

SKRINING DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PEMBENTUK HISTAMIN YANG DIISOLASI DARI TUNA, TONGKOL, DAN CAKALANG SEGAR DI WILAYAH JAWA BARAT, DKI JAKARTA, DAN BANTEN

Screening and Identification of Histamine Producing Bacteria Isolated from Fresh Tuna and Tuna-like from West Java, DKI Jakarta, and Banten Areas

Novalia Rachmawati* dan Radesty Triwibowo

Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan,
Jl. KS Tubun, Petamburan VI, Jakarta Pusat, DKI Jakarta, 10260, Indonesia

*Korespondensi penulis : novalia.rachmawati@kkp.go.id

Diterima: 27 April 2021; Direvisi: 10 Agustus 2021; Disetujui: 12 Oktober 2021

ABSTRAK

Tuna, tongkol, cakalang (TTC) merupakan komoditas perikanan bernilai ekonomis penting yang disukai oleh banyak konsumen di Indonesia. Namun demikian, distribusi, penanganan, dan pengolahan komoditas ini masih banyak mengalami kendala, di antaranya kontaminasi bakteri pembentuk histamin (BPH) yang dapat menyebabkan akumulasi histamin dan menimbulkan kerugian kesehatan pada konsumen. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi BPH dari komoditas TTC segar yang dijual di pasar domestik, mengevaluasi profilnya, serta mengkarakterisasi kemampuan BPH tersebut dalam menghasilkan histamin. Sebanyak 93 sampel TTC diperoleh dari TPI, pasar tradisional, dan pasar modern di wilayah Jawa Barat, DKI Jakarta, dan Banten. Dari 318 isolat presumtif BPH yang ditemukan, sebanyak 59 isolat (19%) terkonfirmasi positif gen *hdc* dan di antaranya sebanyak 43 isolat dikategorikan sebagai BPH prolif. Hasil sekuensing 16S rDNA menunjukkan sebanyak 30 dari 43 isolat BPH prolif (69,8%) adalah *Morganella morganii*. Selain *M. morganii*, isolat lain yang ditemukan dari semua jenis ikan yang diamati adalah *Photobacterium damsela* (6,9%), keduanya merupakan BPH mesofilik. Isolat mesofilik lain yang teridentifikasi dari sampel TTC berasal dari genus *Klebsiella* (4,7%), *Proteus* (4,7%), *Raoultella* (4,7%), *Shewanella* (2,3%), dan *Vibrio* (6,9%). Keberadaan BPH prolif ini mengindikasikan adanya potensi akumulasi histamin pada produk akhir TTC apabila dalam penanganan dan pengolahannya tidak menerapkan sistem rantai dingin dengan benar.

KATA KUNCI : bakteri pembentuk histamin, tuna, tongkol, cakalang, pasar domestik

ABSTRACT

*Tuna and tuna-like fish are economically important and popular amongst Indonesian consumers. However, the distribution, handling, and processing of these commodities are still facing many problems, including contamination of histamine producing bacteria (HPB) which may lead to histamine accumulation and cause human adverse health effects. This study aimed to identify HPB from fresh tuna and tuna-like fish sold in domestic markets in Indonesia, evaluate their profile, and characterize their ability to produce histamine. A number of 93 fish samples were obtained from fish landing, traditional and modern fish markets in West Java, DKI Jakarta, and Banten. Of 318 presumptive HPB identified from the sample, 59 isolates (19%) were confirmed as *hdc*-gene positive with 43 isolates were categorized as prolific HPB. Bacterial identification with 16S rDNA sequencing identified 30 out of 43 (69.8%) prolific HPB as *Morganella morganii*. Besides *M. morganii*, another mesophilic HPB identified from all different type of fish was *Photobacterium damsela* (6.9%), while the remaining mesophilic HPB were identified from genus *Klebsiella* (4.7%), *Proteus* (4.7%), *Raoultella* (4.7%), *Shewanella* (2.3%), and *Vibrio* (6.9%). The presence of prolific HPB in the samples suggested that histamine accumulation in the final product is possible if cold-chain system is not properly applied during fish handling and processing.*

KEYWORDS: histamine producing bacteria, tuna and tuna like species, domestic markets

PENDAHULUAN

TTC (tuna, tongkol, cakalang) tergolong sebagai komoditas perikanan bernilai ekonomis penting dari sektor perikanan tangkap di Indonesia (KKP, 2016). Total produksi perikanan tangkap Indonesia pada tahun 2018 sebesar 7,2 juta ton dengan produksi tuna, tongkol, dan cakalang (berdasarkan perhitungan angka sementara) berturut-turut 306 ribu, 492 ribu, dan 488 ribu ton (Pusdatin KKP, 2018). Indonesia telah menjadi salah satu negara yang berkontribusi besar pada perdagangan TTC dunia dengan volume ekspor pada tahun 2017 mencapai 203 ribu ton senilai 678 juta US dollar (Widria, 2018). Di samping itu, TTC dan olahannya juga merupakan salah satu komoditas favorit yang banyak dikonsumsi masyarakat Indonesia (Virgantari, Daryanto, Harianto, & Kuntjoro, 2011) terutama di Maluku dan Sulawesi. Komoditas TTC bersama dengan komoditas ikan lainnya berperan dalam meningkatkan konsumsi ikan nasional di Indonesia.

Permasalahan mengenai tingkat mutu, kualitas, dan keamanan produk perikanan yang tidak memenuhi standar dan kontinuitas stok ikan di pasar (Wuryandani & Meilani, 2011) masih sering dihadapi, termasuk pada ikan TTC untuk pasar domestik. Kasus keracunan pangan akibat mengkonsumsi TTC dilaporkan terjadi hampir setiap tahun dari berbagai wilayah di Indonesia. Beberapa kejadian luar biasa (KLB) tersebut menyebabkan lebih dari 300 orang di Jember (Supriadi, 2020), 50 orang di Pasaman (Antara, 2020), 53 orang di Pematang (Chendaki, 2020; Suryono, 2020), dan 19 orang di Batang (Raharjo, 2020) mengalami keracunan. Salah satu penyebab keracunan pangan akibat konsumsi ikan adalah tingginya kadar histamin. Histamin merupakan hasil proses dekarboksilasi histidin pada daging ikan dengan bantuan enzim L-histidin dekarboksilase dari bakteri pembentuk histamin/BPH (FAO & WHO, 2012). Histamin memiliki ketahanan terhadap perlakuan suhu seperti pembekuan, pengeringan, pemanasan, dan lingkungan ber-pH rendah (ICMSF, 2005; USFDA, 2011; Visciano, Schirone, Tofalo, & Suzzi, 2012). Ikan dari golongan *Scombroidae* (termasuk tuna, tongkol, cakalang) serta ikan-ikan dari golongan lain seperti *Carangidae* (kue, layang, tengkek) dan *Clupeidae* (lemuru, sarden, tembang) secara alami memiliki kandungan histidin yang lebih tinggi dibanding ikan dari golongan lainnya (Visciano et al., 2012; Visciano, Schirone, Tofalo, & Suzzi, 2014).

Penanganan dan pengolahan TTC yang dilakukan secara tidak higienis serta tidak mengikuti kaidah sistem rantai dingin dapat memicu pertumbuhan BPH dan pembentukan histamin yang berlebihan pada

daging ikan (Rachmawati, 2019). Meskipun BPH merupakan bakteri yang tidak tahan panas atau tidak dapat tumbuh pada suhu beku, namun histamin yang sudah terbentuk pada daging ikan akan tetap ada selama proses pembekuan, pengolahan, atau pemasakan. Akibatnya, dapat menimbulkan risiko keracunan makanan pada konsumen (FAO & WHO, 2012; Lehane & Olley, 2000). Oleh karena itu, upaya untuk mencegah atau meminimalisir terbentuknya histamin perlu dilakukan sejak awal, seperti penerapan rantai dingin sejak ikan didaratkan hingga penanganan, pengolahan, penyimpanan, dan pendistribusian. Langkah ini dilakukan untuk menghambat pertumbuhan BPH pada ikan sehingga aktivitas dekarboksilase histidin dapat ditekan.

Isolasi BPH diperlukan sebagai upaya untuk mengetahui jenis BPH dominan yang mengkontaminasi produk perikanan di Indonesia, serta mempelajari kemampuan isolat tersebut untuk beradaptasi dan menghasilkan histamin pada kondisi penanganan dan pengolahan produk perikanan yang berbeda. Hal ini merupakan salah satu faktor penting yang diperlukan dalam studi atau kajian risiko histamin pada produk perikanan. Beberapa studi untuk mengetahui jenis BPH yang berperan dalam pembentukan histamin pada produk perikanan di Indonesia pernah dilakukan pada ikan olahan seperti pindang (Fatuni, Suwandi, & Jacoeb, 2014; Rachmawati, 2019), kembung peda (Indriati, Rispayeni, & Heruwati, 2006), serta beberapa komoditas TTC untuk ekspor yang telah mengalami proses penyimpanan pada suhu yang berbeda (Nurilmala et al., 2020; Wahyuni, 2011). Sementara itu, informasi terkait BPH pada TTC segar untuk konsumsi domestik masih sangat terbatas. Salah satu informasi yang tersedia merupakan hasil studi pada tuna mata besar yang diperoleh dari Muara Baru (Wodi, 2015). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi jenis BPH pada ikan TTC segar yang berasal dari TPI maupun pasar domestik, khususnya di wilayah Jawa Barat, DKI Jakarta dan Banten. Penelitian ini juga bertujuan untuk mengevaluasi profil BPH dan mengetahui kemampuannya dalam menghasilkan histamin. Pemilihan lokasi didasarkan pada tingginya nilai konsumsi ikan per kapita serta volume ikan TTC yang didaratkan di wilayah tersebut.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Sebanyak 93 individu ikan segar yang terdiri atas 32 ekor tuna, 36 ekor tongkol dan 25 ekor cakalang diperoleh dari TPI, pasar ikan/pasar tradisional, pasar

modern, dan *retail* di wilayah DKI Jakarta, Jawa Barat, dan Banten pada tahun 2020 (Tabel 1). Pengambilan sampel dilakukan secara acak berdasarkan ketersediaan ikan di lokasi. Suhu ikan pada saat pengambilan sampel diukur dan didokumentasikan. Selanjutnya, sampel ikan ditransportasikan ke laboratorium dengan mempertahankan suhunya kurang dari 4°C dengan cara penggantian dan penambahan es curai secara berkala dengan perbandingan berat ikan:es = 1:3.

Metode

Skrining dan isolasi BPH

Skrining dan isolasi BPH dilakukan secara bertahap berdasarkan metode dari Torido et al. (2014). Sebanyak 5 gr *edible portion* sampel diambil dari daging ikan yang telah dikomposit dan diinokulasi ke dalam 45 ml *histidine broth* (HB). Tahap pengayaan ini dilakukan selama 24-36 jam pada suhu 30°C. Kultur yang dihasilkan selanjutnya dilakukan pengayaan kembali pada media HB baru dan diinkubasi kembali pada kondisi yang sama.

Tahap berikutnya adalah langkah untuk mendapatkan koloni tipikal BPH. Sebanyak satu ose kultur dari media HB yang baru tersebut digoreskan ke permukaan media agar Niven pada cawan petri (Niven, Jeffrey, & Corlett, 1981), dan diinkubasi selama 24-36 jam pada suhu 30°C. Pengamatan koloni presuntif/tipikal yang tumbuh pada cawan petri tersebut dilakukan secara visual terhadap koloni yang berwarna ungu kebiruan dengan atau tanpa halo di

sekitar koloninya. Pada setiap sampel, sebanyak 3-5 koloni tipikal yang tumbuh pada media agar Niven diambil dan ditumbuhkan (digoreskan) kembali pada media *tryptone soy agar* (TSA) (Oxoid, Inggris) yang ditambahkan 2% NaCl (Merck, US). Koloni tunggal akan diperoleh pada cawan petri setelah media TSA diinkubasi pada suhu 30°C selama 24-36 jam. Koloni tunggal yang diperoleh selanjutnya disimpan dalam 500µl Tris-EDTA (TE) *buffer* dan kemudian disimpan pada suhu -20°C untuk digunakan pada tahap konfirmasi secara molekuler.

Konfirmasi BPH secara molekuler

Tahap konfirmasi BPH selanjutnya dilakukan secara molekuler dengan gen target *hdc* (gen yang mengekspresikan produksi l-histidin dekarboksilasi). DNA dari isolat tunggal yang diperoleh dari tahap sebelumnya (Sub bab skrining dan isolasi BPH) diekstraksi menggunakan Presto™ Mini gDNA (Geneaid, Taiwan). Pasangan primer yang digunakan adalah *hdc-F* (5'-TCH ATY ARY AAC TGY GGT GAC TGG RG-3') dan *hdc-R* (5'-CCC ACA KCA TBA RWG GDG TRT GRC C-3') yang menargetkan gen *hdc* dengan ukuran 709-bp (Takahashi, Kimura, Yoshikawa, & Fujii, 2003). Untuk kontrol internal digunakan pasangan primer universal *16s-F* (CCT ACG GGA GGC AGC AGT) dan *16s-R* (CGT TTA CGG CGT GGA CTA C) dengan target gen 16S rDNA berukuran 475-bp (Chiang et al., 2006). Sebanyak 40 µl campuran reaksi yang terdiri atas 20 µl MyTaq™ HS Mix (Bioline, AU), 2 µl masing-masing primer (10 µM *hdc-F* dan *hdc-R*; 1µM *16s-F* dan *16s-R*), 2,5-5 µl

Tabel 1. Jumlah sampel yang diambil di tiap lokasi

Table 1. The number of samples collected from each location

Lokasi Pengambilan Sampel/ Sampling Location	Jenis Ikan/Fish Species			Jumlah Sampel/ Total Sample
	Tuna/ Tuna	Tongkol/ Little tuna	Cakalang/ Skipjack	
TPI/ Fish landing site	11	5	11	27
Pasar ikan tradisional/ Traditional fish market	3	8	0	11
Pasar modern/ Modern fish market	12	6	11	29
Pengecer/Retailer	6	17	3	26
Total				93

Catatan/Notes:

- 1) Sampel beku terdiri atas 1 tuna dari pasar ikan tradisional, 2 tuna dari pasar modern, 4 tuna dan 1 cakalang dari pengecer/*Frozen samples were 1 tuna from traditional fish market, 2 tunas from modern market, 4 tunas, and 1 skipjack from retailer.*
- 2) Sampel lain diperoleh dalam kondisi segar/*The remaining fish were obtained in fresh.*

cetakan DNA dan air bebas nuclease, digunakan untuk reaksi molekuler. Kondisi *thermal cycler* diatur sebagai berikut, denaturasi awal (94°C selama 4 menit), 35 siklus amplifikasi (4°C selama 1 menit, 58°C selama 1 menit, dan 72°C selama 1 menit), serta perpanjangan akhir (72°C selama 4 menit). Produk PCR selanjutnya dielektroforesis menggunakan 1,5% gel agarose dalam 1x Tris-Borate EDTA (TBE) dengan kondisi elektroforesis pada 90V selama 50 min. Hasil elektroforesis divisualisasi menggunakan *UV transilluminator* (Biometra, Jerman).

Konfirmasi kemampuan BPH dalam menghasilkan histamin

Isolat yang terkonfirmasi positif gen *hdc* selanjutnya diuji kemampuannya dalam menghasilkan histamin. Kultur tunggal yang diperoleh dari TSA (+2%NaCl) (sub bab skrining dan isolasi BPH) ditumbuhkan dalam media HB selama 24-36 jam pada suhu 30°C. Kultur kemudian disentrifuse kecepatan 10.000 *xg* selama 2 menit. Sebanyak 1-2 ml supernatan diambil dan disaring menggunakan filter *cellulose acetate* berdiameter 13 mm dengan diameter pori 0,22 µm. Jika diperlukan, pengenceran bertingkat ekstrak kultur dilakukan menggunakan *double distilled water*.

Pengujian kandungan histamin dilakukan menggunakan MaxSignal® *Histamine Enzymatic Kit* (Perkin Elmer, US) dengan mengikuti petunjuk penggunaan kit. Kurva kalibrasi diperoleh berdasarkan pembacaan standar histamin dengan konsentrasi 0; 1; 2; 4; 8 dan 12 ppm pada panjang gelombang 450 nm. Konsentrasi histamin pada sampel dihitung menggunakan persamaan non-linear *4-parameter logistic/4PL* (Cox et al., 2004).

Identifikasi BPH dengan sekuensing

Isolat yang ditumbuhkan pada media HB dan mampu menghasilkan histamin pada konsentrasi >125 ppm, dikategorikan sebagai BPH (Bjornsdottir, Bolton, McClellan-Green, Jaykus, & Green, 2009). Isolat ini selanjutnya diidentifikasi dengan teknik sekuensing yang menargetkan gen 16S ribosomal DNA (16S rDNA). Pasangan primer yang digunakan adalah 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') dan 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Weisburg, Barns, Pelletier, & Lane, 1991) dengan kondisi *thermal cycler* yang diawali dengan denaturasi pada 95°C selama 2 menit dan diikuti 30 siklus amplifikasi (95°C selama 1,5 menit, 55°C selama 1,5 menit, dan 72°C selama 1,5 menit) serta perpanjangan akhir pada 72°C selama 1,5 menit (Bjornsdottir-Butler, Jones, Benner, & Burkhardt III, 2011). Setiap reaksi PCR dilakukan dengan volume total 40 µl yang terdiri atas 20 µl MyTaq™ HS Mix (Bioline, AU), 1-2 µl primer

27-F dan 1492-R (dengan konsentrasi masing-masing primer 10µM), 2,5 µl cetakan DNA dan air bebas nuclease. Sebanyak 5 µl dari masing-masing produk hasil reaksi PCR dikonfirmasi dengan gel elektroforesis dan sebanyak 20 µl sisanya digunakan untuk sekuensing yang dilakukan menggunakan jasa sekuensing komersial di 1st BASE (Singapura).

Sekuens atau urutan basa yang dihasilkan kemudian divisualisasi menggunakan *Sequence Scanner 2* untuk memperbaiki area yang beresolusi rendah. Sekuens yang sama, sekuens *type strain* dan sekuens takson *outgroup* diperoleh dari database nukleotida NCBI (Nucleotide, 1998). *Alignment* sekuens dan analisa filogenetik dilakukan menggunakan perangkat lunak *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versi 6.0 dengan metode *Neighbour Joining* dengan 1.000 ulangan *bootstrap* (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Karakterisasi BPH dari Sampel Ikan Tuna, Tongkol, dan Cakalang

Pengamatan secara visual terhadap koloni yang tumbuh di media agar Niven menunjukkan bahwa koloni tipikal (yang selanjutnya disebut sebagai isolat presumtif) diidentifikasi sebagai koloni yang berwarna ungu keabu-abuan dengan atau tanpa halo (perubahan warna media di sekitar koloni). Sebanyak 318 isolat presumtif BPH ditemukan dari seluruh sampel ikan (Tabel 2). Dari seluruh isolat presumtif tersebut, sebanyak 59 isolat (19%) terkonfirmasi positif gen *hdc* berdasarkan analisa secara molekuler. Tingginya *false positive* yang teramati pada media agar Niven salah satunya disebabkan oleh terbentuknya hasil metabolisme selain histamin. Hal ini dapat meningkatkan pH media dan teramati sebagai perubahan warna yang menyerupai isolat BPH pada media agar (Björnsdóttir-Butler, Bolton, Jaykus, McClellan-Green, & Green, 2010; Kim et al., 2001).

Komposisi total isolat yang terkonfirmasi positif *hdc* pada sampel ikan tuna, tongkol dan cakalang berturut-turut 18,0; 18,1; dan 20% dari total isolat presumtif yang terisolasi dari media Niven. Hasil pengukuran histamin pada media HB (setelah diinkubasi pada suhu 30°C selama 24-36 jam) yang diinokulasi masing-masing dengan 59 isolat positif *hdc* menunjukkan sebanyak 43 isolat terkonfirmasi sebagai BPH. Bakteri dapat dikategorikan sebagai BPH apabila mampu menghasilkan histamin sebanyak >1.000 ppm (*high producer*) atau 126-500 ppm (*low producer*) setelah ditumbuhkan pada media HB dan dikategorikan sebagai *non producer* (bukan

Tabel 2. Jumlah dan prosentase BPH hasil skrining dari sampel TTC per jenis ikan
 Table 2. Screening results of histamine producing bacteria (HPB) from tuna and tuna-like fish

Jenis Ikan/ Fish Type	\sum Sampel Ikan/ \sum Fish Samples	\sum Koloni Presumtif BPH/ \sum Presumptive HPB	\sum Isolat Positif Gen <i>hdc</i> (%) ¹ / \sum <i>hdc</i> Positive Isolate (%) ¹	\sum Isolat BPH (%) ² / \sum HPB Isolate (%) ²
Tuna/Tuna	32	100	18 (18.0)	15 (83.3)
Tongkol/Little tuna	36	138	25 (18.1)	19 (76.0)
Cakalang/Skipjack	25	80	16 (20.0)	9 (56.3)
Total	93	318	59 (19.0)	43 (72.9)

Keterangan/Notes:

¹ Prosentase isolat positif *hdc* dihitung dari total koloni presumtif untuk setiap jenis ikan/Percentages of *hdc*-positive isolates were calculated from total number of presumptive colonies for each fish

² Prosentase isolat BPH dihitung dari total isolat positif *hdc* untuk setiap jenis ikan/Percentages of HPB isolates were calculated from total *hdc*-positive isolate for each fish

BPH) jika menghasilkan histamin <125 ppm histamin (Bjornsdottir et al., 2009).

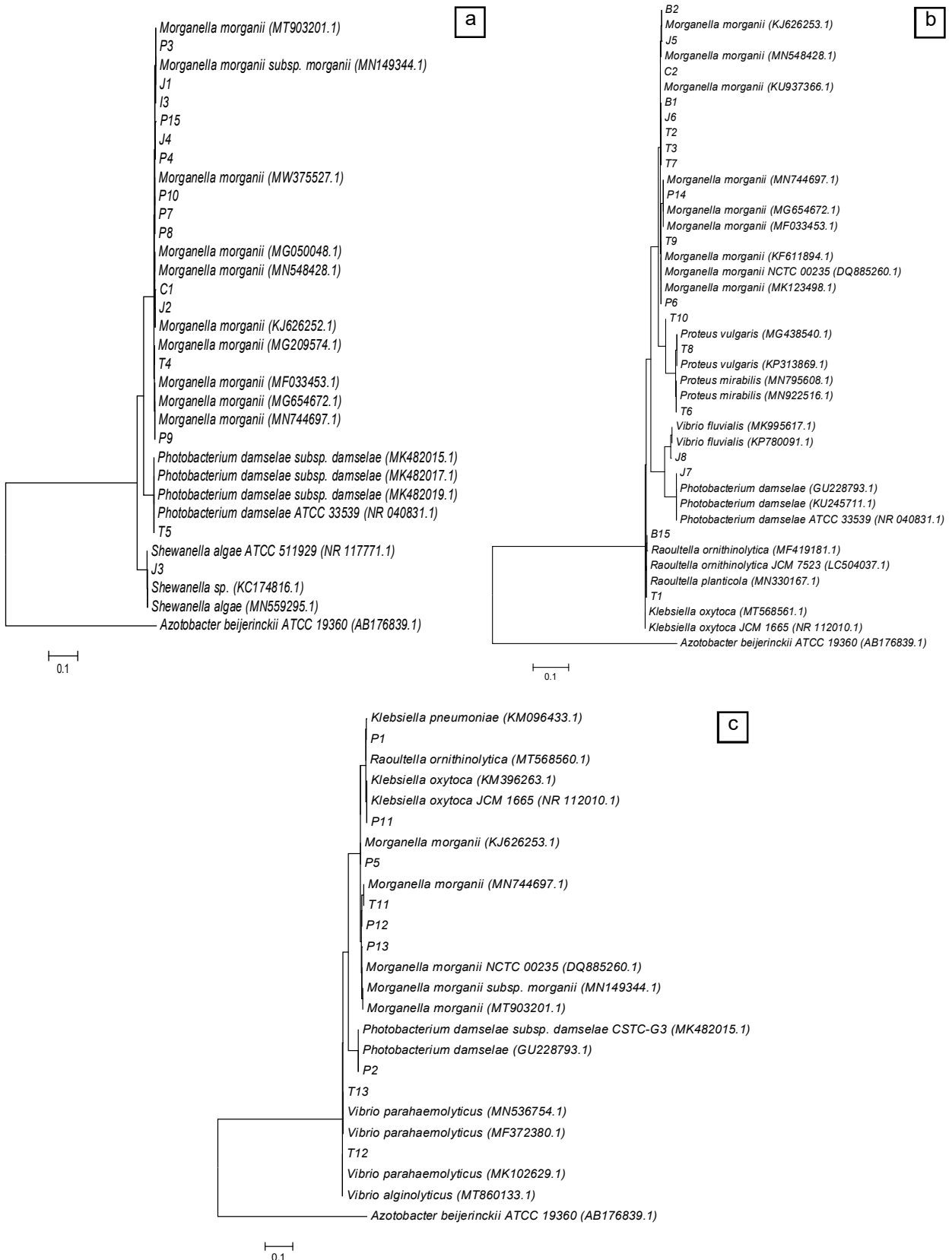
Prosentase isolat positif *hdc* yang terkonfirmasi sebagai BPH untuk tuna, tongkol dan cakalang berturut-turut sebesar 83,3; 76,0 dan 56,3%. Dalam penelitian ini, seluruh BPH mampu menghasilkan histamin >1.000 ppm sehingga dapat dikategorikan sebagai *high histamine producer* atau BPH proliflik. Hal ini menunjukkan bahwa tahapan konfirmasi secara molekuler sangat diperlukan dalam identifikasi BPH untuk meminimalisir kemungkinan *false positive* yang tinggi pada isolat presumtif yang tumbuh di media agar Niven. Sebagai contoh, pada sampel ikan tuna menunjukkan sebanyak 15% atau 15 isolat dari total 100 isolat presumtif (pada media agar Niven) yang terkonfirmasi sebagai BPH. Namun bila dibandingkan dengan tahapan konfirmasi secara molekuler (analisa gen *hdc*), maka 15 isolat (83,33%) dari total 18 isolat terkonfirmasi sebagai BPH.

Beberapa studi menunjukkan bahwa pembentukan histamin oleh BPH terjadi pada fase pertumbuhan eksponensial. Sebagai contoh adalah produksi histamin oleh *M. morgani* dengan hasil tertinggi terjadi pada pertengahan fase eksponensial (Kim, 2001; Omura, Price, & Olcott, 1978; Yoshinaga & Frank, 1982). Jenis bakteri lain seperti *Enterobacter aerogenes* dan *Tetragenococcus muriaticus* menghasilkan histamin dengan kadar tertinggi pada fase eksponensial akhir (Kimura, Konagaya, & Fujii, 2001; Rachmawati, 2019; Takahashi et al., 2003). Demikian pula hasil yang diperoleh dari penelitian ini, isolat positif *hdc* menghasilkan histamin >125 ppm pada fase eksponensial dengan kepadatan sel 10⁷-10⁸ CFU/ml (data tidak ditunjukkan). Faktor lain yang mempengaruhi pembentukan histamin adalah jumlah

histidin bebas dalam daging ikan. Pada ikan tuna, histidin bebas dalam daging berkisar antara 10.000-20.000 ppm (Emborg, Dalgaard, Kjølby, Sørensen, & Larsen, 2008; Fletcher, Summers, Winchester, & Wong, 1995).

Hasil Identifikasi BPH dengan Sekuensing

Hasil identifikasi isolat BPH dari sampel TTC yang diperoleh berdasarkan analisa sekuensing dan filogenetik (Gambar 1) secara keseluruhan menunjukkan sebanyak 69,8% isolat (30/43) teridentifikasi sebagai *Morganella morgani* (Tabel 3). Isolat ini diisolasi dari ketiga jenis ikan, yaitu tuna, tongkol, dan cakalang. *M. morgani* merupakan salah satu bakteri yang paling sering menjadi penyebab pembentukan histamin pada ikan, selain bakteri Gram negatif lain dari golongan *Enterobacteriaceae*, yaitu: *Raoultella planticola*, *Raoultella ornithinolytica*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumonia*, *Citrobacter freundii*, *E. aerogenes*, dan *Proteus vulgaris* (Björnsdóttir-Butler et al., 2010; Lehane & Olley, 2000; Visciano, Schirone, & Paparella, 2020; Visciano et al., 2012). *M. morgani* yang diisolasi dari sampel produk perikanan dari beberapa *retailer* di Jepang mampu menghasilkan histamin hingga lebih dari 1.000 mg/kg setelah ditumbuhkan pada media *histidine broth* selama 24 jam pada suhu 30°C (Torido et al., 2014). Keterlibatan spesies *M. morgani* sebagai penyebab kasus keracunan histamin setelah mengkonsumsi produk perikanan telah dilaporkan sejak tahun 1980-an (Klausen & Huss, 1987; Taylor, 1986) dan hingga saat ini masih banyak laporan kasus keracunan histamin yang disebabkan oleh kontaminasi bakteri ini (Hwang et al., 2019; Lee, Huang, Lin, Lin, & Tsai, 2012). Di Indonesia, jenis bakteri ini juga ditemukan



Gambar 1. Pohon filogenetik yang menunjukkan hubungan kekerabatan antara BPH teridentifikasi dengan *type strain* dan *outgroup taxa* dari sampel (a) tuna; (b) tongkol; dan (c) cakalang.

Figure 1. Phylogenetic tree showing the relationship between identified HPB with *type strains* and *outgroup taxa*, from (a) tuna; (b) little tuna; and (c) skipjack.

Tabel 3. Hasil identifikasi isolat BPH dengan metode PCR sekuensing
 Table 3. Identified HPB isolate based on PCR sequencing

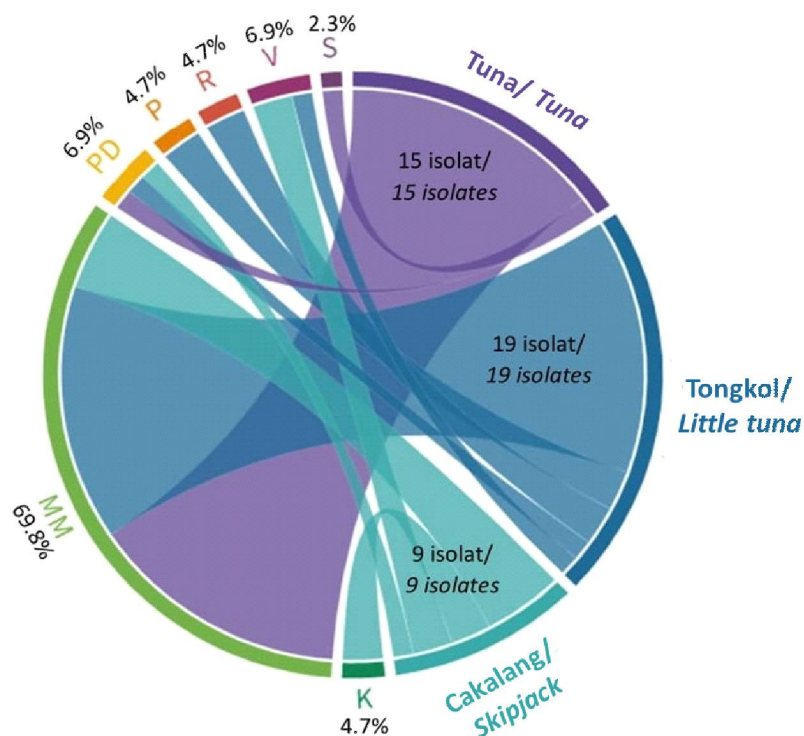
Spesies BPH Teridentifikasi/ <i>Identified HPB</i>	Jumlah Isolat BPH/Number of HPB			Total
	Tuna/ <i>Tuna</i>	Tongkol/ <i>Little tuna</i>	Cakalang/ <i>Skipjack</i>	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	1	1
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	1	1
<i>Morganella morganii</i>	13	13	4	30
<i>Photobacterium damselaе</i>	1	1	1	3
<i>Proteus mirabilis</i>	-	1	-	1
<i>P. vulgaris</i>	-	1	-	1
<i>Raoultella planticola</i>	-	1	-	1
<i>R. ornitholytica</i>	-	1	-	1
<i>Shewanella</i> sp.	1	-	-	1
<i>Vibrio fluvialis</i>	-	1	-	1
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	-	2	2
Total	15	19	9	43

baik pada produk perikanan segar (Nurilmala et al., 2020) maupun olahan seperti pindang (Fatuni et al., 2014; Rachmawati, 2019).

Selain *M. morganii*, BPH lain yang teridentifikasi dari ketiga jenis sampel ikan adalah *Photobacterium damselaе* dengan jumlah 6,9% (3/43) dari total isolat yang ditemukan. Bakteri ini ditemukan pada beragam jenis produk perikanan segar seperti bonito, tuna, makarel, sauri, todak, dan sardin (Torido et al., 2014) serta belanak (Trevisani, Mancusi, Cecchini, Costanza, & Prearo, 2017) dengan produksi histamin lebih dari 1.000 mg/kg. Seperti halnya *M. morganii*, bakteri ini tergolong sebagai bakteri mesofilik yang tumbuh optimum pada suhu 30-35°C di lingkungan dengan kadar garam 1-3% (Bjornsdottir-Butler, Bowers, & Benner, 2015). Meskipun laporan yang menunjukkan keterlibatan *P. damselaе* dalam kasus keracunan histamin belum ada, namun dilihat dari kemampuan bakteri ini dalam menghasilkan histamin dalam kadar yang toksik, maka keberadaannya perlu mendapat perhatian karena ada kemungkinan akan menjadi penyebab kasus keracunan histamin di masa yang akan datang (Bjornsdottir-Butler et al., 2015; Kanki, Yoda, Tsukamoto, & Baba, 2007; Torido et al., 2014). Keberadaan *M. morganii* dan *P. damselaе* pada produk perikanan perlu mendapat perhatian khusus mengingat aktivitas dekarboksilasi dari kedua jenis bakteri ini masih bisa tetap berlangsung meskipun aktifitas mikroba sudah dinonaktifkan (Gardini, Özogul, Suzzi, Tabanelli, & Özogul, 2016; Visciano et al., 2020).

Profil BPH yang teridentifikasi dari sampel TTC menunjukkan bahwa berdasarkan jenis dan jumlahnya, isolat BPH paling banyak ditemukan pada sampel ikan tongkol dibanding sampel ikan tuna dan cakalang (Gambar 2). Dari 7 genus yang teridentifikasi, sebanyak 5 genus ditemukan pada sampel tongkol, yaitu *Vibrio*, *Raoultella*, *Proteus*, *Photobacterium*, dan *Morganella*. Sedangkan pada sampel tuna dan cakalang, teridentifikasi masing-masing sebanyak 3 dan 4 genus. Keberadaan BPH pada produk perikanan dapat berasal dari alam maupun sebagai akibat dari kontaminasi setelah penangkapan. BPH seperti *M. morganii*, *R. planticola* dan *E. aerogenes* dapat ditemukan secara alami di saluran pencernaan, insang, maupun kulit ikan pada saat ikan ditangkap (Bjornsdottir et al., 2009; FAO & WHO, 2012). Sementara itu, *Photobacterium* spp. diketahui sebagai mikrobiota alami sekaligus bakteri yang ditemukan sebagai akibat kontaminasi silang pada saat penanganan ikan (Torido et al., 2014).

Studi terdahulu menunjukkan bahwa sebagian besar BPH yang menjadi penyebab kasus keracunan histamin berasal dari golongan bakteri mesofilik (tumbuh optimum pada suhu 30-35°C dengan kadar garam 1-3%). Hal ini mengindikasikan bahwa akumulasi histamin terjadi akibat kegagalan dalam menjaga sistem rantai dingin selama penanganan dan pengolahan produk perikanan (Lehane & Olley, 2000; Torido et al., 2014). Untuk menghambat pembentukan histamin pada ikan dari jenis Scombridae, FAO telah menyarankan proses pendinginan pada suhu $\pm 4,4^{\circ}\text{C}$



Keterangan/Notes:

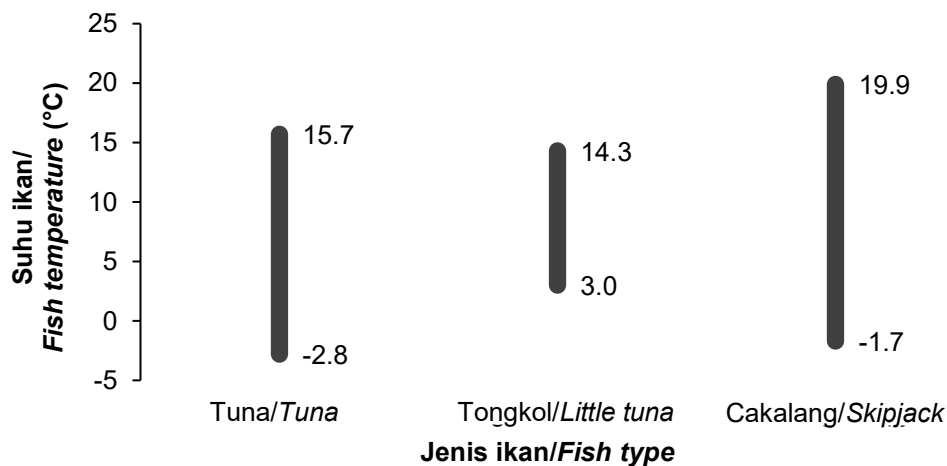
S: *Shewanella* sp., V: *Vibrio* sp., R: *Raoultella* sp., P: *Proteus* sp., PD: *Photobacterium damsela*, MM: *M. morgani*, K: *Klebsiella* sp. Nilai dalam % menunjukkan prosentase masing-masing isolat per total isolat yang teridentifikasi/ S: *Shewanella* sp., V: *Vibrio* sp., R: *Raoultella* sp., P: *Proteus* sp., PD: *P. damsela*, MM: *M. morgani*, K: *Klebsiella* sp. Values in % represent the percentage of each isolate per total of the identified isolates.

Gambar 2. Profil BPH yang diisolasi dari sampel TTC.
Figure 2. HPB profile isolated from tuna and tuna-like sample.

segera setelah ikan ditangkap terutama untuk ikan di wilayah perairan bersuhu hangat (USFDA, 2011).

Sistem rantai dingin merupakan titik kritis penanganan dan pengolahan ikan di wilayah tropis, termasuk Indonesia, karena pada beberapa lokasi pendaratan ikan masih terdapat keterbatasan persediaan es. Data hasil pengukuran suhu ikan pada saat pengambilan sampel di lapangan (Gambar 3) menunjukkan adanya variasi dari -2,8°C hingga 19,9°C. Sampel ikan yang diambil dari pelabuhan, TPI atau pasar ikan yang letaknya tidak jauh dari TPI cenderung memiliki suhu yang lebih rendah (beku sampai 11,8°C) daripada sampel dari pasar modern maupun *retail* atau supermarket (beku sampai 19,9°C). Hasil observasi pada saat pengambilan sampel menunjukkan bahwa meskipun tingkat kebersihan dan penataan pasar modern secara umum lebih baik dibandingkan pasar tradisional maupun TPI, namun ketersediaan es di jenis pasar ini masih terbatas sehingga suhu ikan dapat mencapai 19,9°C.

Dari keseluruhan sampel yang diambil, sebanyak 8 sampel (7 tuna dan 1 cakalang) diperoleh dalam bentuk beku dengan suhu berkisar antara -2,8 sampai 0,8°C. Sampel tersebut diambil dari TPI, pasar modern dan retail. BPH ditemukan di 3 sampel beku dan teridentifikasi sebagai *M. morgani* dan *P. damsela*, keduanya merupakan BPH mesofilik. Selain dari golongan mesofilik, beberapa BPH prolifik merupakan bakteri psikrofilik yang mampu tumbuh pada suhu rendah (0-5°C), seperti *P. phosphoreum* dan *M. psychrotolerans* (Dalgaard, Madsen, Samieian, & Emborg, 2006; Torido et al., 2014). Dalam penelitian ini tidak ditemukan isolat dari golongan psikrofilik, meskipun dari sampel yang diambil dalam bentuk beku. Hal ini dikarenakan suhu yang digunakan dalam prosedur isolasi (30°C) tidak mendukung pertumbuhan bakteri psikrofilik tersebut. Beberapa BPH psikrofilik seperti *M. psychrotolerans* dan *P. phosphoreum* diketahui dapat menghasilkan histamin pada suhu rendah (<2,5°C), namun demikian kasus keracunan



Gambar 3. Suhu ikan pada saat pengambilan di lapangan
 Figure 3. Fish temperature during sample collection

pangan akibat histamin masih didominasi oleh BPH mesofilik sebagai mikroflora alami pada ikan, seperti *M. organii*, *R. planticola* dan *E. aerogenes* (Björnsdóttir-Butler et al., 2010; Björnsdóttir, 2009; Emborg & Dalgaard, 2008). Untuk melengkapi informasi yang telah tersedia terkait keberadaan BPH pada produk perikanan di Indonesia, terutama untuk produk beku atau produk yang disimpan pada suhu dingin, diperlukan penelitian terkait isolasi BPH psikofilik dengan suhu inkubasi yang sesuai (15°C) (Torido et al., 2014).

Meskipun jumlah BPH yang secara alami terdapat pada ikan hanya sekitar 1% dari keseluruhan mikroflora yang ada pada permukaan ikan hidup (FAO & WHO, 2012), namun dengan adanya histidin bebas pada ikan-ikan tertentu seperti tuna, tongkol dan cakalang maka aktivitas bakteri ini dapat dimulai segera setelah ikan ditangkap. Dengan demikian, apabila suhu setelah penangkapan tidak dipertahankan pada suhu dingin, pertumbuhan bakteri dan pembentukan histamin akan terjadi dengan cepat bahkan sebelum ikan mengalami fase *post-mortem* (FAO & WHO, 2012; Lehane & Olley, 2000). Salah satu tahapan yang disarankan untuk mengurangi kemungkinan kontaminasi BPH ke dalam daging ikan adalah melalui penyiangan secara hati-hati segera setelah ikan ditangkap (Visciano et al., 2012).

KESIMPULAN

Jenis BPH prolifk yang paling umum ditemui pada produk TTC segar yang dijual di TPI dan beberapa pasar domestik di wilayah Jawa Barat, DKI Jakarta, dan Banten adalah *M. organii* (69,8%) dan *P. damselae* (6,9%), keduanya merupakan BPH

mesofilik dan ditemukan baik pada ikan tuna, tongkol maupun cakalang. Isolat mesofilik lain yang teridentifikasi dari sampel TTC berasal dari genus *Klebsiella* (4,7%), *Proteus* (4,7%), *Raoultella* (4,7%), *Shewanella* (2,3%) dan *Vibrio* (6,9%). Keberadaan BPH prolifk pada sampel TTC yang diperoleh mengindikasikan bahwa potensi akumulasi histamin di produk akhir mungkin terjadi apabila penerapan rantai dingin selama distribusi, penanganan dan pengolahan tidak dilakukan dengan baik. Untuk mengetahui karakteristik BPH prolifk tersebut, diperlukan penelitian lebih lanjut terkait kemampuan isolat untuk beradaptasi dan menghasilkan histamin pada kondisi penanganan dan pengolahan produk perikanan yang berbeda-beda. Selain itu, diperlukan penelitian terkait isolasi BPH psikofilik, untuk mendapatkan gambaran kontaminasi pada produk perikanan beku atau yang disimpan pada suhu rendah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan (BBRP2BKP) melalui DIPA Tahun Anggaran 2020 Nomor SP DIPA- 032.12.2.403835/2020. Ucapan terima kasih disampaikan kepada tim peneliti Keamanan Pangan BBRP2BKP yang telah membantu pengambilan sampel di lapangan, Wahyu Widiyanto dan Anggraeni Musvitawati yang telah membantu preparasi sampel di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

Antara. (2020). Keracunan Ikan Tongkol, Tiga Orang Masih Dirawat. *Jawapos*. Retrieved from <https://>

- www.jawapos.com/jpg-today/12/03/2020/keracunan-ikan-tongkol-tiga-orang-masih-dirawat/
- Björnsdóttir-Butler, K., Bolton, G. E., Jaykus, L.-A., McClellan-Green, P. D., & Green, D. P. (2010). Development of molecular-based methods for determination of high histamine producing bacteria in fish. *International Journal of Food Microbiology*, 139(3), 161-167. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.017
- Björnsdóttir-Butler, K., Bowers, J. C., & Benner, R. A., Jr. (2015). Prevalence and characterization of high histamine-producing bacteria in Gulf of Mexico fish species. *Journal of Food Protection*, 78(7), 1335-1342. doi:10.4315/0362-028X.Jfp-15-012
- Björnsdóttir-Butler, K., Jones, J. L., Benner, R., & Burkhardt III, W. (2011). Development of a real-time PCR assay with an internal amplification control for detection of Gram-negative histamine-producing bacteria in fish. *Food Microbiology*, 28(3), 356-363. doi:10.1016/j.fm.2010.06.013
- Björnsdóttir, K. (2009). *Detection and control of histamine-producing bacteria in fish. (Disertasi)*. North Carolina State University, Ann Arbor.
- Björnsdóttir, K., Bolton, G. E., McClellan-Green, P. D., Jaykus, L. A., & Green, D. P. (2009). Detection of Gram-negative histamine-producing bacteria in fish: a comparative study. *Journal of Food Protection*, 72(9), 1987-1991. doi:10.4315/0362-028X-72.9.1987
- Chendaki, B. (2020). Polisi Usut Keracunan Ikan Tongkol BPNT Pemalang. Retrieved from <https://www.puskapik.com/10690/berita/polisi-usut-keracunan-ikan-tongkol-bpnt-pemalang/>
- Chiang, Y. C., Yang, C. Y., Li, C., Ho, Y. C., Lin, C. K., & Tsen, H. Y. (2006). Identification of *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. and *Vibrio* spp. with 16S ribosomal DNA-based oligonucleotide array hybridization. *International Journal of Food Microbiology*, 107(2), 131-137. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.028
- Cox, K. L., Devanarayan, V., Kriauciunas, A., Manetta, J., Montrose, C., & Sittampalam, S. (2004). Immunoassay Methods. In G. S. Sittampalam, N. P. Coussens, H. Nelson, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, B. Bejcek, M. Glicksman, J. Inglese, P. W. Iversen, Z. Li, J. McGee, O. McManus, L. Minor, A. Napper, J. M. Peltier, T. Riss, J. O. Joseph Trask, & J. Weidner (Eds.), *Assay Guidance Manual (Internet)*. Bethesda, Maryland: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Dalgaard, P., Madsen, H. L., Samieian, N., & Emborg, J. (2006). Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (*Belone belone belone*) – effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. *Journal of Applied Microbiology*, 101(1), 80-95. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02905.x
- Emborg, J., & Dalgaard, P. (2008). Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation by *Morganella psychrotolerans*. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 226-233. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.016
- Emborg, J., Dalgaard, P., Kjølby, A., Sørensen, N. D., & Larsen, I. K. (2008). *Results of biogenic amine concentrations and microflora in seafood causing histamine fish poisoning (HFP) (3.4.2 - 2008)*. http://seafoodplus.org/project/images/seafoodplus_report_report_3.4.2_-_jette_emborg_et_al.pdf
- Fatuni, Y. S., Suwandi, R., & Jacob, A. M. (2014). Identifikasi kadar histamin dan bakteri pembentuk histamin dari pindang badeng tongkol. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 17(2), 112-118.
- Fletcher, G. C., Summers, G., Winchester, R. V., & Wong, R. J. (1995). Histamine and Histidine in New Zealand Marine Fish and Shellfish Species, Particularly Kahawai (*Arripis trutta*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 4(2), 53-74. doi:10.1300/J030v04n02_04
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, & World Health Organization (FAO & WHO). (2012). *Public health risks of histamine and other biogenic amines from fish and fishery products*. Rome: FAO and WHO.
- Gardini, F., Özogul, Y., Suzzi, G., Tabanelli, G., & Özogul, F. (2016). Technological Factors Affecting Biogenic Amine Content in Foods: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1218-1218. doi:10.3389/fmicb.2016.01218
- Hwang, C. C., Tseng, P. H., Lee, Y. C., Kung, H. F., Huang, C. Y., Chen, H. C., & Tsai, Y. H. (2019). Determination of histamine in Japanese Spanish Mackerel (*Scomberomorus niphonius*) meat implicated in a foodborne poisoning. *Journal of Food Protection*, 82(10), 1643-1649. doi:10.4315/0362-028X.Jfp-19-111
- Indriati, N., Rispayeni, & Heruwati, E. S. (2006). Studi bakteri pembentuk histamin pada ikan kembung peda selama proses pengolahan]. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 1(2), 117-122. doi:10.15578/jpbkp.v1i2.394
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (2005). *Microbiology of Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities* (2nd ed.). New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Kanki, M., Yoda, T., Tsukamoto, T., & Baba, E. (2007). Histidine decarboxylases and their role in accumulation of histamine in tuna and dried saury. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1467-1473. doi:10.1128/aem.01907-06
- Kementerian Kelautan dan Perikanan. (2016). *Laporan Kinerja Kementerian Kelautan dan Perikanan 2016*. Jakarta.
- Kim, S., Field, K., Morrissey, M., Price, R., Wei, C., & An, H. (2001). Source and identification of histamine-producing bacteria from fresh and temperature-abused albacore. *Journal of Food Protection*, 64(7), 1035-1044. doi:10.4315/0362-028X-64.7.1035

- Kim, S. H. (2001). *Identification of bacteria crucial to histamine formation and monitoring their occurrence and histamine accumulation in scombroid fish. Disertasi*. Oregon State University.
- Kimura, B., Konagaya, Y., & Fujii, T. (2001). Histamine formation by *Tetragenococcus murii*, a halophilic lactic acid bacterium isolated from fish sauce. *International Journal of Food Microbiology*, 70(1), 71-77. doi:10.1016/S0168-1605(01)00514-1
- Klausen, N. K., & Huss, H. H. (1987). Growth and histamine production by *Morganella morganii* under various temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 5(2), 147-156. doi:10.1016/0168-1605(87)90032-8
- Lee, Y. C., Huang, T. C., Lin, C. S., Lin, C. M., & Tsai, Y. H. (2012). Determination of histamine and histamine-forming bacteria in Striped marlin fillets (*Tetrapturus audax*) implicated in a food-borne poisoning. *Toxicon*, 60(2), 161-162. doi:10.1016/j.toxicon.2012.04.133
- Lehane, L., & Olley, J. (2000). Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*, 58(1-2), 1-37. doi:10.1016/S0168-1605(00)00296-8
- Niven, C. F., Jeffrey, M. B., & Corlett, D. A. (1981). Differential plating medium for quantitative detection of histamine producing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(1), 321-322.
- Nucleotide. (1988). *Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information*. Internet. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>
- Nurilmala, M., Saputri, N. N., Abdullah, A., Nurjanah, N., Yusfiandayani, R., & Sondita, M. F. A. (2020). Detection of histamine-producing bacteria on tuna species using histidine decarboxylase (hdc) and 16S rRNA. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 15(30), 131-139. doi:http://dx.doi.org/10.15578/squalen.v15i3.445
- Omura, Y., Price, R. J., & Olcott, H. S. (1978). Histamine - forming bacteria isolated from spoiled skipjack tuna and jack mackerel. *Journal of Food Science*, 43(6), 1779-1781. doi:10.1111/j.1365-2621.1978.tb07412.x
- Pusat Data Statistik dan Informasi KKP (PUSDATIN KKP). (2018). *Kelautan dan Perikanan dalam Angka tahun 2018*. Jakarta.
- Rachmawati, N. (2019). *Assessing the risk of histamine from the Indonesian salted-boiled fish (pindang)*. (Disertasi). University of Tasmania, Hobart, Tasmania.
- Raharjo, D. B. (2020). Puluhan Warga Batang Diduga Keracunan Ikan Tongkol Bantuan Kemensos. Retrieved from <https://jateng.suara.com/read/2020/06/18/153943/puluhan-warga-batang-diduga-keracunan-ikan-tongkol-bantuan-kemensos>
- Supriadi, B. (2020). Korban Keracunan Ikan Tongkol di Jember Bertambah Lagi, Kini Jadi 350 Orang [Victims of fish poisoning in Jember increased, now accounted for 350 people]. *Kompas*. <https://regional.kompas.com/read/2020/01/03/11472551/korban-keracunan-ikan-tongkol-di-jember-bertambah-lagi-kini-jadi-350-orang>
- Suryono. (2020). Ratusan Orang di Pematang Diduga Keracunan Ikan Tongkol. <https://news.okezone.com/read/2020/07/21/519/2249499/ratusan-orang-di-pematang-diduga-keracunan-ikan-tongkol>
- Takahashi, H., Kimura, B., Yoshikawa, M., & Fujii, T. (2003). Cloning and sequencing of the histidine decarboxylase genes of gram-negative, histamine-producing bacteria and their application in detection and identification of these organisms in fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2568-2579. doi:10.1128/aem.69.5.2568-2579.2003
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729. doi:10.1093/molbev/mst197
- Taylor, S. L. (1986). Histamine food poisoning - Toxicology and clinical aspects. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 17(2), 91-128. doi:10.3109/10408448609023767
- Torido, Y., Ohshima, C., Takahashi, H., Miya, S., Iwakawa, A., Kuda, T., & Kimura, B. (2014). Distribution of psychrophilic and mesophilic histamine-producing bacteria in retail fish in Japan. *Food Control*, 46(0), 338-342. doi:10.1016/j.foodcont.2014.05.045
- Trevisani, M., Mancusi, R., Cecchini, M., Costanza, C., & Prearo, M. (2017). Detection and characterization of histamine-producing strains of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolated from mullets. *Veterinary sciences*, 4(2), 31. doi:10.3390/vetsci4020031
- United States Department of Health Human Services, Food Drug Administration (FDA), & Center for Food Safety Applied Nutrition (CFSAN). (2011). *Fish and fishery products hazards and controls guidance* (Fourth ed.). Gainesville: Florida Sea Grant.
- Virgantari, F., Daryanto, A., Harianto, & Kuntjoro, S. U. (2011). Dinamika konsumsi produk perikanan di Indonesia. *Ekologia: Jurnal Ilmiah Ilmu Dasar dan Lingkungan Hidup*, 11(2), 22-30.
- Visciano, P., Schirone, M., & Paparella, A. (2020). An overview of histamine and other biogenic amines in fish and fish products. *Foods*, 9(12). doi:10.3390/foods9121795
- Visciano, P., Schirone, M., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2012). Biogenic amines in raw and processed seafood. *Frontiers in Microbiology*, 3(188), 1-10. doi:10.3389/fmicb.2012.00188
- Visciano, P., Schirone, M., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2014). Histamine poisoning and control measures in fish and fishery products. *Frontiers in Microbiology*, 5, 500. doi:10.3389/fmicb.2014.00500
- Wahyuni, S. (2011). *Histamin Tuna (Thunnus sp) dan Identifikasi Bakteri Pembentuknya pada Kondisi Suhu Penyimpanan Standar*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703. doi:10.1128/jb.173.2.697-703.1991

- Widria, Y. (2018). Ekspor Tuna Cakalang Tongkol Indonesia 6 Tahun Terakhir (2012-2017), Kondisi dan Harapan. <https://kkp.go.id/djpdspkp/artikel/2746-ekspor-tuna-cakalang-tongkol-indonesia-6-tahun-terakhir-2012-2017-kondisi-dan-harapan>
- Wodi, S. I. M. (2015). *Profil protein larut air dan histamin serta identifikasi bakteri penghasil histidin dekarboksilase pada tuna mata besar (Thunnus obesus)*. Thesis. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Wuryandani, D., & Meilani, H. (2011). Kebijakan pengelolaan sumber daya perikanan laut untuk menunjang ketahanan pangan di Indonesia. *Jurnal Ekonomi & Kebijakan Publik*, 2(1), 395-422.
- Yoshinaga, D. H., & Frank, H. A. (1982). Histamine producing bacteria in decomposing skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Applied and Environmental Microbiology*, 44(2), 447-452.