam plastik steril yang telah berisi sampel ikan secara aseptis, yaitu sebelumnya botol erlenmeyer dan gelas ukur dipanaskan ke api spiritus dan diatas plastik steril didekatkan ke api spiritus. Kemudian diblender ± 2-3 menit sampai campuran homogen, dan diperoleh sampel dengan tingkat pengenceran 10<sup>-1</sup>. Kemudian 1 mL suspensi dimasukkan dalam botol pengenceran berisi 9 mL larutan pepton 0,1 %, dikocok dan diperoleh pengenceran 10<sup>-2</sup>, dan untuk memperoleh pengenceran 10<sup>-3</sup>, diambil 1 mL larutan pengencer 10<sup>-2</sup> dan dimasukkan ke dalam botol pengenceran berisi 9 mL larutan pepton 0,1 %, dikocok.



### 3.4.12. Pembuatan Niven Media

Inokulasi dilakukan dengan cara memindahkan 1 mL larutan hasil setiap pengenceran ke dalam cawan petri, lalu Niven agar cair dituang keatasnya, dikocok dengan arah membentuk angka delapan, lalu dituangkan kembali Niven agar cair diatasnya. Semua dilakukan secara aseptis, yaitu tutup erlenmeyer berisi Niven agar cair dan tutup botol pengenceran sebelum dituang ke dalam cawan petri dipanaskan ke api spiritus dan pekerjaan dilakukan pada laminar airflow. Cawan petri yang berisi Niven media diinkubasi selama 72 jam pada 35<sup>0</sup>C. Dihitung koloni berwarna ungu dengan latar belakang kuning.

