

BAB I

TINJAUAN PUSTAKA

1.1. Ikan

Ikan dan kerang merupakan sumber protein yang utama bagi penduduk yang tinggal di daerah-daerah sepanjang pantai. Ikan air tawar dan ikan air asin menjadi sumber pangan manusia yang utama maupun sebagai pilihan. Pada zaman kekaisaran Romawi, ikan yang hidup dibawa dalam tangki di atas kereta dari telaga dan danau ke Roma. Disana ikan dipertahankan tetap hidup sampai siap di makan (Dessrosier, 1988).

Ikan dapat dikelompokkan menjadi dua kategori yaitu ikan bertulang belakang atau bersirip (*finfish*) yang biasanya disebut dengan istilah ikan, dan yang tidak bertulang belakang yang sering disebut sebagai kerang atau kerang-kerangan. Kategori yang pertama (ikan) badannya ditutupi oleh sisik, sedangkan kerang badannya dibungkus kulit keras yang terdiri atas *chitin* (Winarno, 1993).

Berdasarkan kandungan lemaknya, ikan dapat digolongkan menjadi 3 golongan yaitu: ikan dengan kandungan lemak rendah (kurang dari 2%), ikan berlemak medium (2-5%), dan ikan berlemak tinggi dengan kandungan lemak antara 6-20% (Winarno, 1993).

1.1.1. Deskripsi dan klasifikasi ikan tongkol (*Euthynnus affinis*)

Ikan tongkol (*Euthynnus affinis*) termasuk dalam famili *scombridae* terdapat di seluruh perairan hangat Indo-Pasifik Barat, termasuk laut kepulauan dan laut nusantara.

Klasifikasi ikan tongkol menurut Saanin (1986), adalah sebagai berikut:

Phylum : Animalia
Sub Phylum : Chordata
Kelas : Pisces
Sub Kelas : Teleostei
Ordo : Perchomorphi
Sub Ordo : Scombrina
Famili : Scombridae
Genus : Euthynnus
Spesies : *Euthynnus affinis*

Ciri-ciri ikan tongkol (*Euthynnus affinis*), badan berukuran sedang, memanjang seperti torpedo, mempunyai dua sirip punggung yang dipisahkan oleh celah sempit, sirip punggung pertama diikuti oleh celah sempit, sirip punggung kedua diikuti oleh 8-10 sirip tambahan, tidak memiliki gelembung renang, warna tubuh pada bagian punggung gelap kebiruan dan terdapat tanda garis-garis miring terpecah dan tersusun rapi. Ikan tongkol memiliki sifat cenderung membentuk kelompok multi spesies berdasarkan ukuran. Satu kelompok umumnya terdiri dari 100-5000 individu. Habitat ikan ini berada di perairan epipelagik, merupakan spesies neuritik yang mendiami perairan dengan kisaran suhu antara 18-29 °C. Bentuk ikan tongkol dapat dilihat pada **Gambar I.1.** (Collete 1983: 137).



Gambar I.1. Ikan tongkol (*Euthynnus affinis*)

Ikan tongkol (*Euthynnus affinis*) merupakan predator yang rakus memakan berbagai ikan kecil, udang, dan cephalopoda, sebaliknya juga merupakan mangsa dari hiu dan marlin. Panjang baku maksimum 100 cm dengan berat 13,6 kg, umumnya 60 cm, di Samudera Hindia usia 3 tahun panjang bakunya mencapai 50-65 cm secara biologi ikan tongkol merupakan salah satu jenis ikan tuna (Collete, 1983:137).

1.1.2 Komposisi ikan tongkol

Menurut Saanin (1986), secara anatomi komposisi ikan tongkol terdiri atas:

- a. Tulang-tulang antara lain: tulang belakang, tulang kepala, tulang iga, dan tulang sirip.
- b. Otot, sebagian besar terdiri dari otot putih dan sebagian kecil pada permukaan terdiri atas otot merah.
- c. Kulit dan sirip.
- d. Viscera, usus dan termasuk didalamnya saluran kencing yang merupakan faktor utama penyebab pembusukan.

Selain dilihat dari segi anatomi, kita juga perlu mengetahui komposisi ikan tongkol berdasarkan bagian protein dan lemaknya. Ikan tongkol termasuk kedalam ikan yang mengandung lemak 36,0%, protein 11,3%, air 52,5%, dan mineral 0,53% (Saanin 1986).

Tabel.I.1 Komposisi gizi Ikan tongkol (*Euthynnus affinis*) per 100 gram daging Ikan
(Sumber : US Departemen of Health, Education, and Welfare 1972)

Komposisi	Bluefin	Skipjack	Yellowfin	Satuan
Energi	121	131	105	kal
Protein	22,6	26,2	24,1	g
Lemak	2,7	2,1	0,2	g
Abu	1,2	1,3	1,2	g
Calcium	8	80	9	mg
Phosphor	190	220	220	mg
Besi	2,7	4	1,1	mg
Sodium	90	52	78	mg
Retinol	10	10	5	mg
Thiamin	0,1	0,03	0,1	mg
Riboflavin	0,06	0,15	0,1	mg
Niasin	10	18	12,2	mg

1.1.3 Ciri-ciri spesifik ikan tongkol

Ikan tongkol memiliki ciri-ciri badan memanjang kaku, bulat seperti cerutu, memiliki dua sirip punggung. Sirip punggung pertama berjari-jari keras 10, sedang yang kedua berjari-jari keras 11 diikuti 6-9 jari-jari sirip tambahan. Sirip dubur berjari-jari lemah sebanyak 14 diikuti 6-9 jari-jari sirip tambahan. Terdapat satu lidah atau cuping diantara sirip perutnya. Badan tanpa sisik kecuali pada bagian korselet yang tumbuh sempurna dan mengecil dibagian belakang. Satu lunas kuat diapit dua lunas kecil pada daerah sirip ekornya (Dirjen Perikanan,1979)

Ikan tongkol termasuk ikan buas, predator yang hidup didaerah pantai, lepas pantai dan menggerombol dalam jumlah besar. Makanannya adalah ikan kecil-kecil dan cumi-cumi, panjang tubuh maksimal dapat mencapai 50 cm, tetapi umumnya 25-40 cm. Pada bagian atas berwarna hitam kebiruan dan putih perak pada bagian bawah. Terdapat ban-ban hitam, serong, menggelombang pada

bagian atas garis rusuk. Sirip perut dada berwarna gelap keunguan. Daerah penyebarannya terdapat di seluruh daerah pantai, lepas pantai perairan Indonesia Pasifik (Dirjen Perikanan,1979)

1.1.4 Mutu dan kemunduran mutu ikan

Mutu ikan identik dengan kesegaran ikan. Bentuk bahan baku ikan segar dapat berupa ikan utuh atau tanpa insang dan isi perut. Bahan baku harus bersih, bebas dari setiap bau yang menandakan kebusukan, bebas dari tanda dekomposisi dan pemalsuan, bebas dari sifat alamiah lain yang dapat menurunkan mutu dan tidak membahayakan kesehatan. Kesegaran ikan memberikan kontribusi besar terhadap mutu dari ikan tersebut. Kemunduran mutu pada ikan dapat disebabkan oleh penanganan bahan baku pada saat pasca panen ataupun saat diolah (Bremner, 2000).

Perubahan reaksi biokimia dan fisika kimia yang sangat cepat terjadi mulai dari ikan tersebut dibunuh sampai dikonsumsi. Perubahan ini dapat diklasifikasikan menjadi tiga tahap yaitu :

a. *Hiperaemia (pre rigor)*

Tahap *hiperaemia* secara biokimia ditandai dengan menurunnya kadar *Adenosin Tri Phosphat (ATP)* dan kreatin fosfat seperti halnya pada reaksi aktif glikolisis serta lendir yang terlepas dari kelenjar-kelenjarnya di dalam kulit ikan. Pelepasan lendir dari kelenjar lendir ini merupakan reaksi alami ikan terhadap keadaan yang tidak menyenangkan. Jumlah lendir yang terlepas dan menyelimuti tubuh ikan dapat sangat banyak hingga mencapai 1,2-5% dari berat tubuhnya (Eskin, 1990).

b. *Rigor mortis*

Perubahan selanjutnya, ikan memasuki tahap *rigor mortis*. Tingkat atau tahapan *rigor* ditandai dengan mengejangnya tubuh ikan yang merupakan hasil dari perubahan-perubahan biokimia yang kompleks di dalam otot ikan. Tubuh ikan yang mengejang yang berhubungan dengan terbentuknya aktomiosin yang berlangsung lambat pada tahap awal dan menjadi cepat pada tahap selanjutnya. Tingkat *rigor* ini berlangsung sekitar 1-12 jam sesaat setelah ikan mati. Pada umumnya ikan mempunyai proses *rigor* yang pendek, kira-kira 1-7 jam setelah ikan mati. Lamanya *rigor* dipengaruhi oleh kandungan glikogen dalam tubuh ikan dan temperatur lingkungan (Zaitsev *et al.* 1969).

Kandungan glikogen yang tinggi menunda datangnya proses *rigor* sehingga menghasilkan produksi daging dengan kualitas tinggi dan pH rendah. Pencapaian pH serendah mungkin dalam jaringan ikan merupakan hal yang penting karena dapat mencegah pertumbuhan bakteri dan untuk memperoleh warna daging yang diinginkan (Eskin, 1990).

Pada fase *rigor mortis*, pH tubuh ikan menurun menjadi 6,2-6,6 dari pH mula-mula 6,9-7,2. Tinggi rendahnya pH awal ikan sangat tergantung pada jumlah glikogen yang ada dan kekuatan penyangga (*buffering power*) pada daging ikan. Kekuatan penyangga pada daging ikan disebabkan oleh protein, asam laktat, asam fosfat, tri metil amin oksida (TMAO) dan basa-basa menguap. Proses *rigor mortis* dikehendaki selama mungkin karena proses ini dapat menghambat proses penurunan mutu oleh aksi mikroba. Semakin singkat proses *rigor mortis* maka ikan semakin cepat membusuk (FAO, 1995).

c. *Post rigor*

Indikasi awal proses pembusukan ikan adalah terjadinya kehilangan karakteristik dari bau dan rasa ikan, yang berkaitan dengan degradasi secara autolisis. Autolisis adalah proses penguraian protein dan lemak oleh enzim (protease dan lipase) yang terdapat di dalam daging ikan. Salah satu ciri-ciri terjadinya perubahan secara autolisis adalah dihasilkannya amoniak sebagai hasil akhir pada jaringan tubuh. Penguraian protein dan lemak dalam autolisis menyebabkan perubahan rasa, tekstur, dan penampakan ikan (FAO, 1995).

Autolisis dimulai bersamaan dengan penurunan pH. Mula-mula protein terpecah menjadi molekul-molekul makro yang menyebabkan peningkatan dehidrasi lalu pecah lagi menjadi polipeptida, pepton, dan akhirnya menjadi asam amino. Disamping asam amino, autolisis juga menghasilkan sejumlah kecil pirimidin dan purin, basa yang dibebaskan pada waktu pemecahan asam nukleat.

Bersamaan dengan itu, hidrolisis lemak menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol. Autolisis akan merubah struktur daging sehingga kekenyalan menurun. Autolisis tidak dapat dihentikan walaupun dalam suhu yang sangat rendah. Biasanya proses autolisis akan selalu diikuti dengan meningkatnya jumlah bakteri. Semua hasil penguraian enzim selama proses autolisis merupakan media yang sangat cocok untuk pertumbuhan bakteri dan mikroba lainnya (Zaitsev, 1969; dan FAO, 1995).

d. Busuk

Setelah fase *rigor mortis* berakhir dan pembusukan bakteri berlangsung maka pH daging akan naik mendekati netral hingga 7,5-8,0 atau lebih tinggi jika

proses pembusukan sangat parah. Tingkat keparahan pembusukan disebabkan oleh kadar senyawa-senyawa yang bersifat basa. Pada kondisi ini, pH ikan akan naik dengan perlahan-lahan dan dengan semakin banyaknya senyawa basa yang terbentuk akan semakin mempercepat kenaikan pH ikan (FAO, 1995).

Jumlah bakteri pada tahap ini sudah cukup tinggi akibat perkembangbiakan yang terjadi pada tahap-tahap sebelumnya. Kegiatan bakteri pembusuk dimulai pada saat yang hampir bersamaan dengan autolisis dan kemudian berjalan sejajar (Eskin, 1990).

1.2 Histamin

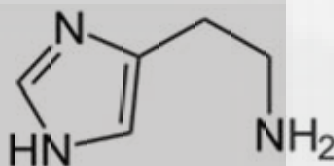
Histamin dan asetilkolin mempunyai persamaan sejarah yaitu disintesis secara kimia lebih dahulu sebelum dikenal sifat-sifat biologisnya. Keduanya diisolasi dari ekstrak ergot. Histamin dan asetilkolin kemudian terbukti dihasilkan oleh bakteri yang mengkontaminasi ergot. Pada awal abad 19 histamin dapat diisolasi dari jaringan hati dan paru-paru segar. Histamin juga ditemukan pada beberapa jaringan tubuh maka dari itu diberi nama histamin (histos=jaringan). Kemudian terbukti bahwa pada penggoresan kulit dilepaskan zat yang sifatnya mirip histamin (H-substance) yang kemudian terbukti histamin. (Keer, 2002).

Histamin merupakan komponen amin biogenik yaitu bahan aktif 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, 2002).

Keracunan histamin merupakan suatu intoksikasi akibat mengonsumsi ikan laut yang umumnya berasal dari family *scombroid*, seperti tuna, tongkol,

mackarel, cakalang, dan sejenisnya. Histamin merupakan senyawa amin biogenik yang terbentuk dari asam amino histidin akibat reaksi dengan enzim dekarboksilase (Dalgaard, 2008).

Indriati, (2006) menyatakan bahwa histamin merupakan salah satu senyawa biogenik amin yang dianggap sebagai penyebab utama keracunan makanan yang berasal dari ikan, terutama dari kelompok *scombroid*. Histamin merupakan komponen yang kecil, mempunyai berat molekul rendah yang terdiri dari cincin imidazol dan sisi rantai etilamin. Histamin juga merupakan komponen yang tidak larut air. Histamin merupakan salah satu amin biogenik yang mempunyai pengaruh terhadap fisiologis manusia.



Gambar 1.2. Struktur Histamin

1.2.2 Pembentukan histamin akibat aktivitas bakteri

Setelah ikan mati, sistem pertahanan tubuhnya tidak bisa lagi melindungi dari serangan bakteri, dan bakteri pembentuk histamin mulai tumbuh dan memproduksi enzim dekarboksilase yang akan menyerang histidin dan asam amino bebas lainnya menjadi histamin.

Histamin umumnya dibentuk pada temperatur tinggi (>20°C). Pendinginan dan pembekuan yang cepat setelah ikan mati merupakan tindakan yang sangat penting dalam upaya mencegah pembentukan scambrotoxin (histamin). (Taylor, 2002)

Histamin tidak akan terbentuk bila ikan selalu disimpan dibawah suhu 5°C. Pembekuan yang cukup lama (24 minggu) diduga akan menginaktifkan bakteri pembentuk enzim dekarboksilase dan diduga pula dapat mengurangi pembentukan histamin. Penelitian lebih lanjut menyebutkan bahwa kenaikan pembentukan histamin dapat terus berjalan walaupun dalam keadaan penyimpanan beku (Taylor, 2002).

Selama proses kemunduran mutu, bakteri memproduksi enzim dekarboksilase yang akan mengubah histidin bebas dan asam amino lain pada daging ikan menjadi histamin dan amin biogenik lain seperti putresin (dari ornitin), kadaverin (dari lisin), serta spermidin dan spermin (dari arginin) (Lehane, 2000).

Tabel I.2. Jenis-jenis dan spesifikasi bakteri pembentuk histamin yang terdapat pada ikan laut (Sumber: Eitenmiller *et al.* (1982)

No	Bakteri	Spesifikasi
1	<i>Hafnia</i> sp	Gram negatif, fakultatif anaerobik (<i>Hafnia alvei</i>)
2	<i>Klebsiella</i> sp	Gram negatif, fakultatif anaerobik (<i>Klebsiella pneumonia</i>)
3	<i>Escherichia coli</i>	Gram negatif, Fakultatif anaerobic
4	<i>Clostridium</i> sp	Gram positif, anaerobik (<i>Clostridium perfringens</i>)
5	<i>Lactobacillus</i> sp	Gram positif, fakultatif anaerobik (<i>Lactobacillus</i> 30a)
6	<i>Enterobacter</i> spp	Gram negatif, fakultatif anaerobik (<i>Enterobacter aerogenes</i>)
7	<i>Proteus</i> sp	Gram negatif, fakultatif anaerobik (<i>Proteus morgani</i>)

1.2.3 Pembentukan histamin pada daging ikan

Tingginya kandungan histidin bebas pada daging ikan berkorelasi positif terhadap kandungan histamin pada daging ikan tersebut. Kandungan histamin pada daging ikan menyebar secara tidak merata. Kadar histidin bebas paling besar terdapat pada bagian anterior ikan dan agak berkurang ke bagian posterior, sehingga menyebabkan kandungan histamin pada bagian anterior umumnya lebih besar dari pada bagian posterior (Yoshinaga, 1982: 447)

Selain histidin bebas yang terdapat pada daging ikan, kandungan histamin juga dipengaruhi oleh aktivitas enzim *histidine decarboxylase* (HDC) yang terdapat pada bagian intestinal ikan. Namun pada umumnya aktivitas dekarboksilasi histidin menjadi histamin lebih banyak dilakukan oleh bakteri dari pada oleh enzim dari ikan itu sendiri. Bakteri yang mampu merombak histidin menjadi histamin adalah bakteri *histidine decarboxylase positive* yang juga mempunyai kemampuan menghasilkan enzim *histidine decarboxylase* (Yoshinaga, 1982)

Histamin dibentuk oleh bakteri sebagai hasil metabolit sekunder untuk menyeimbangkan kondisi lingkungan yang semakin asam bagi pertumbuhannya. Diantara bakteri yang dapat menghasilkan histamin adalah *Morganella morganii*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus 30a*, *Clostridium perfringens*, *Micrococcus spp*, *Klesbiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Vibrio anguillarum* dan *Hafnia alvei* (Kim, 2002).

Perombakan histidin menjadi histamin berlangsung secara intraseluler. Histidin bebas masuk ke dalam sel bakteri melalui sistem transportasi aktif.

Masuknya histidin bebas yang bermuatan positif ke dalam sel menyebabkan proton gradien sehingga menimbulkan energi. (Yoshinaga, 1982)

Proses perombakan histidin menjadi histamin juga menimbulkan energi pada *histamine pathway*. Namun besarnya energi yang dihasilkan dari proses pembentukan histamin belum diketahui secara pasti. Selain sebagai penghasil energi, histamin yang disekresikan keluar sel akan menyebabkan naiknya pH lingkungan karena histamin bersifat alkali (basa). Sehingga kondisi lingkungan yang semakin asam akibat proses dekomposisi (pembusukan) maupun proses fermentasi dapat dieliminasi dengan adanya histamin (Molenaar, 1993).

1.2.4 Reaksi fisiologis histamin

Keracunan histamin disebabkan oleh konsumsi ikan yang mengandung histamin dengan level yang tinggi. Gejala keracunan histamin meliputi sakit kepala, kejang, mual, wajah dan leher kemerah-merahan, tubuh gatal-gatal, mulut dan kerongkongan terasa terbakar, bibir membengkak, badan lemas dan muntah-muntah (Bremer, 2003; Eitenmiller, 1982).

Keracunan histamin dapat terjadi sangat cepat, sekitar 30 menit setelah mengkonsumsi ikan yang mengandung histamin tinggi. Histamin pada ikan yang busuk dapat menimbulkan keracunan jika terdapat sekitar 100 mg dalam 10 g sampel daging ikan yang diuji (Bremer *et al.* 2003; Kimata 1961).

Food And Drug Administration (2001), menetapkan bahwa untuk ikan tuna, mahi-mahi dan ikan sejenis, 5 mg histamin daging ikan merupakan level yang harus diwaspadai sebagai indikator terjadinya dekomposisi, sedangkan 50 mg histamin daging ikan merupakan level yang membahayakan atau dapat

menimbulkan keracunan. Oleh karena itu, jika ditemukan ikan dengan kandungan 5 mg histamin daging ikan pada satu unit, maka kemungkinan pada unit yang lain, level histamin dapat mencapai lebih dari 50 mg.

Tabel 1.3 Tingkat bahaya histamin daging ikan (Sumber: Sumner *et al.* (2004))

No	Kadar histamin Tingkatan bahaya	Tingkat bahaya
1	< 5 mg	Aman dikonsumsi
2	5-20 mg	Kemungkinan toksik
3	20-100 mg	Berpeluang toksik
4	> 100 mg	Toksik

1.2.5 Perubahan kandungan histamin pada ikan segar

Pembentukan histamin di dalam jaringan daging ikan seiring dengan penambahan jumlah bakteri pembentuk histamin pada ikan tersebut. Semakin banyak kandungan bakteri pada ikan maka kemungkinan kandungan histamin semakin besar. Sebagian besar bakteri pembentuk histamin pada ikan berasal dari kulit, insang, dan bagian intestinal ikan sebagai *normal flora* (Bremer, 2003).

Kemampuan bakteri untuk tumbuh dan membentuk histamin pada daging ikan sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan dan media tempat tumbuh. Suhu yang optimum untuk pertumbuhan dan pembentukan histamin pada beberapa bakteri berkisar antara 25-38 °C (Bremer, 2003).

Pada spesies ikan yang berbeda, jenis bakteri yang membentuk histamin juga berbeda. Sebagian besar bakteri pembentuk histamin yang tumbuh pada *skipjack tuna* adalah golongan fakultatif maupun obligat anaerobik. Ini

disebabkan karena setelah mengalami kematian, jaringan daging ikan bersifat anaerobik. (Bremer, 2003).

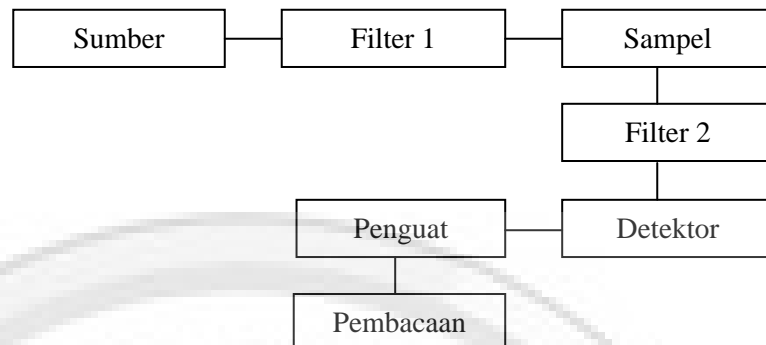
Pada suhu 38 °C, histamin terbentuk setelah ikan disimpan selama 6-12 jam dan terus mengalami peningkatan. Adanya histamin setelah 6 jam penyimpanan menunjukkan bahwa daging ikan pada awalnya tidak mengandung histamin. Selain itu histamin terbentuk ketika pH daging ikan semakin rendah akibat adanya dekomposisi berbagai senyawa kimia dari kegiatan enzimatik dan bakteri pada daging ikan (Bremer, 2003).

1.3 Spektrofluorometer

Spektrofotometer fluoresensi merupakan suatu prosedur yang menggunakan pengukuran intensitas cahaya fluoresensi yang dipancarkan oleh zat uji dibandingkan dengan yang dipancarkan oleh suatu baku tertentu. Pada umumnya cahaya yang diemisikan oleh larutan berfluoresensi mempunyai intensitas maksimum pada panjang gelombang yang biasanya 20-30 nm lebih panjang dari panjang gelombang radiasi eksitasi (gelombang pita penyerapan sinar yang membangkitkannya) (Depkes RI, 1979:775).

1.3.2 Instrumentasi

Mulja, 1995 menyatakan bahwa pengukuran intensitas fluoresensi dapat dilakukan dengan suatu fluorometer filter sederhana. Instrument yang dipergunakan bermacam-macam mulai dari yang paling sederhana (filter fluorometer) sampai ke yang sangat kompleks yaitu spektrofotometer. Komponen-komponen utama dari masing-masing instrument ini yaitu :



Gambar I. 4. Diagram optik flourometer

a. Sumber energi eksitasi

Banyak terdapat sumber radiasi. Lampu merkuri relatif stabil dan memancarkan energi terutama pada panjang gelombang diskret. Lampu tungsten memberikan energi kontinyu di daerah tampak. Lampu pancar xenon bertekanan tinggi seringkali digunakan pada spektrofluorometer karena alat tersebut merupakan sebuah sumber dengan intensitas tinggi yang menghasilkan energi kontinyu dengan intensitas tinggi dari ultraviolet sampai inframerah (Mulja, 1995).

Pada filter fluorometer digunakan lampu uap raksa sebagai sumber cahaya dan energi eksitasi diseleksi dengan filter. Pada spektrofluorimeter biasanya digunakan lampu Xenon (150 W) yang memancarkan spectrum kontinyu dengan panjang gelombang 200-800 nm. Energi eksitasi diseleksi dengan monokromator eksitasi (grating) (Mulja, 1995).

b. Kuvet

Sel spesimen yang digunakan dalam pengukuran fluoresensi dapat berupa tabung bulat atau sel empat persegi panjang (kuvet), sama seperti yang

digunakan pada spektrofotometer resapan, terkecuali keempat sisi vertikalnya dipoles. Ukuran spesimen uji yang sesuai adalah 2-3 mL, tetapi beberapa instrumen dapat disesuaikan dengan sel-sel kecil yang memuat 100-300 μ l atau dengan pipa kapiler yang hanya memerlukan jumlah spesimen yang kecil. Spektrofotometer harus dioperasikan sesuai dengan petunjuk pabrik pembuat (Mulja, 1995).

Bila panjang gelombang untuk eksitasi di atas 320 nm dapat digunakan kuvet dari gelas, akan tetapi untuk eksitasi pada panjang gelombang yang lebih pendek digunakan kuvet dari silika. Kuvet tidak boleh berfluoresensi dan tidak boleh tergores karena dapat menghamburkan. (Mulja, 1995).

c. Sepasang filter atau monokromator

Pada umumnya fluorometer menggunakan tabung-tabung fotomultiplier sebagai detektor, banyak tipe dari jenis tersebut yang tersedia dan masing-masing mempunyai ciri khusus yang berkenaan dengan daerah spektral dengan kepekaan maksimum, menguntungkan dan derau secara elektrik. Pada umumnya, detektor ditempatkan di atas sebuah poros yang membuat sudut 90° dengan berkas eksitasi. Geometri sudut siku ini memungkinkan radiasi eksitasi menembus spesimen uji tanpa mengkontaminasi sinyal luaran yang diterima oleh detektor fluoresensi. Akan tetapi tidak dapat dihindarkan detektor menerima sejumlah radiasi eksitasi sebagai akibat sifat menghamburkan yang menghindari hamburan ini maka digunakan instrument yang bernama filter. Instrumen ini dilengkapi dengan susunan otomatis baik dari panjang gelombang eksitasi maupun panjang

gelombang emisi, dengan perekaman grafis dari isyarat detektor. Filter ini digunakan untuk menyeleksi panjang gelombang eksitasi dan emisi (Mulja, 1995).

1) Fluorometer

Filter pertama hanya meneruskan cahaya ultraviolet dari sumber cahaya yaitu radiasi dengan panjang gelombang yang cocok untuk eksitasi specimen uji. Filter kedua meloloskan hanya panjang gelombang yang sesuai dengan fluoresensi maksimum dari zat yang diperiksa dan menahan setiap cahaya eksitasi yang terhambur. Jenis filter kedua ini biasanya yang menahan panjang gelombang pendek (Mulja, 1995).

Persoalan yang dihadapi pada pemilihan filter yaitu panjang gelombang yang lebih panjang yang diteruskan oleh filter pertama juga lolos pada daerah panjang gelombang yang lebih pendek dari filter kedua, sehingga menghasilkan blangko yang tinggi. Disamping itu sukar untuk mendapatkan filter dengan panjang gelombang yang cocok dengan radiasi eksitasi karakteristik untuk sampel (Mulja, 1995).

2) Spektrofluorometer

Menggunakan sepasang monokromator (grating) untuk menyeleksi radiasi eksitasi dan emisi yang lebih akurat (memberikan kepekaan yang tinggi) sehingga kesulitan-kesulitan tersebut diatas dapat diatasi. Monokromator pertama mendispersikan cahaya dari sumber cahaya sehingga menghasilkan radiasi eksitasi yang monokromatis. Sample yang tereksitasi kemudian berfluoresensi sehingga merupakan sumber cahaya

bagi monokromator kedua. Dengan alat ini dapat dibuat spektrum eksitasi maupun emisi (Mulja, 1995).

Perbandingan intensitas fluoresensi spesimen uji dengan intensitas fluoresensi zat baku yang diperoleh pada pengaturan instrumen yang sama memberikan ukuran semi kuantitatif bagi kekuatan fluoresensi. (Mulja, 1995).

1.3.3 Cara kerja

Pada fluorometer larutan zat disinari dengan sinar yang panjang gelombangnya di sekitar panjang gelombang penyerapan maksimum yang berasal dari lampu raksa atau lampu pijar yang telah disekat dengan filter. Intensitas fluoresensi diukur atau dibandingkan dengan intensitas larutan baku. Sinar fluoresensi dibebaskan dari sinar hamburan dengan melewati sinar melalui filter atau monokromator. Cara pengukuran pada dasarnya sama dengan cara spektrofotometri. Karena zat organik yang berfluoresensi mungkin terurai secara fotokimia, penyinaran harus dilakukan sesingkat mungkin (Depkes RI, 1979:776).

Keterangan :

- a = pembacaan intensitas fluoresensi larutan baku
- b = pembacaan intensitas fluoresensi larutan blangko untuk zat baku
- c = pembacaan intensitas fluoresensi larutan uji
- d = pembacaan intensitas fluoresensi larutan blangko untuk zat uji

1.3.4 Spektrum eksitasi (peresapan) dan fluoresensi (emisi)

Maksimum dari spektrum fluoresensi setelah pada panjang gelombang yang lebih panjang jika dibandingkan dengan maksimum dari spektrum eksitasi. Ini disebabkan karena perbedaan energi dari excited state dan ground state pada waktu absorpsi lebih besar dari proses emisi (Mulja, 1995).

1.4 Validasi Metode

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Hal ini dilakukan untuk menjamin bahwa setiap pengukuran serupa yang dilakukan di masa yang akan datang akan menghasilkan nilai terhitung yang cukup dekat atau sama dengan nilai sebenarnya dari jumlah analit yang terdapat dalam sampel.

Validasi metode analisis perlu dilakukan untuk membuktikan bahwa metode yang digunakan sudah valid dan kesalahan yang terjadi masih dalam batas yang diizinkan (Gandjar, 2012:472).

1.4.1 Kalibrasi dan linearitas

Kalibrasi suatu metode meliputi perbandingan nilai yang diukur oleh sistem di bawah kondisi-kondisi yang ditetapkan secara ketat dengan nilai-nilai standar yang telah ditentukan sebelumnya (Watson, 2009:15). Kepekaan metode menunjukkan seberapa responsif metode tersebut terhadap sedikit perubahan dalam konsentrasi suatu analit, kepekaan dapat dilihat sebagai kemiringan suatu kurva respons dan mungkin merupakan fungsi suatu cara kalibrasi instrumen (Watson, 2009:15).

Linieritas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Linieritas merupakan ukuran seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (y) dengan konsentrasi (x). linieritas dapat diukur dengan melakukan pengukuran tunggal pada konsentrasi yang berbeda-beda.

Penyiapan konsentrasi-konsentrasi yang berbeda dengan menggunakan berat baku yang berbeda akan menghasilkan kesalahan terhadap kajian linieritas analit (Gandjar, 2012:480).

1.4.2 Presisi (keseeksamaan)

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif atau *relative standard deviation* (biasanya disingkat dengan RSD) dari sejumlah sampel. Sesuai dengan ICH, presisi harus dilakukan pada 3 tingkatan yang berbeda yaitu: keterulangan (*repeatability*), presisi antara (*intermediate precision*) dan ketertiruan (*reproducibility*) (Gandjar, 2012:473).

1.4.3 Ketepatan (akurasi)

Akurasi merupakan ketepatan metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik nilai konvensi, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan. Ketepatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Ketepatan hasil analisis sangat tergantung kepada sebaran galat sistematis di dalam keseluruhan tahapan analisis (Harmita, 2004:117).

1.4.4 Batas deteksi (*Limit of detection*, LOD)

Batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. LOD merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit di atas atau di bawah nilai tertentu. Definisi batas deteksi yang paling umum digunakan dalam kimia analisis adalah bahwa batas deteksi merupakan kadar analit yang

memberikan respon sebesar respon blanko (y_b) ditambah dengan 3 simpangan baku blanko ($3S_b$) (Gandjar, 2012:477).

1.4.5 Batas kuantifikasi (*Limit of quantification*, LOQ)

Batas kuantifikasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. Sebagaimana LOD, LOQ juga diekspresikan sebagai konsentrasi (dengan akurasi dan presisi juga dilaporkan) (Gandjar, 2012:478).

