

BAB IV

PROSEDUR PENELITIAN

4.1. Alur Penelitian

Penelitian dimulai dengan tahapan pengambilan sampel. Sampel diambil dari ikan tongkol segar yang baru tiba sebanyak 10 gram per bagian tubuh yang akan diuji, yakni bagian tubuh depan, perut, dan ekor ikan tongkol. Sampel dimasukkan ke dalam *cool box* yang telah diisi es. Setelah sampel tersimpan baik di dalam *cool box*, sampel ikan tuna kemudian dibawa menuju ruang laboratorium organoleptik Balai Pengujian Mutu dan Pengolahan Hasil Perikanan dan Kelautan DKI Jakarta (BPMPHPK DKI Jakarta)

Preparasi sampel dilakukan pada ikan tongkol dan terbagi ke dalam beberapa kelompok sampel. Pertama adalah sampel 0 jam yang tidak mendapatkan perlakuan penyimpanan, diuji pada hari yang sama. Lalu selanjutnya perlakuan waktu penyimpanan selama 1 jam, 3 jam, 4 jam, 5 jam, 6 jam, 7 jam dan untuk terakhir sampel dengan perlakuan waktu penyimpanan selama 24 jam setelah ikan mati. Setelah dipreparasi, sampel pertama segera diuji analisis kadar histamin dan dilanjutkan pada sampel ikan selanjutnya yang diuji dengan perlakuan waktu penyimpanan yang berbeda-beda.

4.2. Analisis kadar histamin (SNI 2354.10: 2009)

Prinsip penentuan kadar histamin adalah zat histamin dalam sampel dikonversikan ke dalam bentuk $-OH$, kemudian diisolasi dengan resin penukar

ion dan diubah ke bentuk derivatnya dengan *orto-ptalatdikarboksilaldehid* (OPT) dan diukur secara fluorometris pada panjang gelombang 350 nm dan emisi 444 nm.

4.2.1 Pembuatan larutan standar histamin

a. Larutan stok 1mg/mL (1000 ppm)

Ditimbang sebanyak 169,1 mg histamin 2 HCl, larutkan dan tempatkan HCl 0,1 N dalam labu takar 100 mL sampai batas volume.

Larutan ini disiapkan dalam kondisi segar.

b. Larutan stok 10 µg/mL (10 ppm)

Pipet 1 mL larutan stok (1000 ppm) masukan kedalam labu takar 100 mL dan tambahkan larutan HCl 0,1N sampai batas volume. Larutan ini disiapkan dalam kondisi segar.

c. Larutan kerja

Buat larutan kerja 0,0025 mg/L; 0,005 mg/L; 0,0100 mg/L; 0,0200 mg/L; 0,0400 mg/L. Larutan kerja ini disiapkan setiap akan digunakan.

4.2.2 Tahap ekstraksi

Sampel ditimbang sebanyak 10 gram lalu ditambahkan dengan metanol sebanyak 50 mL kemudian dihomogenkan dengan *homogenizer* (blender) kurang lebih selama 1-2 menit. Sampel yang sudah dipanaskan dalam *water bath* pada suhu 60 °C selama 15 menit, kemudian didinginkan pada suhu ruang. Sampel tersebut dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian ditambahkan metanol sampai tanda tera lalu dikocok agar homogen. Setelah itu, larutan sampel disaring

menggunakan kertas saring dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Filtrat dari hasil penyaringan akan digunakan pada proses kromatografi penukar ion.

4.2.3 Tahap kromatografi penukar ion

Kolom kromatografi (panjang 20 cm dan diameter 7 mm) kemudian ke dalam kolom tersebut dimasukkan *glass wool* secukupnya (tingginya 1 cm). Selanjutnya resin penukar ion (*dowex 1-x8 50-100-mesh*) dimasukkan ke dalam kolom sampai tingginya kurang lebih 8 cm (diusahakan resin tidak sampai kering dengan cara dibilas dengan akuades karena akan mempengaruhi daya kerja penukar ion tersebut). Selanjutnya sampel filtrat hasil penyaringan pada tahap ekstraksi dilewatkan ke dalam kolom dan ditampung hasilnya dalam labu ukur yang telah diberi 5 mL HCl 1 N. Lakukan seterusnya hingga hasil elusi dalam labu takar tepat 50 mL. Hasil elusi sampel dapat disimpan dikulkas.

4.2.4 Tahap derivatisasi

Siapkan 3 tabung reaksi 50 mL masing-masing untuk sampel hasil kromatografi penukar ion, standar dan HCl 0,1 N. Pipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 mL sampel hasil tahap kromatografi penukar ion, 5 mL standar histamin (sebagai larutan standar), dan 5 mL HCl 0,1 N. Setelah itu, pada masing-masing tabung reaksi ditambahkan 10 mL HCl 0,1 N (dihomogenkan), 3 mL NaOH 1 N ke dalam tabung reaksi lalu dihomogenkan dan dibiarkan selama 5 menit. Kemudian ditambahkan lagi *orto-ptalatdikarboksilaldehid* (OPT) 1% sebanyak 1 mL lalu dihomogenkan dan didiamkan selama 4 menit. Selanjutnya ditambahkan 3 mL H₃PO₄ 3,57 N dan dihomogenkan.

Setelah selesai, sampel yang telah melalui tahap pembentukan siap untuk dibaca menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang eksitasi 350 nm dan panjang gelombang emisi 444 nm. Rumus perhitungan kadar histamin (ppm) adalah sebagai berikut :

$$\text{Histamin}(\mu\text{g/g}) = X \times \frac{\text{volume akhir}}{\text{Bobot sampel}} \times F_p$$

$$Y = a + bx$$

Keterangan :

X = Nilai dari perhitungan regresi

F_p = Faktor pengencer

4.3. Kinerja Analitik

Parameter analisis yang ditentukan dalam kinerja analitik ini meliputi linieritas, akurasi, presisi, limit deteksi dan limit kuantifikasi. Linearitas dinyatakan dengan membuat persamaan garis lurus (*regresi linear*) $y = bx + a$, akurasi dengan % perolehan kembali, presisi dinyatakan dengan simpangan baku, limit deteksi dan kuantitasi dinyatakan dengan rumus S_y/x .

4.3.1. Linieritas

Penentuan linieritas dilakukan dengan cara membuat larutan dengan konsentrasi 0,0025 mg/L; 0,005 mg/L; 0,0100 mg/L; 0,0200 mg/L; 0,0400 mg/L. Selanjutnya diukur dengan menggunakan spektrofotometer, yang menghasilkan absorbansi dan dibuat persamaan garis lurus (*regresi linier*) $y = bx + a$. Dimana a menyatakan perpotongan dengan sumbu x dengan sumbu y dan b menyatakan kemiringan dari larutan yang telah dibuat dari berbagai konsentrasi yang telah terukur. Linieritas kurva kalibrasi dilihat dari koefisien korelasi (r) dengan rumus dan koefisien variansi.

4.3.2. Penentuan Akurasi

Penentuan akurasi (kecermatan) dilakukan menggunakan 3 konsentrasi yaitu 0,0025 mg/L; 0,01 mg/L; 0,04 mg/L. Masing-masing konsentrasi dilakukan tiga kali pengukuran.

4.3.3. Penentuan Presisi

Penentuan presisi (keseksamaan) dilakukan menggunakan larutan konsentrasi 0,040 mg/L dilakukan sebanyak enam kali pengukuran. Ketelitian diukur dengan menghitung presentase relatif standar deviasi (%RSD) $\leq 2,0\%$.

4.3.4. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) dihitung dari rerata kemiringan garis dan standar deviasi kurva standar yang diperoleh dari persamaan $y = bx+a$, nilai pengukuran akan sama dengan nilai b. LOD ditentukan dari hasil bagi antara 3 simpangan baku standar deviasi dengan kemiringan garis kurva standar. Sedangkan LOQ ditentukan dari hasil bagi antara 10 simpangan baku standar deviasi dengan kemiringan garis kurva standar.