

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada analisis kadar histamin dalam sampel ikan tongkol ini, sampel ikan diambil dari tempat penangkapan ikan di Jakarta lalu dibawa menuju laboratorium dibalai pengujian perikanan setelah itu sampel diambil dari beberapa bagian tubuh ikan yaitu bagian kepala, badan dan ekor hal ini dikarenakan agar histamin dapat diambil pada beberapa bagian pada ikan lalu sampel diblender. Sampel yang telah diblender langsung masuk pada tahap ekstraksi dengan metanol karena pelarut tersebut dapat melarutkan senyawa histamin dalam ikan tongkol. Sampel dipanaskan pada suhu 60° C dikarenakan titik didih metanol mencapai 60° C dan disaring dengan menggunakan kertas saring. Hasil penyaringannya digunakan untuk kromatografi penukar ion.

Kromatografi penukar ion ini memiliki dua fasa, yaitu fasa diam dan fasa gerak. Syarat-syarat bahan yang bisa digunakan untuk fasa diam adalah tidak terlarut pada fasa gerak, stabil pada kondisi proses yang dikehendaki dan mampu menyerap zat-zat yang dipisahkan. Sedangkan bahan yang bisa dipakai sebagai fasa gerak harus mempunyai sifat-sifat tidak melarutkan fasa diam, stabil terhadap kondisi proses dan mampu melepaskan atau melarutkan unsur atau ion yang terserap pada fasa diamnya, dengan besar kelarutan yang berbeda-beda. Fase diam yang digunakan

adalah resin jenis dowex. Resin penukar ion adalah suatu senyawa organik berstruktur tiga dimensi dengan ikatan silang dan mempunyai gugus-gugus fungsi yang dapat terionisasi. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa resin penukar ion terdiri dari fase organik padat yang tidak larut dalam air dan terikat dengan ion-ion bermuatan. Ion-ion inilah yang dapat dipertukarkan dengan ion-ion yang lain.

Tahap selanjutnya dilakukan derivatisasi, tahap ini dilakukan pengukuran sampel standar, HCl 0,1 N dan sampel hasil kromatografi penukar ion pada instrumen spektrofotometer yang masing-masing telah ditambahkan HCl 0,1 N; NaOH 1N; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 3,57 N dan orto-ptaldikarbosildehyd (OPT) untuk membentuk senyawa fluoresen sehingga dapat dibaca saat pengukuran pada spektrofotometer.

Penelitian ini dibagi berdasarkan perbedaan waktu penyimpanan ikan tongkol, mulai dari 0 jam, 1 jam, 3 jam, 4 jam, 5 jam, 6 jam, 7 jam dan 24 jam.

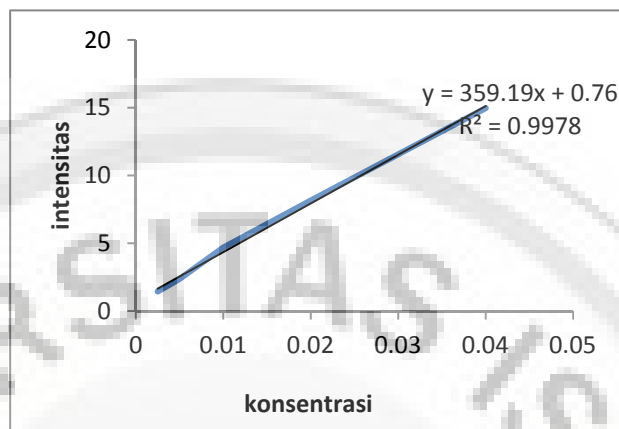
Sebelum melakukan pengujian sampel maka dilakukan pembuatan larutan baku, pembuatan larutan baku ini dilakukan dengan seakurat mungkin, karena hasil konsentrasi larutan baku histamin ini akan digunakan sebagai pembanding untuk menghitung kadar dari histamin yang terkandung dari sampel. Untuk larutan baku (1000 ppm), histamin baku ditimbang sebanyak 169,1 mg 2 ml HCl 0,1 N ke dalam labu ukur 100 ml. Dibuat larutan stok 10 ppm dengan memipet 1 mL larutan 1000 ppm yang ditambahkan HCl sampai batas volume Setelah itu dibuat larutan baku dengan konsentrasi 0,0025 mg/L ; 0,005 mg/L; 0,01 mg/L; 0,02 mg/L; 0,04 mg/L.

Pada uji ini dibuat baku standar sebanyak 3x dikarenakan pengujian yang dilakukan sebanyak 3x dan harus memiliki baku standar yang baik setiap pengujiannya.

Verifikasi metode bertujuan untuk membuktikan apakah suatu metode yang digunakan dalam menganalisis sampel masih dapat bekerja dengan baik sehingga dapat memberikan kepastian bahwa metode tersebut masih memenuhi persyaratan sesuai dengan tujuan penggunaannya. Parameter analisis yang digunakan yaitu linearitas, batas deteksi, batas kuantifikasi, keseksamaan dan kecermatan.

Pada minggu pertama dilakukan pengujian untuk sampel 0 jam dan 1 jam sebelum dilakukan pengujian dilakukan verifikasi metode. Verifikasi metode yang pertama uji linieritas. Uji linieritas ini dimaksudkan untuk mengetahui kesesuaian antara kerja analisis dengan respon alat. Uji linearitas dapat dilakukan dengan cara membuat kurva kalibrasi larutan standar, minimal lima titik konsentrasi pada kisaran larutan standar kerja yang dipakai. Kurva baku standar yang pertama dengan persamaan regresi linear yang terbentuk adalah  $y = 0,76023 + 359,17x$  dengan koefisien korelasi 0,997. Dari persamaan regresi linear yang dihasilkan, maka dapat dihitung simpangan baku residual, standar deviasi dan koefisien variansi untuk melihat derajat linieritasnya. Maka, didapatkan simpangan baku residual ( $S_{y/x}$ ) 0,1342 dengan standar deviasi ( $S_{x/o}$ ) 0,000374 dan koefisien variansi ( $V_{x0}$ ) 2,41 %. Koefisien korelasi ( $r$ ) dari kurva kalibrasi yang diperoleh mendekati 1 dan nilai koefisien variansi fungsi regresi ( $V_{x0}$ )  $< 5\%$ . Berarti dengan

metode ini, alat spektrofotometer dapat memberikan respon yang baik terhadap standar.



**Gambar V.1** kurva kalibrasi standar minggu ke 1

Akurasi (kecermatan) menunjukkan kedekatan nilai hasil pengukuran dengan nilai sebenarnya. Untuk menentukan tingkat akurasi perlu diketahui nilai sebenarnya dari parameter yang diukur dan kemudian dapat diketahui seberapa besar tingkat akurasinya. Akurasi ini menggunakan tiga rentang konsentrasi yaitu pada konsentrasi rendah, sedang dan tinggi. Pengukuran perolehan kembali memenuhi syarat jika persentase tidak menyimpang dari 98-102%. Kecermatan ditunjukkan oleh perolehan kembali yang berada pada rentang 76,67-106,67%. Data persen perolehan kembali ini tidak memenuhi persyaratan, ini dapat disebabkan faktor pengotornya terlalu banyak atau bisa terjadi ketidakteelitian dalam proses pengenceran. Hasilnya dapat dilihat pada **Tabel V.1**

**Tabel V.1** kecermatan minggu ke 1

No	Konsentrasi	Perolehan kembali % Tingkatan bahaya	Rentang
1	0,0025	76,67	
2	0,01	106,67	76,67-106,67
3	0,04	98,83	

Presisi (Keseksamaan) menunjukkan tingkat reliabilitas dari data yang diperoleh. Hal ini dapat dilihat dari standar deviasi yang diperoleh dari pengukuran Presisi yang baik akan memberikan standar deviasi yang kecil. Tujuan penentuan keseksamaan adalah untuk melihat kinerja alat dan metode analisis yang digunakan. Dari perhitungan simpangan baku residual (SBR) dari data hasil yang didapat 1,063 %. Menurut teori hasil RSD yang baik yaitu  $\leq 2\%$ . Dengan demikian nilai RSD yang didapat memenuhi persyaratan. Hasilnya dapat dilihat pada **Tabel V.2**.

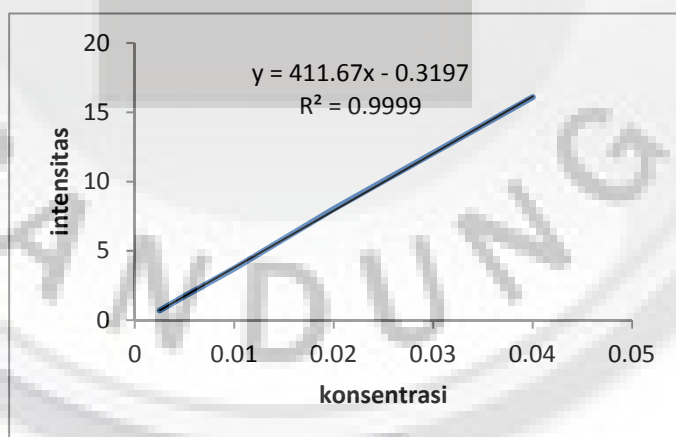
**Tabel V.2 Keseksamaan minggu ke 1**

<b>Pengukuran</b>	<b>Absorbansi</b>
<b>1</b>	15,2
<b>2</b>	14,66
<b>3</b>	15,045
<b>4</b>	15,256
<b>5</b>	15,56
<b>6</b>	14,968
<b>Rata-rata</b>	15,2815
<b>SD</b>	0,00042
<b>RSD (%)</b>	1,063

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Dari hasil pengujian dan perhitungan didapat batas deteksi sebesar 0,0012 ppm dan batas kuantitasi sebesar 0,0037 ppm.

Pada minggu kedua dilakukan kembali validasi metode karena dilakukan lagi pengukuran histamin dengan waktu penyimpanan ikan 7 jam dan 24 jam. Kurva baku standar yang kedua dengan persamaan regresi linear yang terbentuk adalah  $y = 0,31976 + 411,67577x$  dengan koefisien korelasi 0,9987. Dari persamaan regresi linear yang dihasilkan, maka dapat dihitung simpangan baku residual, standar deviasi dan koefisien variansi untuk melihat derajat linearitasnya.

Maka, didapatkan simpangan baku residual ( $S_{y/x}$ ) 0,3709 dengan standar deviasi ( $S_{x_0}$ ) 0,00091 dan koefisien variansi ( $V_{x_0}$ ) 5,8 %. Koefisien korelasi ( $r$ ) dari kurva kalibrasi yang diperoleh mendekati 1 dan nilai koefisien variansi fungsi regresi ( $V_{x_0}$ ) lebih dari 5%. Berarti dengan metode ini, alat spektrofotometer dapat memberikan respon yang hampir memenuhi standar. Hal ini disebabkan karena adanya pengotor dan kurangnya ketelitian pada saat pengujian.



Gambar V.2 kurva kalibrasi standar minggu ke 2

Akurasi ini pada pengujian yang kedua menggunakan tiga rentang konsentrasi yaitu pada konsentrasi rendah, sedang dan tinggi. Kecermatan ditunjukkan oleh perolehan kembali yang berada pada rentang 97,30-99,58%. Data

persen perolehan kembali ini tidak memenuhi persyaratan. Karena perolehan kembali menyimpang dari 98-102%.

Ini disebabkan karena adanya kesalahan pada alat, adanya kesalahan pada pengujian yang menyebabkan perolehan kembali menjadi kecil. Tetapi masih bisa ditoleransi karena berada pada rentang 97,30-99,58%. Maka dari itu dapat disimpulkan bahwa nilai perolehan kembali dari berbagai konsentrasi relatif tidak jauh berbeda. Dapat dilihat pada **Tabel V.3**.

**Tabel V.3** kecermatan minggu ke 2

No	Konsentrasi	Perolehan kembali % Tingkatan bahaya	Rentang
1	0,0025	97,3	97,30-99,58%.
2	0,01	97,33	
3	0,04	99,58	

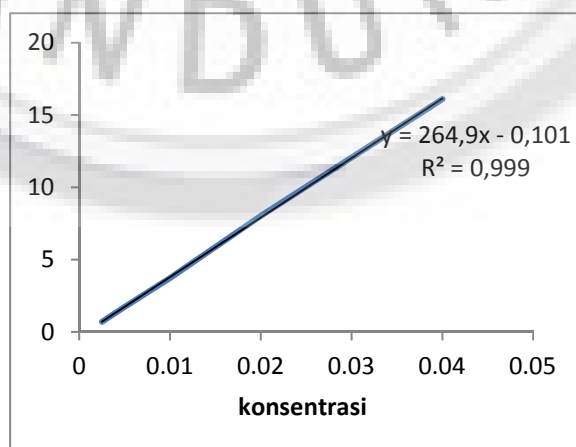
Presisi (keseksamaan) pengujian yang ke dua didapatkan perhitungan simpangan baku residual (SBR) dari data hasil yang didapat 0,60 %. Menurut teori hasil RSD yang baik yaitu  $\leq 2\%$ . Dengan demikian nilai RSD yang didapat memenuhi persyaratan. Hasilnya dapat dilihat pada **tabel V.4**.

**Tabel V.4** Keseksamaan minggu ke 2

Pengukuran	Absorbansi
1	16,047
2	16,179
3	16,089
4	16,364
5	16,323
6	16,195
<b>Rata-rata</b>	16,1995
<b>SD</b>	0,00024
<b>RSD (%)</b>	0,6

Batas deteksi dan batas kuantisasi yang kedua dari hasil pengujian dan perhitungan didapat batas deteksi sebesar 0,0027 ppm dan batas kuantisasi sebesar 0,009 ppm.

Pada minggu ketiga dilakukan kembali verifikasi metode karena dilakukan lagi pengukuran histamin untuk mencari titik kritis kadar histamin yang masih dapat dikonsumsi sebelum mencapai berpeluang toksik. Maka dilakukan pengujian kembali dengan waktu penyimpanan ikan 3 jam, 4 jam, 5 jam dan 6 jam. Kurva baku standar yang ketiga dengan persamaan regresi linear yang terbentuk adalah  $y=0,10133+264,97079x$  dengan koefisien korelasi ( $r$ ) 0,99925. Dari persamaan regresi linear yang dihasilkan, maka dapat dihitung simpangan baku residual, standar deviasi dan koefisien variansi untuk melihat derajat linearitasnya. Maka, didapatkan simpangan baku residual ( $S_{y/x}$ ) 0,0570 dengan standar deviasi ( $S_{x/o}$ ) 0,000215 dan koefisien variansi ( $V_{x/o}$ ) 1,39 %. Koefisien korelasi ( $r$ ) dari kurva kalibrasi yang diperoleh mendekati 1 dan nilai koefisien variansi fungsi regresi ( $V_{x/o}$ ) kurang dari 5%. Berarti dengan metode ini, alat spektrofotometer dapat memberikan respon yang baik.



Gambar V.3 kurva kalibrasi standar minggu ke 3



Akurasi ini pada pengujian yang kedua pun menggunakan tiga rentang konsentrasi yaitu pada konsentrasi rendah, sedang dan tinggi. Kecermatan ditunjukkan oleh perolehan kembali yang berada pada rentang 93,73-102,1%. Data persen perolehan kembali ini tidak memenuhi persyaratan. Karena perolehan kembali menyimpang dari 98-102%. Ini disebabkan karena adanya kesalahan pada alat, adanya kesalahan pada pengujian yang menyebabkan perolehan kembali menjadi kecil. Tetapi masih bisa ditoleransi karena berada pada rentang 93,73-102,1%. Maka dari itu dapat disimpulkan bahwa nilai perolehan kembali dari berbagai konsentrasi relatif tidak jauh berbeda. Dapat dilihat pada **tabel V.5**.

**Tabel V.5** Kecermatan minggu ke 3

No	Konsentrasi	Perolehan kembali % Tingkatan bahaya	Rentang
1	0,0025	93,73	93,73-102,1%.
2	0,01	102,1	
3	0,04	100,41	

Presisi (keseksamaan) pengujian yang ke dua didapatkan perhitungan simpangan baku residual (SBR) dari data hasil yang didapat 0,52%. Menurut teori hasil RSD yang baik yaitu  $\leq 2\%$ . Dengan demikian nilai RSD yang didapat memenuhi persyaratan. Hasil dapat dilihat pada **tabel V.6**

**Tabel V.6** keseksamaan minggu ke 3

Pengukuran	Absorbansi
1	10,731
2	10,719
3	10,826
4	10,95
5	10,925
6	10,712
<b>Rata-rata</b>	10,8105
<b>SD</b>	0,00021
<b>RSD (%)</b>	0,52

Batas deteksi dan batas kuantitasi yang kedua dari hasil pengujian dan perhitungan didapat batas deteksi sebesar 0,0006 ppm dan batas kuantitasi sebesar 0,0021 ppm.

Setelah dilakukan penelitian ternyata setelah diberikan perlakuan waktu penyimpanan yang berbeda-beda, maka didapatkan kadar histamin yang berbeda-beda juga. Semakin lama waktu penyimpanan, kadar histamin yang didapatkan semakin tinggi. Hasil analisis kadar histamin yang diperoleh memiliki kadar yang beragam dapat dilihat pada **Tabel V.7**.

**Tabel V.7** Kadar Histamin Ikan Tongkol

No	Waktu perlakuan	Kadar histamin (mg) Tingkatan bahaya	Rata-rata	Tingkat bahaya	Waktu percobaan
1	0 jam	0,75 0,87	0,81	Aman	Minggu ke 1
2	1 jam	2,98 3,82	3,4	Aman	Minggu ke 1
3	3 jam	8,3 10,55	9,425	Aman	Minggu ke 3
4	4 jam	10 9,5	9,75	Aman	Minggu ke 3
5	5 jam	12,1 12	12,05	Aman	Minggu ke 3
6	6 jam	12,5 13	12,75	Aman	Minggu ke 3
7	7 jam	54,41 54,47	54,44	Berpeluang toksik	Minggu ke 2
8	24jam	732,7 671,16	701,93	Toksik	Minggu ke 2

Maka, jika dilihat dari hasil analisis yang dilakukan, histamin yang berada pada rentang berpeluang toksik atau bahkan toksik. Hasil analisis kadar histamin pada perlakuan waktu penyimpanan 0 jam, 1 jam, 3 jam, 4 jam, 5 jam dan 6 jam masih

berada dibawah batas kadar histamin, sehingga masih aman dan layak untuk dikonsumsi. Kadar histamin dengan perlakuan waktu 7 jam dan 24 jam berada di atas batas yaitu  $>100$  mg/kg dimana kadarnya itu berada pada rentang berpeluang toksik hingga toksik. Yang artinya ikan yang telah mati dan dikonsumsi diatas 7 jam penyimpanan sebaiknya tidak dikonsumsi karena dapat menghasilkan reaksi alergi seperti mual, muntah, gatal-gatal. Hal ini disebabkan setelah ikan mati, sistem pertahanan tubuh ikan tidak bisa melindungi dari serangan bakteri dan bakteri pembentuk histamin mulai tumbuh.

