

STUDI BAKTERI PEMBENTUK HISTAMIN PADA IKAN KEMBUNG PEDAH SELAMA PROSES PENGOLAHAN

Ninoek Indriati¹⁾, Rispayeni²⁾ dan Endang Sri Heruwati¹⁾

ABSTRAK

Histamin merupakan salah satu senyawa biogenik amin yang dianggap sebagai penyebab utama keracunan makanan yang berasal dari ikan, terutama dari kelompok skombroid. Pedah adalah produk fermentasi ikan yang umumnya dibuat dari ikan kembung yang merupakan kelompok ikan skombroid, yang diketahui banyak mengandung asam amino histidin bebas, sehingga potensial menimbulkan masalah keracunan histamin. Untuk mengetahui jenis-jenis bakteri yang berperan pada pembentukan histamin pada ikan pedah, telah diisolasi bakteri pembentuk histamin selama proses pengolahan pedah, menggunakan media Niven yang sudah dimodifikasi. Isolat yang diperoleh diidentifikasi menggunakan *BIOLOG Micro Station*TM. Hasil penelitian menunjukkan terdapat 15 jenis bakteri pembentuk histamin pada bagian daging dan 11 jenis pada bagian isi perut. Selama proses fermentasi, saat histamin diproduksi secara intensif, bakteri pada ikan pedah didominasi oleh *Enterobacter spp.* dan *Staphylococcus spp.* *Enterobacter spp.* sudah berada pada bahan baku, baik pada daging maupun pada isi perut, sedangkan *Staphylococcus spp.* merupakan bakteri yang mengkontaminasi selama proses pengolahan.

ABSTRACT: Study on histamine producing bacteria from chubmackerel pedah during processing. By: Ninoek Indriati, Rispayeni and Endang Sri Heruwati

Histamine is a biogenic amine compound incriminated to be the main cause of seafood poisoning especially from scombroid fish. Free amino acid histidine originated from fish are susceptible to bacteria decarboxylation leading to the formation of histamine. **Pedah**, a wellknown fermented fish product usually made from chubmackerel, that belongs to scombroid fish which contain high free histidin, has high potential for the occurrence of histamine poisoning. To identify the bacteria which were responsible for histamine production in **pedah**, the bacteria was isolated during **pedah** processing using modified Niven's agar medium. Bacteria were isolated from fish flesh and gut separately, then identified using *BIOLOG Micro Station*TM. The results showed that there were 15 species of histamine producing bacteria from fish flesh and 11 species from the gut. During fermentation process, where histamine was intensively produced, **pedah** fish bacteria were dominated by *Enterobacter spp.* and *Staphylococcus spp.* *Enterobacter spp.* was originated from raw fish, both in the flesh and in the gut, while *Staphylococcus spp.* seemed to be a contaminant during processing.

KEYWORDS: histamine producing bacteria, fermented fish (pedah), histamine

PENDAHULUAN

Histamin adalah senyawa biogenik amin hasil perombakan asam amino histidin bebas yang berada dalam daging ikan. Histidin diubah menjadi histamin oleh enzim histidin dekarboksilase yang dihasilkan oleh bakteri-bakteri penghasil histamin. Kasus keracunan histamin umumnya terjadi setelah memakan ikan-ikan kelompok skombroid dari famili *Scombroidae* seperti tuna, bonito dan *mackerel*. Jenis ikan ini mengandung histidin bebas dalam jumlah

besar pada jaringan dagingnya, yang pada kondisi tertentu dapat diubah menjadi histamin oleh enzim L-histidin dekarboksilase yang dihasilkan oleh bakteri (Sally et al., 1980)

Bakteri yang memiliki enzim histidin dekarboksilase, atau biasa disebut bakteri penghasil histamin, sebagian besar termasuk ke dalam famili *Enterobacteriaceae*. Diketahui banyak jenis bakteri yang mampu menghasilkan histidin dekarboksilase, seperti *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumonia*, *Hafnia alvei*, *Clostridium perfringens*, *Lactobacillus*

¹⁾ Peneliti pada Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan

²⁾ Mahasiswa Universitas Nasional Jakarta

spp., *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella spp.*, *Aeromonas spp.*, *Escherichia spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Photobacterium spp.* dan *Vibrio spp.* (Wei *et al.*, 1990).

Peda merupakan salah satu produk pengolahan ikan secara tradisional melalui proses fermentasi dengan penambahan garam. Peda dapat digolongkan sebagai ikan asin basah yang dalam pembuatannya sengaja tidak dikeringkan tetapi dibiarkan setengah kering sehingga proses fermentasi dapat berlangsung (Afrianto & Liviawaty, 1989). Pada umumnya peda dibuat dari ikan kembung. Proses pengolahan peda sangat beragam, tetapi secara garis besar sama yaitu meliputi tahap pembersihan atau pencucian, penggaraman, penjemuran dan pemeraman atau fermentasi (Sjachri & Nur 1977; Rahayu *et al.*, 1992). Pemeraman bisa berlangsung satu minggu hingga berbulan-bulan. Selama proses tersebut akan terjadi penguraian senyawa-senyawa yang terdapat pada tubuh ikan, sehingga pada akhir pengolahan didapatkan peda yang mempunyai cita rasa, warna dan tekstur yang spesifik (Rahayu *et al.*, 1992).

Ikan kembung termasuk kelompok ikan skombroid. Proses fermentasi selama pengolahan peda memberikan kesempatan pada bakteri, termasuk bakteri pembentuk histamin, untuk tumbuh dan berkembang biak. Karena itu produk peda potensial menimbulkan masalah keracunan histamin (Heruwati *et al.*, 2004).

Jumlah dan jenis bakteri yang berperan dalam proses pengolahan peda sangat bervariasi, tergantung pada tahapan proses pengolahannya, karena fermentasi berjalan secara spontan tanpa penambahan *starter*. Pada ikan kembung segar, jenis bakteri yang banyak ditemukan antara lain *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Moraxella*, *Acinetobacter* dan *Flavobacterium*. Setelah penambahan garam, hanya bakteri halotoleran dan halofilik saja yang dapat tumbuh. Jenis bakteri yang termasuk dalam kelompok ini antara lain *Halococcus*, *Flavobacterium* dan *Hallobacterium* yang sebelumnya sudah mengkontaminasi ikan maupun garam yang digunakan dalam proses pengolahan (Rahayu *et al.*, 1992). Hernandez-Herrero (1999) mengisolasi beberapa jenis bakteri halofil dan halotoleran yang menghasilkan histamin pada ikan teri asin. Tidak diketahui apakah penghasil histamin juga tumbuh selama proses pengolahan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis-jenis bakteri penghasil histamin serta melihat apakah bakteri-bakteri tersebut berasal dari ikan itu sendiri atau terkontaminasi dari luar selama proses pengolahan.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Penelitian ini menggunakan bahan ikan kembung perempuan (*Rastrelliger neglectus*) dan garam krosok yang diperoleh dari Muara Angke Jakarta. Untuk menumbuhkan bakteri penghasil histamin digunakan medium modifikasi Niven agar dengan komposisi sebagai berikut : tripton 0,1%, ekstrak khamir 0,3%, bakto agar 2,5%, L-histidin 2 HCl 2,7%, NaCl 0,5%, CaCo₃ 0,1%, dengan pH akhir 6,2 (Anggawati & McMeekin, 1987); nutrisi agar, *nutrient broth*, dan larutan garam fisiologis.

Metode

Penelitian ini terdiri dari 3 tahapan kerja yaitu: proses pembuatan peda, isolasi bakteri penghasil histamin selama proses pengolahan, dan identifikasi jenis bakteri penghasil histamin. Sebagai data penunjang dilakukan pengukuran kadar histamin dengan metode Hardy & Smith (1976). Proses pembuatan peda diawali dengan pencucian tanpa penyiangian, penggaraman dengan garam kering 30% dari bobot ikan (b/b) selama satu malam, penjemuran di bawah sinar matahari selama 7–8 jam dan diakhiri dengan pemeraman selama 6 minggu dalam wadah yang terbuat dari anyaman bambu dengan dialasi kertas koran untuk memberi kesempatan berlangsungnya proses fermentasi. Setiap 2 minggu diambil sampel untuk mengetahui perkembangan bakteri penghasil histamin maupun jumlah histamin yang terbentuk.

Bakteri dari peda diisolasi menggunakan medium modifikasi Niven agar (Anggawati & McMeekin, 1987) dengan metode sebar (Fardiaz, 1992). Pada medium ini bakteri penghasil histamin membentuk koloni berwarna putih atau krem dengan zona merah di sekelilingnya. Bakteri penghasil histamin dimurnikan menggunakan medium nutrisi agar.

Identifikasi bakteri penghasil histamin dilakukan menggunakan *Biolog Micro Station™* yang terdiri dari data base komputer, alat pengukur kekeruhan (turbidimeter), pelat sumur (*wellplate*) dengan 96 sumur yang berisi 95 macam sumber karbon dan 1 sumur berisi air sebagai kontrol (Lampiran), dan larutan pengencer. Pelat sumur ini terdiri dari 2 jenis yaitu pelat sumur GN untuk bakteri gram negatif dan pelat sumur GP untuk bakteri gram positif. Sebelum diidentifikasi, terlebih dulu dilakukan pengecatan Gram terhadap bakteri-bakteri ini untuk menentukan pelat sumur yang akan digunakan. Setelah itu dilakukan uji katalase menggunakan H₂O₂ 3%. Untuk bakteri gram positif, dilakukan juga uji oksidase menggunakan

oksidase strip. Langkah-langkah identifikasi adalah sebagai berikut: isolat bakteri yang sudah murni ditumbuhkan pada medium nutrisi agar dalam cawan petri, kemudian dipanen menggunakan kapas steril yang bertangkai panjang, dimasukkan dalam larutan pengencer hingga mencapai kekeruhan tertentu. Kekeruhan diukur menggunakan alat turbidimeter. Untuk bakteri gram negatif, kekeruhan yang diperlukan adalah 50–60%, sedangkan bakteri gram positif 20–28%. Suspensi yang diperoleh dimasukkan dalam 96 sumur yang ada dalam pelat masing-masing sebanyak 150 µL. Setelah itu pelat sumur diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24–48 jam. Hasil positif ditandai dengan warna ungu pada tiap-tiap sumur. Data yang diperoleh dimasukkan dalam data base komputer dari *Biolog Micro Station™* untuk mengetahui nama jenis bakterinya.

HASIL DAN BAHASAN

Jumlah Bakteri Penghasil Histamin

Koloni bakteri yang dianggap positif sebagai penghasil histamin adalah koloni yang membentuk zona berwarna merah muda di sekeliling koloni dengan latar belakang kuning pada medium modifikasi Niven.

Tabel 1 menunjukkan bahwa sejak sebelum diolah, pada ikan kembung segar sudah terdapat bakteri penghasil histamin, baik pada bagian daging maupun isi perutnya. Jumlah bakteri sedikit berkurang pada saat ikan digarami dan dijemur, untuk kemudian meningkat kembali pada proses fermentasi yang terjadi selama pemeraman ikan. Menurut Rahayu *et al.* (1992), penambahan garam menyebabkan hanya bakteri-bakteri yang bersifat halofilik dan halotoleran saja yang dapat tumbuh. Selain itu penggaraman menyebabkan pengurangan kadar air. Penjemuran menyebabkan berkurangnya kadar air dan aktivitas air, sehingga pada kedua tahap ini jumlah bakteri banyak berkurang. Setelah ikan diperam selama 2 minggu, jumlah bakteri penghasil histamin meningkat lagi baik pada bagian daging maupun isi perutnya, dan fenomena yang sama terjadi pada pemeraman selanjutnya. Hal ini terjadi pertama karena sifat higroskopis garam menyebabkan ikan menarik air dari sekelilingnya sehingga kadar air ikan meningkat dan memberi kesempatan bakteri untuk tumbuh. Kemungkinan kedua adalah bakteri yang tumbuh adalah jenis bakteri yang halofilik, sehingga karena suasana yang mendukung, maka ia dapat tumbuh dengan baik pada ikan yang diperam.

Tabel 1. Jumlah bakteri penghasil histamin (koloni/g).
Table 1. Number of histamine producing bacteria (colony/g)

No	Sample/Sample	Daging/Flesh	Isi Perut/Gut
1	Segar/Fresh fish	3.1x10 ⁴	3.6x10 ⁵
2	Setelah penggaraman/After salting	1.7x10 ⁴	4.0x10 ⁴
3	Setelah penjemuran/After drying	5.0x10 ³	2.1x10 ⁴
4	Fermentasi 2 minggu/2 weeks fermentation	2.2x10 ⁵	2.0x10 ⁵
5	Fermentasi 4 minggu/4 weeks fermentation	2.8x10 ⁷	1.1x10 ⁶
6	Fermentasi 6 minggu/6 weeks fermentation	7.7x10 ⁶	1.1x10 ⁶

Tabel 2. Kadar histamin selama pengolahan (mg/100 g)
Table 2. Histamine content during processing (mg/100g)

No	Sample/Sample	Daging/Flesh	Isi Perut/Gut
1	Segar/Fresh fish	11.53	31.89
2	Setelah penggaraman/After salting	13.53	38.57
3	Setelah penjemuran/After drying	13.26	42.00
4	Fermentasi 2 minggu/2 weeks fermentation	39.16	63.42
5	Fermentasi 4 minggu/4 weeks fermentation	49.35	113.33
6	Fermentasi 6 minggu/6 weeks fermentation	46.39	116.98

Produksi Histamin

Hasil analisis kadar histamin ikan peda selama pengolahan dapat dilihat pada Tabel 2.

Menurut Kim *et al.* (2003) akumulasi histamin dimulai ketika jumlah bakteri melebihi 5×10^5 kol/g. Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa jumlah tersebut tercapai setelah pemeraman selama 2 minggu. Bila dihubungkan dengan kadar histamin yang dihasilkan, terlihat bahwa pembentukan histamin secara nyata meningkat hingga 300% setelah pemeraman 2 minggu pada bagian daging, sedangkan pada isi perut peningkatan hanya sekitar 150%. Produksi histamin memang tidak selalu berkorelasi dengan jumlah bakteri penghasil histamin tetapi lebih berkaitan dengan jumlah yang mampu mensintesis histidin dekarboksilase (Bennour *et al.*, 1991). Pada isi perut peningkatan kadar histamin terjadi setelah pemeraman hingga minggu ke-6 dengan kadar yang sudah sangat tinggi, di atas 100 mg/100g. Tingginya kadar histamin pada isi perut ini sudah dimulai sejak ikan belum diolah, yaitu mencapai 31,89 mg/100g ikan. Jumlah tersebut melebihi standar FAO yaitu sebesar

20 mg/100 g (Gopakumar *et al.*, 1988; Fletcher *et al.*, 1998).

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Histamin

Dari hasil isolasi selama pengolahan, diperoleh 26 isolat bakteri penghasil histamin, 15 isolat berasal dari daging dan 11 isolat berasal dari isi perut.

Pada ikan segar, diperoleh 10 jenis bakteri yang berasal dari bagian daging dan isi perut. Dari seluruh jenis yang ditemukan tersebut, hanya *Enterobacter spp.* yang menurut Wei *et al.* (1990) dikategorikan sebagai bakteri penghasil histamin. Setelah ikan digarami, jenis bakteri yang ditemukan berbeda. Jenis-jenis bakteri yang ditemukan baik pada bagian daging maupun isi perut antara lain *Aeromonas spp.* dan *Vibrio alginolyticus*. Jenis-jenis bakteri tersebut juga ditemukan oleh Kim *et al.* (2002) yang mengisolasinya dari isi perut ikan albakor.

Jenis-jenis bakteri yang ditemukan pada bagian daging setelah ikan dijemur adalah *Aeromonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.* dan *Brevibacterium*

Tabel 3. Jenis bakteri penghasil histamin selama proses pengolahan peda kembung perempuan (*Rastrelliger neglectus*)

Table 3. Kinds of bacteria during processing of chubmackerel (*Rastrelliger neglectus*) pedah

Sample/Sample	Daging/Flesh	Isi Perut/Gut
Segar/Fresh fish	<i>Brevibacterium mcbrellneri</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>Micrococcus diversus</i> , <i>Microbacterium testaceum</i> , <i>Routella terrigena</i> , <i>Serratia rubidea</i> , <i>Streptococcus spp.</i>	<i>Carnobacterium alterfunditum</i> , <i>Corynebacterium spp.</i> <i>Enterobacter spp.</i>
Setelah penggaraman/ After salting	<i>Aeromonas spp.</i> , <i>Brevibacterium mcbrellneri</i> , <i>Corynebacterium spp.</i> , <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>V. aestuarium</i>	<i>Aeromonas spp.</i> , <i>Brevibacterium otitidis</i> , <i>Brevundimonas vesicularis</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. aestuarium</i> .
Setelah penjemuran/ After drying	<i>Aeromonas spp.</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Clostridium spp.</i>	<i>Bacillus spp.</i> , <i>Brevibacterium spp.</i>
Fermentasi 2 minggu/ 2 weeks fermentation	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
Fermentasi 4 minggu/ 4 weeks fermentation	<i>Enterobacter spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Enterobacter spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i>
Fermentasi 6 minggu/ 6 weeks fermentation	<i>Enterobacter spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Enterobacter spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i>

mcbrellneri, sedangkan dari isi perut adalah *Brevibacterium sp.* dan *Bacillus spp.* Diduga, bakteri ini berasal dari udara dan lingkungan sekitar tempat pengolahan. Bakteri-bakteri ini dikenal sebagai bakteri yang mempunyai spora sehingga tahan terhadap panas dan kekeringan (Supardi & Sukamto, 1999). Yoshinaga & Frank (1982) yang mengisolasi 134 bakteri dari ikan cakalang (*Katsuwonus pelamis*) memperoleh 18 jenis sebagai bakteri penghasil enzim histidin dekarboksilase, dan 9 jenis di antaranya adalah *Clostridium perfringens*.

Setelah ikan difermentasi selama 2 minggu, jenis bakteri yang didapat adalah *Staphylococcus sp.* baik pada bagian daging maupun isi perut. Pada minggu ke-4 dan ke-6, jenis bakteri yang ditemukan adalah *Enterobacter spp.* dan *Staphylococcus spp.* Jenis *Enterobacter* termasuk kelompok *Enterobacteriaceae* yang sering dilaporkan sebagai bakteri penghasil histamin pada ikan tuna, seperti *E. aerogenes* dan *E. cloacae* (Niven *et al.*, 1981). Sedangkan *Staphylococcus spp.* diduga merupakan kontaminasi dari pengolah, karena bakteri ini merupakan flora normal pada bagian anggota tubuh manusia seperti tangan, kuku, hidung dan mulut (Fardiaz, 1992).

Bakteri penghasil histamin yang ditemukan dalam penelitian ini sebagian besar adalah bakteri gram positif antara lain *Bacillus spp.*, *Brevibacterium mcbrellneri*, *B. otitidis*, *Clostridium spp.*, *Carnobacterium alterfunditum*, *Corynebacterium spp.*, *Microbacterium testaceum*, *Micrococcus diversus*, *Staphylococcus spp.* dan *Streptococcus spp.* Selain bakteri gram positif, pada penelitian ini juga ditemukan bakteri-bakteri gram negatif seperti *Aeromonas spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia rubidea*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio aestuarium* (Tabel 3). Jenis-jenis bakteri ini adalah jenis bakteri yang telah umum dilaporkan sebagai bakteri penghasil histamin pada ikan laut. (Niven *et al.*, 1981; Eitenmiller *et al.*, 1982; Yoshinaga & Frank, 1982; Middlebrooks *et al.*, 1988). Sedangkan jenis *Brevundimonas vesicularis* dan *Routella terrigena* belum pernah dilaporkan sebagai bakteri penghasil histamin pada ikan maupun produk perikanan.

Saat produksi histamin meningkat secara intensif, yakni pada tahap fermentasi atau selama pemeraman, bakteri yang mendominasi baik pada bagian daging maupun isi perut adalah *Enterobacter spp.* dan *Staphylococcus spp.* *Enterobacter spp.* sudah berada pada bahan baku, baik pada daging maupun pada isi perut, sedangkan *Staphylococcus spp.* merupakan bakteri yang mengkontaminasi selama proses pengolahan.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Bakteri pembentuk histamin yang telah diidentifikasi pada pengolahan peda kembang perempuan (*Rastrelliger neglectus*) berjumlah 18 jenis yang terdiri dari delapan (8) jenis berbentuk batang gram positif yaitu: *Bacillus spp.*, *Brevibacterium mcbrellneri*, *Brevibacterium otitidis*, *Brevibacterium sp.*, *Clostridium sp.*, *Carnobacterium alterfunditum*, *Corynebacterium sp.*, dan *Microbacterium testaceum*; tiga (3) jenis berbentuk kokus gram positif yaitu: *Micrococcus diversus*, *Staphylococcus spp.*, dan *Streptococcus spp.* serta tujuh (7) jenis berbentuk batang gram negatif yaitu: *Aeromonas spp.*, *Brevundimonas vesicularis*, *Enterobacter spp.*, *Routella terrigena*, *Serratia rubidea*, *Vibrio alginolyticus* dan *V. aestuarium*.
2. Bakteri penghasil histamin yang ditemukan selama proses pengolahan peda sebagian besar berasal dari ikan kembang segar yaitu *Enterobacter*, sebagian lain diduga merupakan kontaminasi dari luar selama proses pengolahan yaitu *Bacillus*, *Clostridium* dan *Staphylococcus*.
3. Produksi histamin meningkat secara intensif pada tahap fermentasi atau selama pemeraman, dan didominasi oleh *Enterobacter spp.* dan *Staphylococcus spp.* *Enterobacter spp.* sudah berada pada bahan baku, baik pada daging maupun pada isi perut, sedangkan *Staphylococcus spp.* diduga merupakan bakteri yang mengkontaminasi selama proses pengolahan.
4. Jenis bakteri pembentuk histamin pada bagian daging lebih banyak dibandingkan dengan bagian isi perut yaitu masing-masing 15 dan 11 jenis. Meskipun demikian, kadar histamin yang dihasilkan jauh lebih banyak pada isi perut dibandingkan dengan pada bagian daging, yang mengindikasikan bahwa pada bagian isi perut terdapat jenis yang sangat potensial menghasilkan histamin.
5. Untuk memastikan kebenaran hal ini, masih perlu dipelajari kemampuan dari masing-masing jenis bakteri dalam aktivitasnya membentuk histamin, sehingga diketahui jenis yang mempunyai potensi besar dalam membentuk histamin.

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, E. dan Liviawaty, E. 1989. *Pengawetan dan Pengolahan Ikan*. Kanisius, Yogyakarta. 99 pp.
- Anggawati, A.M. and McMeekin, T. 1987. *Revision of Growth Media for Histamin Producers*. ACIAR- AARD Collaboration Research Report. Research Institute for Fish Technology, Jakarta. 20 pp.

- Bennour, M., Marrakchi, A.E., Bouchriti, N., Hamama, A. and Ouada, M.E. 1991. Chemical and microbial assessment of mackerel (*Scomber scombrus*) stored in ice. *J. Food Protection*. 54: 789–792.
- Eitenmiller, R.R., Orr, J.H. and Wallis, W.W. 1982. Histamine formation in fish. Microbiological and biochemical conditions. In: Martin, G., Flick, C.E and Ward, D.R. (eds.). *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*. AVI Publishing Co. Connecticut. p. 39–50
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan 1*. Pangan dan gizi. IPB dan Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 308 pp.
- Fletcher, G.C., Summer, G. and van Veghel, P.W.C. 1998. Levels of histamine and histidine in smoked fish from New Zealand market. *J. Aqua Food Protection*. 61(8): 1064–1070.
- Gopakumar, K., Surendran, P.K. and Vijavan, P.E. 1988. *Incidence of Histamine Decarboxylating Bacteria and Histamine Level on Fish Sold in Retail Market*. 7th session of the Indo-Pacific Fishery Commission working Party on Fish Tech and marketing, FAO Bangkok.
- Hardy, R. and Smith, J.G.M. 1976. The storage of mackerel (*Scomber scombrus*) development of histamine and rancidity. *J. Sci. Food Agric*. 27: 595–599.
- Hernandez-Herrero, M.M., Roig-Sagues, A.X., Rodriguez-jeres, J.J. and Mora-Ventura, M.T. 1999. Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *J. Food Protection*. 62(5): 509–514.
- Heruwati, E.S., Sukarto, S.T. dan Syah, S.U. 2004. Perkembangan histamin selama proses fermentasi pada ikan kembung (*Rastrelliger neglectus*). *J. Penel. Perik. Indonesia*. 10(3): 47–55.
- Middlebrooks, B.I., Toom, P.M., Douglas, W.L., Harrison, R.E. and McDowell, S. 1988. Effects of storage time and temperature on the microflora and amine development in spanish mackerel (*Scomberomorus maculatus*). *J. Food Sci*. 53: 1024–1029.
- Kim, S.H., Barros-Velazquez, J., Ben-Gigrey, B., Eun, J.B., Jun, S.H., Wei, C.I. and An, H.J. 2003. Identification of the main bacteria contributing to histamine formation in seafood to ensure products safety. *J. Food Sci. Biotechnol*. 12(4): 451–460.
- Kim, S.H., Price, R.J., Morreissey, M.T., Field, K.G., Wei, C.I. and An, H. 2002. Occurrence of histamine-forming bacteria in albacore and histamine accumulation in muscle at ambient temperature. *J. Food Sci*. 67(4): 1515–1521.
- Niven, C.F. Jr., Jeffrey, M.B. and Corlett, D.A.Jr. 1981. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. *App Environ. Microbiol*. 41: 321–322.
- Rahayu, W.P., Maoen, S., Suliantari dan Fardiaz, S. 1992. *Teknologi Fermentasi Perikanan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. PAU-Pangan dan Gizi. Bogor. 74 pp.
- Sjachri, M. dan Nur, M.A. 1977. Pengolahan ikan secara tradisional (I). Pengaruh beberapa perlakuan terhadap sifat fisik dan kimia dari produk akhir pada pengolahan ikan pada cara laboratoris. *J. Teknologi Hasil Perikanan*. 2: 1–28.
- Sally, H.A., Price, R.S. and Brown, W. 1980. Histamine formation by bacteria isolated from skipjack tuna. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 46: 991–995.
- Supardi, I. dan Sukamto. 1999. *Mikrobiologi dalam Pengolahan dan Keamanan Pangan*. Alumni. Bandung. 290 pp.
- Wei, C.I., Chen, J.A., Koburger, J.A., Otwell, W.S. and Marshall, M.R. 1990. Bacterial growth and histamine production on vacuum packaged tuna. *J. Food Sci*. 55: 59–63.
- Yoshinaga, D.H. and Frank, H.A. 1982. Histamine-producing bacteria in decomposing skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *App. Environ. Microbiol*. 44: 447–452.

LAMPIRAN/APPENDIX

GN2 MicroPlate™

A1 Water	A2 α-Cyclodextrin	A3 Dextrin	A4 Glycogen	A5 Tween 40	A6 Tween 80	A7 N-Acetyl-D-Galactosamine	A8 N-Acetyl-D-Glucosamine	A9 Adonitol	A10 L-Arabinose	A11 D-Arabitol	A12 D-Cellobiose
B1 l-Erythritol	B2 D-Fructose	B3 L-Fucose	B4 D-Galactose	B5 Gentiobiose	B6 α-D-Glucose	B7 m-Inositol	B8 α-D-Lactose	B9 Lactulose	B10 Maltose	B11 D-Mannitol	B12 D-Mannose
C1 D-Melibiose	C2 β-Methyl-D-Glucoside	C3 D-Psicose	C4 D-Raffinose	C5 L-Rhamnose	C6 D-Sorbitol	C7 Sucrose	C8 D-Trehalose	C9 Turanose	C10 Xylitol	C11 Pyruvic Acid Methyl Ester	C12 Succinic Acid Mono-Methyl-Ester
D1 Acetic Acid	D2 Cis-Aconitic Acid	D3 Citric Acid	D4 Formic Acid	D5 D-Gelactonic Acid Lactone	D6 D-Galacturonic Acid	D7 D-Gluconic Acid	D8 D-Glucosaminic Acid	D9 D-Glucuronic Acid	D10 α-Hydroxybutyric Acid	D11 β-Hydroxybutyric Acid	D12 γ-Hydroxybutyric Acid
E1 p-Hydroxy Phenylacetic Acid	E2 Itaconic Acid	E3 α-Keto Butyric Acid	E4 α-Keto Glutaric Acid	E5 α-Keto Valeric Acid	E6 D,L-Lactic Acid	E7 Malonic Acid	E8 Propionic Acid	E9 Quinic Acid	E10 D-Saccharic Acid	E11 Sebacic Acid	E12 Succinic Acid
F1 Bromosuccinic Acid	F2 Succinamic Acid	F3 Glucuronamide	F4 L-Alaninamide	F5 D-Alanine	F6 L-Alanine	F7 L-Alanyl-glycine	F8 L-Asparagine	F9 L-Aspartic Acid	F10 L-Glutamic Acid	F11 Glycyl-L-Aspartic Acid	F12 Glycyl-L-Glutamic Acid
G1 L-Histidine	G2 Hydroxy-L-Proline	G3 L-Leucine	G4 L-Ornithine	G5 L-Phenylalanine	G6 L-Proline	G7 L-Pyroglytamic Acid	G8 D-Serine	G9 L-Serine	G10 L-Threonine	G11 D,L-Carnitine	G12 γ-Amino Butyric Acid
H1 Urocanic Acid	H2 Inosine	H3 Uridine	H4 Thymidine	H5 Phenylethylamine	H6 Putrescine	H7 2-Aminoethanol	H8 2,3-Butanediol	H9 Glycerol	H10 D,L-α-Glycerol Phosphate	H11 α-D-Glucose-1-Phosphate	H12 D-Glucose-6-Phosphate

FIGURE 1. Carbon Sources in GN2 MicroPlate

GP2 MicroPlate™

A1 Water	A2 α-Cyclodextrin	A3 β-Cyclodextrin	A4 Dextrin	A5 Glycogen	A6 Inulin	A7 Mannan	A8 Tween 40	A9 Tween 80	A10 N-Acetyl-D-Glucosamine	A11 N-Acetyl-β-D-Mannosamine	A12 Amygdalin
B1 L-Arabinose	B2 D-Arabitol	B3 Arbutin	B4 D-Cellobiose	B5 D-Fructose	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Gentiobiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 α-D-Glucose	B12 m-Inositol
C1 α-D-Lactose	C2 Lactulose	C3 Maltose	C4 Maltotriose	C5 D-Mannitol	C6 D-Mannose	C7 D-Melezitose	C8 D-Melibiose	C9 α-Methyl-D-Galactoside	C10 β-Methyl-D-Galactoside	C11 3-Methyl Glucose	C12 α-Methyl-D-Glucoside
D1 β-Methyl-D-Glucoside	D2 α-Methyl-D-Mannoside	D3 Palatinose	D4 D-Psicose	D5 D-Raffinose	D6 L-Rhamnose	D7 D-Ribose	D8 Salicin	D9 Sedoheptulosan	D10 D-Sorbitol	D11 Stachyose	D12 Sucrose
E1 D-Tagatose	E2 D-Trehalose	E3 Turanose	E4 Xylitol	E5 D-Xylose	E6 Acetic Acid	E7 α-Hydroxybutyric Acid	E8 β-Hydroxybutyric Acid	E9 γ-Hydroxybutyric Acid	E10 p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	E11 α-Ketoglutaric Acid	E12 α-Ketovaleric Acid
F1 Lactamide	F2 D-Lactic Acid Methyl Ester	F3 L-Lactic Acid	F4 D-Malic Acid	F5 L-Malic Acid	F6 Pyruvic Acid Methyl Ester	F7 Succinic Acid Mono-methyl Ester	F8 Propionic Acid	F9 Pyruvic Acid	F10 Succinamic Acid	F11 Succinic Acid	F12 N-Acetyl-L-Glutamic Acid
G1 L-Alaninamide	G2 D-Alanine	G3 L-Alanine	G4 L-Alanyl-Glycine	G5 L-Asparagine	G6 L-Glutamic Acid	G7 Glycyl-L-Glutamic Acid	G8 L-Pyroglytamic Acid	G9 L-Serine	G10 Putrescine	G11 2,3-Butanediol	G12 Glycerol
H1 Adenosine	H2 2'-Deoxy Adenosine	H3 Inosine	H4 Thymidine	H5 Uridine	H6 Adenosine-5'-Monophosphate	H7 Thymidine-5'-Monophosphate	H8 Uridine-5'-Monophosphate	H9 D-Fructose-6-Phosphate	H10 α-D-Glucose-1-Phosphate	H11 D-Glucose-6-Phosphate	H12 D-L-α-Glycerol Phosphate

FIGURE 1. Carbon Sources in GP2 MicroPlate