

PEMBUATAN TES KIT HISTAMIN DENGAN PEMBENTUKAN SENYAWA KOMPLEKS MN(II), 5-FLUOROURASIL DAN ALIZARIN RED S

HISTAMINE TEST KIT FORMATION FROM MANGANASE (II), 5-FLUOROURACIL AND ALIZARIN RED S COMPLEX COMPOUND

Hijriati Sholehah* dan Hismi Susane

Program Studi S1 Teknik Lingkungan, Sekolah Tinggi Teknik Lingkungan Mataram, Mataram, Indonesia

*Email: hijriati.chemist@gmail.com

Diterima: 7 Desember 2019. Disetujui: 8 Januari 2020. Dipublikasikan: 2 Maret 2020

Abstrak: Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan histamin melalui pembentukan senyawa kompleks dengan pereaksi 5-fluorourasil, ion logam Mn(II) dan alizarin red S. Jenis penelitian ini adalah eksperimen laboratorium. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Ikip Tahun 2019. Hasil penelitian menunjukkan bahwa Tes Kit yang dibuat dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan histamine secara kualitatif dapat dilihat berdasarkan perubahan warna yang terbentuk pada senyawa kompleks Mn(II)-His-5FU-ARS yang dilihat dari adanya pergeseran panjang gelombang maksimum yang dihasilkan. Pembuatan tes kit histamin dibuat dengan melakukan variasi konsentrasi 10-100 ppm dengan interval 10 ppm pada kondisi optimum dan dapat digunakan untuk membuat komparator warna larutan. Selanjutnya dilakukan uji validitas metode dengan membuat Kurva standar histamin yang memberikan persamaan regresi $y = 0.001x + 0.3364$ dengan koefisien korelasi (r^2) = 0.9972. berdasarkan uji validitas metode diperoleh nilai akurasi berada dalam rentang 95,0-106% dan hasil uji tes kit pada sampel ikan tuna menunjukkan bahwa tes kit histamin yang dibuat memiliki nilai akurasi yang baik karena nilai rata-rata *recovery* sebesar 96%.

Kata Kunci: Tes kit, Histamin, Mn(II), 5-Fluorourasil, Alizarin Red S

Abstract: This research aims to detect the presence of histamine by forming complex compounds of 5-fluorouracil, Mn (II) metal ions and alizarin red S reagents. This type of research is a laboratory experiment. This research was conducted at the Ikip Chemistry Laboratory in 2019. The results showed that the Test Kit that was made could be used to detect the presence of histamine determining the existence of histamine qualitatively viewable color formed based on complex compounds of Mn(II)-His-5FU-ARS seen from the shift in wavelength of maximum generated.. The making of the histamine test kit is made by varying the concentration of 10-100 ppm at 10 ppm intervals under optimum conditions and can be used to make a color comparator solution. Then the method validity test is done by making a standard histamine curve that gives a regression equation $y = 0.001x + 0.3364$ with a correlation coefficient (r^2) = 0.9972. Based on the validity test method, the accuracy value is in the range of 95.0-106% and the results of the test kit on tuna samples indicate that the histamine test kit made has a good accuracy value because the average recovery value is 96%.

Keywords: Histamine; 5-fluorouracil; Manganase (II); Alizarin red S; Test Kit

PENDAHULUAN

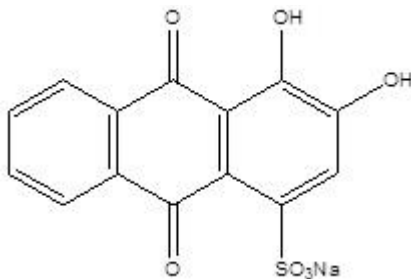
Histamin adalah salah satu komponen dari grup amina biogenik dan terdapat pada beberapa bahan pangan seperti ikan, produk ikan olahan, daging, anggur, keju dan lain-lain. Keberadaan histamin pada bahan pangan menandakan tingkat kemunduran mutu bahan pangan tersebut. Jika manusia mengkonsumsi bahan pangan yang mengandung histamine dalam jumlah besar akan menyebabkan keracunan. Tingkat keparahan gejala keracunan histamin bervariasi tergantung pada jumlah histamin yang tertelan dan sensitivitas individu terhadap histamine [1][8]. Efek yang dapat ditimbulkan oleh histamin cukup berbahaya, sedangkan histamin sering kali terdeteksi dalam berbagai jenis pengolahan ikan tuna. Sehingga, untuk mencegah keracunan yang ditimbulkan akibat mengkonsumsi ikan yang mengandung histamin,

FDA telah menetapkan ambang batas bahaya dan program titik control kritis untuk histamin 5 mg/100 g (50 ppm) pada golongan ikan scromboid (seperti, tuna, mackerele, sarden dan mahimahi). Oleh karena itu, monitoring terhadap kadar histamine pada bahan pangan sangat diperlukan untuk mencegah alergi histamine.

Metode standard untuk mendeteksi kandungan histamine seperti spektrofotometri UV-Vis. Akan tetapi teknik ini bersifat rumit dan membutuhkan keahlian khusus dalam pengoperasian alat, pretreatment yang harus sangat berhati-hati, membutuhkan waktu yang relatif lama dan tidak dapat diaplikasikan untuk analisis lapangan. Metode alternatif yang sesuai untuk digunakan dilapangan adalah test kit. Tes kit histamine merupakan suatu kit pereaksi yang

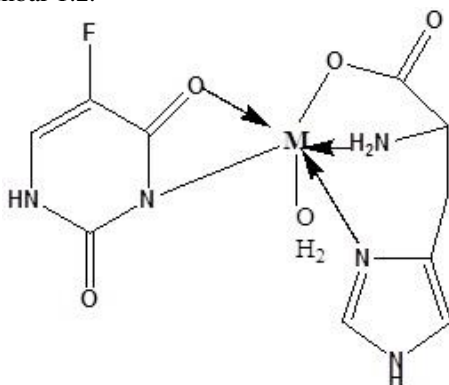
mudah digunakan untuk mengetahui konsentrasi histamine pada suatu sampel yang didasarkan pada pembentukan warna yang proporsional terhadap konsentrasi dan sangat mudah digunakan oleh berbagai kalangan.

Pada penelitian ini tes kit histamine dibuat berdasarkan pembentukan senyawa kompleks Mn(II)-5-fluorourasil-alizarin. Pereaksi alizarin *red S* merupakan turunan antrakuinon yang telah digunakan secara luas pada kimia analitik terutama sebagai agen pengkhelet dan juga sebagai kromofor. Alizarin *red S* akan bereaksi dengan berbagai macam ion logam [2] Alizarin *red S* dapat mengikat ion logam dan struktur Alizarin *red S* dapat membentuk cincin kompleks dengan ion logam [3]. Struktur Alizarin *red S* ditunjukkan pada Gambar 1.1



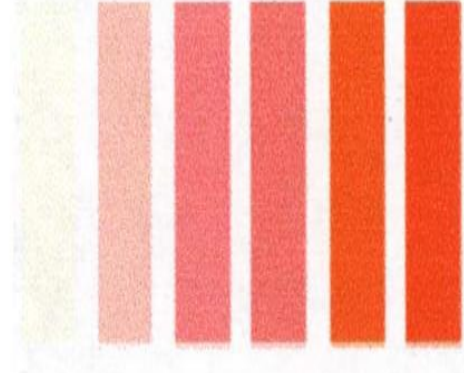
Gambar 1.1. Struktur Alizarin *red S* [4]

Senyawa 5-fluorourasil (5FU) merupakan ligan heterosiklik yang memiliki gugus aromatik dan atom N sebagai donor elektron, sehingga umumnya dapat membentuk kompleks bidentat atau polidentat. Senyawa 5FU merupakan suatu molekul yang dapat berikatan dengan ion logam seperti golongan ion logam M(II) karena adanya atom C₂ dan C₄ dari oksigen karbonil sebagai situs yang dapat mengikat serta dapat terdeprotonasinya N₁ dan N₃ tersebut. Dua atom oksigen karbonil membuat sisi ikatan ligan lemah, tetapi jika posisi pengikatannya sesuai maka ligan dan logam akan mengikat pada sisi utama dengan membentuk ikatan ligan yang kuat terutama dengan ion logam M(II) [5]. Formasi ikatan kompleks antara 5FU, histidin dan ion logam M(II) ditunjukkan pada Gambar 1.2.



Gambar 1.2 Formasi ikatan pada kompleks 5-fluorourasil-M(II)-histidin

Histamin memberikan intensitas warna yang berbeda pada enam konsentrasi yang berbeda (0, 5, 10, 20, 30, dan 50 µg/mL) seperti yang terlihat pada Gambar 1.3. Metode ini menunjukkan *recovery* sebesar 98%, dengan batas deteksi dan batas kuantisasi sebesar 1 mg/100 g ikan.



Gambar 1.3. Acuan skala warna untuk histamin [6]

Histamin dapat bereaksi dengan logam tertentu karena molekul histamin adalah molekul yang berpotensi membentuk kompleks bidentat, pembentukan kompleks dengan kation bivalen melalui N-imidazol dan N-amino. Pembuatan tes kit ini berbasis pada kondisi penelitian sebelumnya yang meliputi panjang gelombang 534 nm, pH 9, waktu kestabilan kompleks 10 menit dan konsentrasi larutan pereaksi 5-fluorourasil, ion logam Mn(II) dan alizarin *red S* sebesar 1×10⁻³M. Penelitian ini diharapkan dapat mengetahui konsentrasi histamin yang dapat digunakan sebagai komparator warna larutan serta aplikasi tes kit histamine pada sampel ikan yang divalidasi dengan membandingkan hasilnya dengan metode spektrofotometri UV-Vis untuk mengetahui keakuratan tes kit yang dibuat.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium IKIP Mataram. Jenis penelitian eksperimental. Metode penelitian yang dilakuakn yaitu :

Pembuatan larutan Histamin 100 ppm

Ditimbang sebanyak 0,0100 gram histamin, dilarutkan dengan metanol dalam gelas beker 50 mL. Larutan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL, ditambahkan metanol sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

Penentuan variasi konsentrasi larutan histamine

Larutan histamine dengan variasi konsentrasi 10-100 ppm dengan interval 10 dan variasi konsentrasi 10-150 ppm dengan interval 10

ppm diambil 1 ml dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah larutan pereaksi 1 ml larutan 5-fluorourasil (5FU) 0,001, 1 ml ion logam Mn(II) 0,001 dan alizarin red S (ARS) 0,001 diencerkan dengan aquades hingga volume akhir 10 ml. Larutan ini dikocok, dan dibiarkan selama pembentukan kompleks optimum dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum (534 nm).

Pembuatan komparator warna larutan

Pembuatan komparator warna larutan dilakukan dengan menggunakan cara yang sama dengan penentuan variasi konsentrasi histamin, namun setelah dibiarkan selama 10 menit warna yang terbentuk segera difoto.

Pengukuran kadar histamin pada sampel ikan tuna

Preparasi sampel

Sampel daging ikan tuna ditimbang sebanyak 5,000 gram, kemudian diblender sampai halus. Histamin diekstrak dari jaringan daging sampel ikan tuna dengan menggunakan pelarut metanol. Daging ikan tuna yang sudah dihaluskan ditambahkan dengan 20 mL metanol kemudian disentrifugasi pada 5300 rpm selama 20 menit, kemudian bagian larutan (supernatan) yang diperoleh digunakan untuk analisis selanjutnya.

Analisis histamin pada ikan tuna dengan metode adisi standar

Disiapkan 4 buah labu ukur 10 mL, labu ukur 1 diisi dengan 1,0 mL filtrat histamin dari sampel daging ikan tuna ditambahkan dengan 1,0 mL larutan Mn(II) 1×10^{-3} M, 1,0 mL 5FU 1×10^{-3} M, 1,0 mL ARS 1×10^{-3} M dan 1,0 mL larutan bufer pH 9. Untuk labu ukur 2, 3, dan 4 diberikan perlakuan yang sama dengan labu ukur 1, namun dilakukan penambahan histamin standar dengan konsentrasi yang berbeda untuk setiap labu ukur, histamin 50 ppm untuk labu ukur 2, histamin 90 ppm untuk labu ukur 3 dan histamin 150 ppm untuk labu ukur 4. Masing-masing larutan diencerkan dengan aquades hingga tanda batas dan dihomogenkan. Di diamkan selama 10 menit kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 534 nm.

Penentuan histamin pada sampel ikan tuna dengan tes kit histamine

Labu ukur 1 diisi dengan 1,0 mL filtrat histamin dari sampel daging ikan tuna dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 1,0 mL larutan Mn(II) 1×10^{-3} M, 1,0 mL 5FU 1×10^{-3} M, 1,0 mL ARS 1×10^{-3} M dan 1,0 mL larutan bufer pH 9, diencerkan sampai tanda batas, dibiarkan selama waktu pembentukan kompleks optimum, kemudian diukur

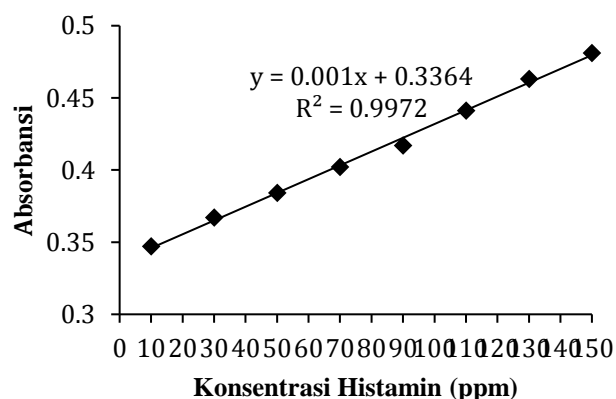
absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 534 nm.

Penentuan histamine pada sampel ikan tuna dengan tes kit histamine

Sampel diambil 1,0 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 1,0 mL larutan Mn(II) 1×10^{-3} M, 1,0 mL 5FU 1×10^{-3} M, 1,0 mL ARS 1×10^{-3} M dan 1,0 mL larutan bufer pH 9, diencerkan sampai tanda batas, dibiarkan selama waktu pembentukan kompleks optimum, diamati perubahan warna yang terjadi dan disesuaikan dengan komparator warna larutan pada tes kit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan larutan histamin dibuat berdasarkan *range* dengan konsentrasi 10-150 ppm dengan interval 20 ppm. Tujuan pembuatan kurva standar histamin untuk memperoleh persamaan larutan standar yang nantinya digunakan untuk penentuan kadar sampel. Kurva standar dibuat dari rentang konsentrasi histamin 10 ppm, 30 ppm, 50 ppm, 70 ppm, 90 ppm, 110 ppm, 130 ppm dan 150 ppm, alasan pemilihan rentang konsentrasi tersebut karena kadar aman histamin menurut SNI nomor 01-4110.1-2006 yang terkandung dalam ikan tuna adalah 100 ppm, sedangkan menurut FDA ambang batas aman histamin pada ikan tuna 50 ppm. Data hasil absorbansi larutan standar histamin disajikan pada kurva hubungan antara konsentrasi histamin dengan absorbansi senyawa kompleks Mn(II)-His-5FU-ARS ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Kurva hubungan antara konsentrasi histamin dengan absorbansi Mn(II)-His-5FU-ARS

Dari kurva dan Gambar 2, diperoleh persamaan regresi liniernya $y = 0,001x + 0,3364$ dengan koefisien korelasi sebesar $r = 0,997$. Kurva standar ini selanjutnya digunakan untuk menentukan tingkat ketepatan metode yang digunakan.

Penentuan ketepatan (Accuracy)

Ketepatan (*accuracy*) adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya[7]. Nilai akurasi metode analisis larutan histamin dan rentang keberterimaan nilai akurasi, dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Data ketepatan standar histamin

Konsentrasi Sebenarnya (ppm)	Konsentrasi terukur (ppm)	Akurasi(%)		
		Ha	A	OAC[3]
10	1	10	80	
50	0,6	6	-110	
50	5	4	95	
50	7,6	2	95	90
50	1	1	95	90
50	04,6	0	-107	

Berdasarkan Tabel 2. nilai akurasi penelitian ini untuk konsentrasi 10 ppm masih berada dalam rentang keberterimaan (*mean recovery*) yaitu 80-110%, maka dapat disimpulkan bahwa metode ini mempunyai ketepatan (*accuracy*) yang baik[7].

Penentuan Kadar Histamin pada Sampel Ikan Tuna dengan Metode Adisi Standar

Analisis histamin dilakukan pada ikan tuna yang diperoleh dari pasar Kebon Roek Ampenan, Nusa Tenggara Barat. Ekstraksi dilakukan dengan metode konvensional (ekstraksi biasa). Tujuan ekstraksi untuk memperoleh analit yang diharapkan. Hasil analisis menggunakan metode spektrofotometri dengan penambahan reagen ARS, Mn(II) dan 5FU menunjukkan hasil yang positif (terdeteksi histamin), hal ini ditunjukkan dengan adanya perubahan warna pada saat sampel direaksikan dengan reagen 5FU, ARS dan logam Mn(II) pada pH 9. Hasil reaksi ditunjukkan pada gambar 3.



Gambar 3. Hasil reaksi reagen 5FU, ARS dan logam Mn(II) dengan histamine

Untuk menguji metode yang diusulkan, akurasi dan presisi lebih lanjut dipastikan dengan

melakukan perhitungan *recovery* pada tiga konsentrasi histamin yang berbeda dengan menggunakan metode adisi standar. Konsentrasi histamin yang ditambahkan 50 ppm, 90 ppm dan 150 ppm. Hasil *recovery* yang diperoleh dari metode yang diusulkan dengan menggunakan adisi standar ditunjukkan pada Tabel 3.

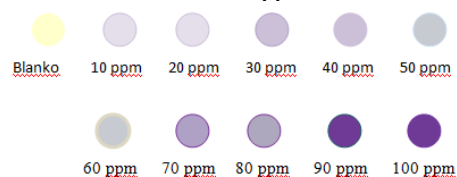
Tabel 3. *Recovery* dari metode yang diusulkan dengan menggunakan adisi standar

No	Konsentrasi awal histamin (ppm)	Penambahan histamin (ppm)	Konsentrasi histamin terukur (ppm)	Recovery (%)
1	10,6	50	57,6	94
2	17,6	90	100,6	92,22
3	18,6	150	171,6	102
Rata-rata				96

Berdasarkan Tabel 3. diperoleh *recovery* untuk konsentrasi 50, 90 dan 150 ppm berturut-turut sebesar 94%, 92,22% dan 102%. Sedangkan *recovery* rata-rata 96%, dimana dalam penelitian ini *recovery* yang dihasilkan masih berada pada rentang keberterimaan (*mean recovery*) yaitu 90-107%, maka dapat disimpulkan bahwa metode ini mempunyai ketepatan (*accuracy*) yang baik[7]. Sehingga dapat disimpulkan bahwa tes kit yang dibuat dengan menggunakan adisi standar dapat diaplikasikan pada sampel ikan tuna karena memiliki *recovery* yang baik karena masih berada dalam rentang keberterimaan yang diperbolehkan.

Pembuatan komparator warna larutan

Pembuatan komparator warna bertujuan untuk membandingkan antara intensitas warna proporsional terhadap konsentrasi histamine. Komparator warna pada tes kit ini dibuat dengan variasi konsentrasi 10-100 ppm dengan interval 10 ppm. Adapun tujuan pembuatan komparator warna sebagai alat bantu untuk menentukan konsentrasi histamin pada sampel secara langsung dengan hanya dilihat secara visual. Gambar 3. Menunjukkan komparator warna larutan Mn(II)-His-5Fu-Alizarin dengan variasi konsentrasi 10-100 ppm.



Gambar 4. Komparator warna larutan histamin dengan konsentrasi 10-100 ppm

Berdasarkan gambar 4. komparator warna larutan dapat mendeteksi konsentrasi histamin mulai dari 10 ppm, meskipun pada konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm dan 40 ppm tidak terlihat perbedaan yang signifikan secara visual. Namun, pada konsentrasi 10 ppm histamin sudah dapat terdeteksi secara visual karena terjadi perubahan warna jika dibandingkan dengan blanko. Sehingga komparator warna pada tes kit ini dapat digunakan sebagai pembandingan antara intensitas warna sampel dengan konsentrasi histamin pada ikan tuna yang ditunjukkan pada gambar 4.

KESIMPULAN

Tes kit histamin melalui pembentukan senyawa kompleks menggunakan pereaksi 5-fluorourasil, ion logam Mn(II) dan alizarin red S dapat mendeteksi histamin pada ikan Tuna berdasarkan uji validitas metode diperoleh nilai akurasi berada dalam rentang 95,0-106% dan hasil uji tes kit pada sampel ikan tuna menunjukkan bahwa tes kit histamin yang dibuat memiliki nilai akurasi yang baik karena nilai rata-rata *recovery* sebesar 96%.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Oliveira, R. B. A., Evangelista, W. P., Sena, M. J., & Gloria, M. B. A. (2012). Tuna fishing, capture and post-capture practices in the northeast of Brazil and their effects on histamine and other bioactive amines. *Food Control*, 25(1), 64-68.
- [2] Astuti, R. D., & KS, D. S. (2016). Penentuan Kadar Mineral Seng (Zn) dan Fosfor (P) dalam Nugget Ikan Gabus (*Channa striata*)-Rumput Laut Merah (*Eucheuma spinosum*). *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 4(2).
- [3] Yadav, L., Sanjay, S. S., Ankit, P., & Chattopadhyaya, M. C. (2010). Simultaneous determination of stability constant and molar absorptivity coefficient of the charge-transfer complexes of metal-alizarin red S. *Der Pharma chemica*, 2, 114-121.
- [4] Aldinomera, R., Destiarti, L., & Ardiningsih, P. (2014). Penentuan Kadar Timbal (Pb) pada Air Sungai Kapuas Secara Spektrofotometri Ultra Violet-Visible. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 3(1).
- [5] Shobana, S., Dharmaraja, J., & Selvaraj, S. (2013). Mixed ligand complexation of some transition metal ions in solution and solid state: Spectral characterization, antimicrobial, antioxidant, DNA cleavage activities and molecular modeling. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 107, 117-132.
- [6] Patange, S. B., Mukundan, M. K., & Kumar, K. A. (2005). A simple and rapid method for colorimetric determination of histamine in fish flesh. *Food control*, 16(5), 465-472.
- [7] Taverniers, I., De Loose, M., & Van Bockstaele, E. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(8), 535-552.
- [8] Sofiani, S. N. (2014). Analisis Kadar Histamin Dengan Metode Spektrofotometer Pada Ikan Tongkol (*Euthynnus Affinis*) Dengan Perlakuan Waktu Penyimpanan.