

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 JENIS PENELITIAN

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian secara deskriptif, yaitu pencarian fakta dan interpretasi yang tepat. Untuk mengetahui kadar histamin pada produk ikan tuna di wilayah Denpasar dan dibandingkan dengan persyaratan mutu yang sesuai dengan Standar Nasional Indonesia (SNI).

3.2 WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari tahun 2024 bertempat di Laboratorium kimia PT. Seafood Inspection Laboratory, Denpasar Selatan, Kota Denpasar, Provinsi Bali.

3.3 ALAT DAN BAHAN

3.3.1 Alat

Dalam proses penelitian ini adapun peralatan yang digunakan, meliputi: timbangan digital (SF-400C 500g 0,01g), plastik wadah sampel, botol plastik 100 mL wadah ekstraksi sampel, gunting (joyko), gelas plastik, talenan plastik, gilingan kayu, gelas ukur 1000 mL (*pyrex*), botol plastik 1 liter wadah PBS dan *Wash buffer*, tabung corning 15 mL, *pipette* 10 mL (*Thermo Scientific Finnpiette F1*), *pipette tips* 10 mL, timer digital, botol cuci wadah *wash buffer* (botol saos bening 650 mL), tisu (*livi*), *ELISA Reader* (*stat-fax 4700 microwell reader*), *well holder* (*Neogen*), kapas, dan *syringe* (10 mL).

3.3.2 Bahan

Bahan penelitian yang digunakan meliputi: *Veratox Qualitative Histamin Test Tuna Pack* (Cat. No#9506 Neogen Corporation), Ikan tuna bentuk loin dari perusahaan X, Akuades.

3.4 VARIABEL PENELITIAN

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Ikan Tuna bentuk loin yang diujikan di PT Seafood Inspection Laboratory.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah kadar histamin yang diuji di PT Seafood Inspection Laboratory.

3.5 DEFINISI OPERASIONAL

Tabel 3.1 Definisi operasional variabel

| Variabel | Definisi | Cara Ukur | Hasil Ukur | Skala Data |
|----------------|---|---|--|------------|
| Ikan Tuna | Ikan tuna adalah salah satu sampel yang diuji di PT Seafood | Penimbangan | Dalam satuan gram | Nominal |
| Kadar Histamin | Kadar histamin pada ikan tuna bentuk loin merupakan salah satu parameter yang diuji di PT Seafood Inspection Laboratory | Diuji dengan menggunakan metode ELISA dan diukur dengan ELISA <i>Reader</i> | Kadar histamin tidak lebih dari 100 mg/kg menurut SNI 2729-2021 tentang Ikan Segar | Nominal |

3.6 PROSEDUR PENELITIAN

Seluruh prosedur dalam penelitian ini mengacu pada Standar Operasional Prosedur (SOP) dari PT Seafood Inspection Laboratory yang menggunakan tes kit yaitu Veratox.

3.6.1 Preparasi Sampel

Ikan tuna bentuk loin dipotong pada bagian yang memiliki banyak urat atau otot ikan sebanyak 25-35 gram dan ditempatkan pada plastik yang sudah diberi penomoran sampel. Kemudian sampel ikan dihaluskan

dengan cara digiling menggunakan gilingan kayu. Selanjutnya sampel ikan tuna yang sudah halus ditimbang kembali dengan cara komposit sebanyak 3,3 (\pm 0,2) gram tiap sampel, satu komposit sampel terdiri dari 3 sampel. Sampel ikan yang sudah ditimbang komposit dihomogenkan dengan cara digiling menggunakan gelas plastik sampai sampel ikan tercampur. Ikan tuna yang sudah di preparasi disimpan di dalam *chiller* dengan suhu 2°C – 8°C.

3.6.2 Ekstraksi Sampel

Ekstraksi sampel dilakukan dengan melarutkan sampel uji komposit ikan tuna sebanyak 10 gram dengan akuades sebanyak 90 mL yang sudah dipersiapkan sebelumnya, kemudian sampel dikocok dan dituang ke dalam botol plastik wadah ekstraksi, tujuan dilakukan pengocokan agar sampel uji ikan tuna tidak ada yang tertinggal di dalam plastik.

Sampel uji ikan tuna selanjutnya dihomogenkan dengan cara dikocok selama 20 detik dan didiamkan selama 5 menit, proses ini dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali. Proses penghomogenan dilakukan untuk menanggihkan jaringan ikan didalam pelarut. Setelah penghomogenan dilakukan sebanyak 3 kali sampel didiamkan selama 30 detik untuk mengendapkan jaringan ikan agar berada di dasar botol. Kemudian sampel disaring menggunakan penyaring *syringe* 10 mL yang diisi kapas dan diperoleh hasil filtrat dan residu.

Hasil filtrat diencerkan dengan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) sebanyak 10 mL yang sudah dipersiapkan di tabung *corning* dan dihomogenkan dengan cara dikocok sebanyak 3 kali. Pembuatan PBS dilakukan dengan cara melarutkan 1 *sachet* PBS dengan 1000 mL akuades.

3.6.3 Prosedur Uji

3.6.3.1 Persiapan Well

Disiapkan *red-marked mixing well* (well merah) sebanyak 6 well untuk sampel dan 5 *red-marked mixing well* untuk kontrol (0 ppm; 2,5 ppm; 10 ppm; 20 ppm; dan 50 ppm) ditempatkan di *well holder*. Disiapkan jumlah yang sama *antibody-coated well* (well putih).

3.6.3.2 Persiapan Konjugat dan Kontrol

Diambil konjugat sebanyak 100 μ L menggunakan pipet 10 mL dan dimasukkan ke dalam *mixing well* (well merah). Kemudian larutan kontrol diambil masing-masing sebanyak 100 μ L, dimulai dengan larutan kontrol dengan konsentrasi terendah yaitu 0 ppm; 2,5 ppm; 10 ppm; 20 ppm; dan 50 ppm. Kemudian diambil *pipette tips* baru untuk *mixing* masing-masing larutan. *Mixing* larutan dilakukan dengan menyedot larutan menggunakan pipet naik turun sebanyak 3 kali kemudian diambil 100 μ L dan dimasukkan ke dalam *antibody-coated well* (well putih).

3.6.3.3 Persiapan Sampel

Sampel yang sudah diencerkan dengan larutan PBS sebanyak 100 μ L ke dalam *mixing well* berisi konjugat dan dihomogenkan, kemudian diambil sebanyak 100 μ L dan dimasukkan ke *antibody-coated well* (well putih).

3.6.3.4 Inkubasi dan Pembuangan

Sampel dan kontrol didiamkan selama 10 menit pada suhu ruang yaitu 18-30°C. Selanjutnya keluarkan seluruh isi dari *antibody well*, kemudian *antibody well* diisi dengan *wash buffer* dan dibuang, dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Cairan yang tersisa di dalam *well* dikeringkan menggunakan tisu.

3.6.3.5 Reaksi Substrat dan Penghentian Reaksi

Digunakan *pipette tips* baru kemudian ditambahkan larutan substrat sebanyak 100 μ L. Dihomogenkan dengan menggeser maju mundur pada permukaan datar selama 10-20 detik kemudian didiamkan pada suhu ruang selama 10 menit. Selanjutnya untuk menghentikan reaksi ditambahkan 100 μ L *red stop solution* dengan cara memipet naik turun sebanyak 3 kali.

3.6.3.6 Pembacaan Hasil

Pembacaan dilakukan menggunakan alat *ELISA Reader stat-fax* pada panjang gelombang 650 nm.

3.7 PENGOLAHAN, PENYAJIAN, DAN ANALISIS DATA

3.7.1 Pengolahan Data

Pengolahan data pada analisis kadar histamin diperoleh dengan menggunakan metode deskriptif kuantitatif untuk mengetahui rentang kadar histamin yang terkandung pada ikan tuna bentuk loin.

3.7.2 Penyajian Data

Data kandungan histamin pada ikan tuna disajikan dalam bentuk tabel beserta dengan kurva standar, sehingga memberikan gambaran jelas penelitian mengenai kandungan histamin pada ikan tuna bentuk loin.

Tabel 3.2 Tabel standar kontrol

| No Well | Identitas | Konsentrasi (ppm) | Absorbansi |
|---------|----------------|----------------------|------------|
| 01 | S1 (Standar 1) | | |
| 02 | S2 (Standar 2) | | |
| 03 | S3 (Standar 3) | | |
| 04 | S4 (Standar 4) | | |
| 05 | S5 (Standar 5) | | |

Tabel 3.3 Tabel hasil uji kadar histamin

| No Well | Identitas | Absorbansi | Konsentrasi (ppm) |
|---------|-------------------|------------|-------------------|
| 01 | Sampel komposit 1 | | |
| 02 | Sampel komposit 2 | | |
| 03 | Sampel komposit 3 | | |
| 04 | Sampel komposit 4 | | |
| 05 | Sampel komposit 5 | | |
| 06 | Sampel komposit 6 | | |

Pada Tabel 3.2 dituliskan S1-S5 yang menunjukkan standar kontrol secara berurutan yaitu 0 ppm, 2,5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, dan 50 ppm. Pada tabel 3.3 dituliskan nama sampel komposit secara urut dari komposit 1-6 serta ditampilkan data konsentrasi dan absorbansi dari sampel.

3.7.3 Analisis Data

Analisis data pengujian dinyatakan valid jika memiliki batas kuantifikasi yaitu 2,5-100 ppm, jika hasil yang diperoleh kurang dari 2,5 ppm maka dinyatakan $\leq 2,5$ ppm atau jika lebih dari 100 ppm maka dinyatakan ≥ 100 ppm. Pembacaan dilakukan dengan ELISA *reader Neogen Stat-fax* dengan panjang gelombang 650 nm untuk melihat kadar histamin, dan hasilnya akan dibandingkan dengan persyaratan pada SNI 2729-2021 tentang ikan segar.