BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah deskriptif. Penelitian ini menggunakan metode ELISA untuk menganalisis kadar histamin pada ikan tuna yang diujikan di PT *Seafood inspection Laboratory.*

3.2. Waktu dan Tempat

Waktu penelitian dilaksanakan pada 1 Maret hingga 19 Maret 2025 di PT *Seafood inspection Laboratory*, Denpasar, Bali.

3.3. Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ikan Tuna bentuk loin yang diujikan di PT *Seafood inspection Laboratory*

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian adalah kadar histamin pada ikan tuna bentuk loin yang diuji di PT *Seafood inspection Laboratory*.

3.4. Populasi dan Sampel

Populasi adalah total keseluruhan sampel ikan tuna yang diuji histamin nya pada bulan Januari hingga Maret 2025, sedangkan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan tuna yang diujikan pada tanggal 07 Maret 2025.

3.5. Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Peralatan yang digunakan, meliputi : Timbangan, Penggiling adonan, Plastik wadah sampel, Gunting (Joyko), Gelas, Gelas ukur 1000 mL (Pyrex), Gelas ukur 100 mL, Tissue (Livi), Pipetor 1 mL; 20-200 µl, Pipetor multichannel, Botol cuci wadah *wash buffer*, ELISA Reader (Byonoy*), Microtiter plate*, *Microwell holder*, 3 *Reagent boat*, Botol plastik 100 Ml, Filtrat tube, Pipet tips 1 mL; 200 µl, *Conical Tube*, Film Penyegel dan *Timer*

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan, meliputi : Sampel ikan tuna, Akuades, *Bio-shield* ELISA Test kit meliputi *standart, Detection Solution, Dilution Buffer, Wash Buffer, TMB Subtrate,* dan *Stop Solution* (Cat No. B60576**).**

3.6. Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Data
Ikan Tuna	Ikan tuna bentuk loin yang diujikan di PT *Seafood Inspection Laboratory* pada bulan Maret 2025	Penimbangan	Dalam Satuan gram	Nominal
Kadar Histamin	Kadar histamn 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 *Reader*	Kadar *histamine* tidak lebih dari 100 mg/kg menurut SNI 2729-2021 tentang ikan Segar	Nominal

3.7. Prosedur Penelitian

Seluruh prosedur pada penelitian ini mengacu pada Standar Operasional Prosedur (SOP) dari PT *Seafood Inspection Laboratory* yang menggunakan tes kit yaitu *Bio-shield* dengan Metode Elisa.

3.7.1 Preparasi Sampel

Ikan tuna loin (bentuk saku dan steak) dipotong pada bagian yang memiliki banyak urat atau otot ikan sebanyak 30 gram untuk ikan berukuran kecil dan 35 gram untuk ikan berukuran besar, dan

ditempatkan pada plastik yang sudah diberi penomoran sampel. Kemudian sampel ikan dihaluskan dengan cara menggiling dengan gilingan kayu. Selanjutnya diambil 3 plastik sampel ikan tuna. Ketiga sampel dalam plastik tersebut kemudian masing - masing diambil sebanyak 3,3 (± 0,2) gram untuk dibuat komposit. Sehingga satu komposit terdiri dari 3 sampel ikan tuna. Berat komposit yang didapatkan sebanyak ± 10 gram, kemudian ditimbang kembali untuk didapatkan komposit akhir sebanyak ± 5 gram. Sampel ikan yang sudah ditimbang dihomogenkan dengan cara digiling dengan gelas plastik sampai sampel ikan tercampur. Ikan tuna yang sudah dipreparasi disimpan di dalam *chiller* dengan suhu 2°C - 8°C.

3.7.2 Pembuatan *Dilution Buffer*

Pembuatan *dilution buffer* dilakukan dengan menyiapkan 1 liter larutan Phosphate Buffered Saline (PBS) dalam wadah steril, kemudian ditambahkan surfaktan non-ionik sebanyak 0,5–1 mL. Selanjutnya, Bovine Serum Albumin (BSA) ditambahkan sebanyak 1-10 gram per liter. Setelah semua komponen tercampur dan larut sempurna, larutan disimpan pada suhu 2–8 °C dan dapat digunakan hingga satu minggu tergantung pada tingkat sterilitasnya (Crowther, 2009).

3.7.3 Pembuatan *Detection Solution*

Pembuatan *detection solution* dilakukan dengan mengencerkan antibodi konjugat (antibodi anti-histamin yang dikonjugasi dengan HRP (Horseradish Peroxidase)) menggunakan Phosphate Buffered Saline (PBS) atau buffer Tris dengan pH 7,2–7,4. Setelah itu, ditambahkan Bovine Serum Albumin (BSA) sebanyak 1 gram per liter. Jika larutan akan disimpan lebih lama, sodium azide ditambahkan sebanyak 0,01–0,05 gram per 100 mL sebagai antimikroba. Seluruh komponen dicampur perlahan dan disimpan pada suhu 2–8°C serta dilindungi dari cahaya. (Engvall, 1971).

3.7.4 Pembuatan *Wash Buffer*

Pembuatan *wash buffer* dengan cara menuangkan akuades sebanyak 950 ml menggunakan gelas ukur 1000 mL. Setelah itu tuang

1 botol *wash buffer* (50 mL) ke dalam gelas ukur yang sudah berisi akuades. Homogenkan larutan dengan cara dikocok hingga larut.

3.7.5 Pembuatan *TMB Substrat*

Pembuatan *TMB (Tetramethylbenzidine)* substrat dilakukan dengan terlebih dahulu menyiapkan buffer asetat 0,1 M (pH ±4,0). Buffer asetat dapat dibuat dengan mencampurkan 5,72 mL asam asetat glasial (CH_3COOH) dengan 100 mL larutan natrium asetat 0,1 M, kemudian diencerkan hingga volume 1 liter menggunakan aquadest, dan disesuaikan pH-nya hingga mencapai pH 4,0 menggunakan NaOH atau HCl jika diperlukan (Lequin, 2005). Setelah buffer siap, *TMB (Tetramethylbenzidine)* dilarutkan ke dalam buffer tersebut dengan konsentrasi 0,4 mg/mL, lalu ditambahkan hidrogen peroksida (H_2O_2) sebanyak 0,01–0,02 mL per 100 mL larutan (setara dengan konsentrasi akhir 0,01–0,02%). Karena TMB sangat sensitif terhadap cahaya dan oksidasi, larutan substrat ini disimpan dalam botol berwarna gelap dan ditempatkan pada suhu 2–8°C. (Lequin, 2005).

3.7.6 Pembuatan *Stop Solution*

Pembuatan stop solution dilakukan dengan mencampurkan 5,6 mL asam sulfat pekat (98%) secara perlahan ke dalam 100 mL aquadest sambil diaduk dan didinginkan. Kemudian larutan disimpan dalam botol tertutup rapat dan diberi label bahaya (Thermo FisherScientific, 2020).

3.7.7 Ekstraksi Sampel

Ekstraksi sampel dilakukan dengan cara melarutkan sampel uji komposit ikan tuna sebanyak 5 gram yang telah dihomogenkan ditambahkan 95 ml akuades ke dalam plastik. Setelah itu, dituangkan ke botol plastik, kemudian botol ditutup rapat dan dikocok selama 1 menit hingga larut. Selanjutnya, botol dibiarkan selama 30 detik Agar jaringan ikan terendapkan di dasar botol secara sempurna.. Setelah endapan terbentuk, ekstrak diambil sebanyak 100 µl dan dicampurkan dengan 900 µl *dilution buffer* ke dalam *filtrate tube* dan menjadi larutan sampel.

3.7.8 Persiapan *Well*

Disiapkan *Dilution Microwell (hijau)* sebanyak 41 untuk sampel dan 5 *Dilution Microwell* untuk standar (0 ppm; 5 ppm; 25 ppm; 50 ppm; dan 100 ppm) ditempatkan di *well holder*. Disiapkan jumlah yang sama *antibody-coated well* (*well* putih).

3.8. Prosedur uji

3.8.1 Persiapan Sampel dan Standard

Diambil *Detection Solution* sebanyak 100 µl ditambahkan ke setiap *Dilution Microwell (hijau).* Kemudian larutan standar diambil masing-masing sebanyak 100 µL, dimulai dengan dengan larutan standar dengan konsentrasi terendah yaitu yaitu 0 ppm; 5 ppm; 25 ppm; 50 ppm; dan 100 ppm. Kemudian menggunakan pipet dengan tips baru untuk masing-masing *well*, untuk tiap larutan sampel yang telah disiapkan ditambahkan ke *dilution well* yang berisi *HA Detection Solution*, lalu dicampur menggunakan mikro pipet dengan cara menaik turunkan sebanyak 5 kali. Campuran tersebut kemudian dipindahkan sebanyak 100 µl ke *antibody-coated well* (*well* putih). Setelah dipindahkan ke *antibody-coated well* (*well* putih) ditutup dengan film penyegel.

3.8.2 Inkubasi dan Pembilasan

Sampel dan standard diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Setelah itu, film penyegel dilepas dan proses pencucian dilakukan dengan membuang cairan di tiap *well*, kemudian mengetuk pelat secara terbalik di atas tisu. *Wash buffer* dituangkan ke tiap *well* menggunakan botol pencuci, pelat digoyangkan secara manual selama beberapa detik, dan cairan dibuang. Proses ini diulangi sebanyak 3 kali lagi, dengan memastikan *well* tidak dibiarkan terlalu kering di antara setiap langkah.

3.8.3 Reaksi Substrat dan Penghentian Reaksi

Digunakan *pipette tips* baru kemudian ditambahkan larutan *TMB substrat* sebanyak 100 µL. dihomogenkan dengan menggeser maju mundur pada permukaan datar selama beberapa detik kemudian ditutup kembali dengan film penyegel dan didiamkan pada suhu ruang selama

10 menit. Setelah 10 menit, selanjutnya untuk menghentikan reaksi setelah terjadi perubahan warna, ditandai dengan warna biru, selanjutnya ditambahkan 100 µL *stop solution*. Setelah itu dilakukan pembacaan menggunakan ELISA *Reader (Byonoy)*.

3.8.4 Pembacaan Hasil

Pembacaan dilakukan menggunakan alat ELISA *Reader (Byonoy*) dengan panjang gelombang 450 nm.

3.9. Pengelolahan, Penyajian Dan Analisis Data

3.9.1 Penyajian Data

Data kandungan histamin pada ikan tuna disajikan dalam bentuk table beserta dengan kurva standar.

Tabel 3. 2 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 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		
..	…		
41	Sampel komposit 41		

Pada tabel 3.2 dituliskan S1-S5 yang menunjukan standar kontrol secara berurutan yaitu 0 ppm, 5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, dan 100 ppm.

Pada Tabel 3.3 dituliskan nama sampel komposit secara urut dari komposit 1-41 serta ditampilkan data konsentrasi dan absorbansi dari sampel.

3.9.2 Pengelolaan Data

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

3.10. 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 hasil dinyatakan $\leq$ 2,5 ppm. Pembacaan dilakukan dengan ELISA Reader (Byonoy) dengan panjang gelombang 450 nm dan sambungkan pada komputer, Evaluasi dilakukan menggunakan software Prognosis-Data-Reader dengan mentransfer nilai data (absorbansi) setelah pengukuran. untuk melihat kadar histamin, dan hasilnya akan dibandingkan dengan persyaratan ada SNI 2729-2021 tentang ikan segar.