

PENGHAMBATAN ENZIM *L-HISTIDINE DECARBOXYLASE* DARI BAKTERI PEMBENTUK HISTAMIN MENGGUNAKAN ASAM BENZOAT

Endang Sri Heruwati^{*)}, Romauli Aya Sophia^{**)}, dan Wibowo Mangunwardoyo^{**)}

ABSTRAK

Studi tentang penghambatan enzim *L-Histidine Decarboxylase* (HDC) menggunakan asam benzoat telah dilakukan. Dalam percobaan ini, enzim HDC diproduksi dari isolat A4, yang diidentifikasi sebagai *Enterobacter* sp. Asam benzoat pada konsentrasi 10, 15, 20, 25, dan 30 mM ditambahkan pada ekstrak enzim kasar dan perubahan aktivitas enzim diamati. Hasil percobaan menunjukkan bahwa semua perlakuan konsentrasi asam benzoat dapat menghambat aktivitas enzim HDC, namun penghambatan tertinggi dicapai pada perlakuan 15 mM, dengan aktivitas sebesar 0,17 U. Penghambatan aktivitas enzim optimum pada penambahan 15 mM asam benzoat adalah pada suhu 40°C dan pH 6,0. Penambahan ion Fe²⁺ memberikan penghambatan yang lebih tinggi dibandingkan ion logam lain. Hasil aplikasi perendaman ikan tongkol lisong (*Euthynnus affinis*) dalam larutan asam benzoat 0,1% selama 30 menit menunjukkan adanya pengaruh nyata terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri penghasil histamin maupun produksi histaminnya, sementara tidak terlihat pengaruh terhadap kadar air maupun pH ikan.

ASBTRACT: *Inhibition of L-histidine decarboxylase produced by histamine forming bacteria using benzoic acid. By: Endang Sri Heruwati, Romauli Aya Sophia, and Wibowo Mangunwardoyo*

Studies on inhibition of L-Histidine Decarboxylase (HDC) enzyme using benzoic acid have been carried out. In this experiment, HDC enzyme was produced from isolate A4, which was identified as Enterobacter sp. Benzoic acid at concentrations of 10, 15, 20, 25 and 30 mM were added to the crude enzyme and changes of enzyme activity were measured. The result revealed that benzoic acid at all concentrations tested could inhibit the HDC activity and the highest inhibitory action was shown by treatment at concentration of 15 mM which was 0.17 U. The optimum inhibitory activity of HDC enzyme after added with 15 mM benzoic acid was at 40°C and pH 6.0. The addition of metal Fe²⁺ ion gave higher inhibition compared to the other metal ions. It was also revealed that soaking of skipjack (Euthynnus affinis) in 0.1% of benzoic acid solution for 30 minutes showed a significant effect on the number of histamine forming bacteria and production of histamine, while no significant effect on moisture content and pH of the fish.

KEYWORDS: *histamine forming bacteria, benzoic acid, histamine, L-Histidine decarboxylase, Euthynnus affinis*

PENDAHULUAN

Histamin (imidazol-etilamin), merupakan senyawa bioamin yang tidak menguap (*non volatile compound*) yang dihasilkan dari proses dekarboksilasi histidin bebas (α -amino- β -imidazol asam propionat) (Lehane & Olley, 1999). Proses pembentukan histamin pada ikan sangat dipengaruhi oleh aktivitas enzim *L-Histidine Decarboxylase* (HDC) (Bennour *et al.*, 1991). Senyawa amin biogenik ini dapat terbentuk karena dekarboksilasi endogenik, yaitu yang dilakukan oleh enzim yang terdapat dalam sel ikan itu sendiri, maupun eksogenik yang merupakan proses dekarboksilasi oleh mikroorganisme yang menghasilkan enzim dekarboksilase ekstraseluler.

Beberapa jenis ikan terutama dari famili *Scombroidea* mempunyai kandungan histidin bebas yang tinggi, sebagai contoh tuna mata besar mencapai 491 mg/100 g daging, mahi-mahi 344 mg/100 g, cakalang 1.192 mg/100 g, tuna ekor kuning 740 mg/100 g, kembung 600 mg/100 g, dan albakor yang tertinggi, sampai 2 mg/100 g (Lukton & Olcott, 1958; Perez-Martin *et al.*, 1988; Antoine *et al.*, 1999). Menurut hasil penelitian (Gonowiakz *et al.*, 1990), hanya ikan yang mengandung histidin bebas di atas 100 mg/100 g daging yang mampu menghasilkan histamin.

Pada kadar yang rendah, histamin sebenarnya tidak terlalu berbahaya bagi kesehatan manusia yang mengkonsumsinya, karena keracunan dan gejalanya

^{*)} Peneliti pada Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, DKP

^{**)} Departemen Biologi FMIPA-Universitas Indonesia

hanya terjadi bila histamin masuk ke dalam aliran darah. Kandungan histamin pada ikan segar umumnya sekitar 10-15 mg/100 g (Ozogul *et al.*, 2004, Craven *et al.*, 2001 dalam Ko, 2006). Tubuh manusia mempunyai sistem yang cukup efektif untuk mendetoksifikasi racun yang masuk ke dalam saluran pencernaan. Monoamin oksidase, diamin oksidase, dan histamin-N-metiltransferase antara lain merupakan enzim pencernaan yang dapat memetabolisasi histamin yang masuk ke saluran pencernaan menjadi senyawa yang tidak toksik. Namun demikian kemungkinan terjadinya keracunan histamin tetap perlu diwaspadai karena sistem detoksifikasi histamin hanya bekerja pada kondisi asupan (*intake*) harian yang normal. Pada asupan yang sangat tinggi, sistem itu sudah tidak mampu lagi mendetoksifikasi racun.

Aktivitas enzim HDC dipengaruhi oleh faktor pH, suhu, dan ketersediaan oksigen yang rendah (Eitenmiller *et al.*, 1982; Allen, 2004). Aktivitas enzim tersebut paling tinggi pada suhu 37°C dan pH optimum adalah 6,0 (Eitenmiller *et al.*, 1982). Pertumbuhan bakteri pembentuk histamin maupun produksi enzim histidin dekarboksilase pada umumnya dapat dihambat pada suhu 5°C atau lebih rendah. Namun demikian, karena keterbatasan fasilitas, penyimpanan suhu rendah seringkali tidak memungkinkan, sehingga diperlukan suatu cara untuk menghambat aktivitas enzim.

Penghambatan aktivitas enzim HDC merupakan salah satu cara untuk mengontrol terbentuknya histamin, karena apabila histamin telah terbentuk, maka akan sulit untuk menghilangkan histamin yang telah ada pada ikan baik dengan cara pemanasan atau pembekuan (Wendakoon & Sakaguchi, 1995). Inhibitor alami enzim HDC di antaranya adalah ekstrak berbagai jenis rempah-rempah seperti lada hitam, *cinnamon*, dan saga (4% v/v) (Wendakoon & Sakaguchi, 1995) dan 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Lane & Snell, 1976). Senyawa epigalokatekin-3-galat dari teh hijau dilaporkan juga dapat menghambat enzim HDC (Rodríguez-Caso *et al.*, 2003). Beberapa turunan asam benzoat seperti 4-chlorobenzoic acid dan p-chlorobenzoic acid (NSC 8444) atau 4-aminobenzoic acid atau p-aminobenzoic acid (NSC 7627) juga dilaporkan sebagai inhibitor bagi enzim histidin dekarboksilase (Anon., 2008). Senyawa benzoat dapat menghambat pertumbuhan kapang dan khamir, bakteri penghasil racun, spora bakteri, bakteri pembusuk (Anon., 2005) dan kerja enzim.

Asam benzoat juga potensial menghambat pertumbuhan ragi dan bakteri dan paling efektif dalam menghambat pertumbuhan kapang pada bahan pangan dan biasa ditambahkan dalam jumlah sekitar 0,05–0,1% berat bahan (Medikasari, 2002). Senyawa ini merupakan bahan pengawet makanan yang

dinyatakan aman dan diizinkan penggunaannya dalam pangan (Badan Pengawasan Obat dan Makanan, 2002). Oleh karena itu, asam benzoat merupakan salah satu asam organik lemah yang terbanyak digunakan dalam industri pengawetan makanan dan minuman. Senyawa ini pada umumnya digunakan pada makanan dan minuman dengan konsentrasi 400 sampai 1.000 mg per kg bahan (Hazan *et al.*, 2004). Mekanisme penghambatan mikroba oleh asam benzoat secara umum dimulai dengan absorpsi asam benzoat yang mempunyai pH asam ke dalam sel. Asam benzoat merupakan asam organik lemah yang mampu menurunkan pH sitoplasmik, terutama pada kondisi asam. Perubahan pH yang menjadi asam karena penambahan asam benzoat mengakibatkan terjadinya fermentasi anaerobik glukosa melalui penurunan aktivitas fosfofruktokinase sebanyak 95%. Proses penghambatan asam benzoat sangat dipengaruhi oleh perubahan pH (Krebs *et al.*, 1983).

Karakterisasi enzim perlu dilakukan untuk mengetahui mekanisme penghambatan pembentukan histamin oleh enzim HDC dari bakteri. Semakin banyak informasi tentang karakter enzim HDC tersebut, akan dapat memberikan informasi mekanisme penghambatan pembentukan histamin (Coton *et al.*, 1998).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan asam benzoat terhadap penghambatan aktivitas enzim HDC, dan karakteristik enzim yang diproduksi dari isolat bakteri yang memiliki kemampuan memproduksi histamin tertinggi. Penelitian dilanjutkan dengan aplikasinya pada ikan tongkol lisong (*Euthynnus affinis*).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Kultur bakteri yang digunakan adalah isolat A4 yang diidentifikasi sebagai *Enterobacter* sp., koleksi Laboratorium Mikrobiologi Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan.

Jenis ikan yang digunakan pada aplikasi adalah ikan tongkol lisong (*Euthynnus affinis*) dengan panjang 25–30 cm dan berat 150–170 g per ekor yang dibeli di pasar Palmerah di Jakarta.

Metode

Pembuatan medium sintetik

Komposisi medium sintetik adalah: 2,0 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$; 2,0 g KH_2PO_4 ; 2,0 g $(NH_4)_2SO_4$; 5,0 g NaCl; 0,1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,12 g L-Sistin; 100 μ g

Ca-pantotenat; 100 µg Niasin; 10,0 g glukosa; dan 1,0 g L-Histidin, dilarutkan dalam 1 L akuades pada pH 7,0. Media disterilisasi selama 15 menit pada suhu 121° C, kecuali Niasin dan Ca-pantotenat disterilisasi dengan membran milipor ukuran 0,45 µm (Omura *et al.*, 1978).

Produksi enzim HDC

Sebanyak 2 mL suspensi sel isolat A4 ($8,7 \times 10^9$ sel/mL) berumur 24 jam diinokulasikan ke dalam Erlenmeyer 100 mL berisi 20 mL medium sintetik (Omura *et al.*, 1978), diinkubasikan selama 8 jam (waktu optimum produksi enzim HDC) dalam penangas air goyang dengan kecepatan 125 rpm, suhu 37°C.

Pemisahan sel bakteri dilakukan dengan sentrifugasi suhu rendah ($\pm 4^\circ\text{C}$) pada kecepatan 15.000 rpm selama 15 menit menggunakan *refrigerated centrifuge*, kemudian dicuci dengan bufer fosfat pH 6,8. Pasta sel yang diperoleh disuspensikan dengan bufer fosfat pH 6,8 (5 mL/g berat basah sel). Pemecahan dinding sel dilakukan dengan *tissue homogenizer* selama 5 menit dengan kecepatan 11.000 rpm. Ekstrak enzim kasar dipisahkan dari bagian sel lainnya dengan menggunakan sentrifugasi suhu rendah ($\pm 4^\circ\text{C}$) dengan kecepatan 15.000 rpm selama 15 menit (Atmadjaja, 1994).

Penentuan aktivitas enzim HDC dilakukan dengan mereaksikan sebanyak 1,0 mL ekstrak enzim dengan 1,0 mL L-Histidin 0,05 M dan 2,0 mL bufer fosfat 0,1 M pH 6,8 selama 1 jam pada suhu 30°C. Semua perlakuan yang berhubungan dengan enzim dilakukan pada suhu 4°C. Setelah itu, aktivitas enzim dihentikan dengan cara pemanasan pada suhu 90°C selama 15 menit (Atmadjaja, 1994). Aktivitas enzim diukur berdasarkan konsentrasi histamin yang terbentuk dengan menggunakan spektrofotometri berdasarkan metode Hardy & Smith (1976).

Enzim kasar yang diperoleh digunakan dalam penentuan konsentrasi optimum asam benzoat sebagai inhibitor enzim. Dalam penelitian ini, satu unit aktivitas enzim (U) adalah jumlah histamin yang dihasilkan oleh setiap ml larutan enzim per jam dari setiap ml substrat histidin 0,05 M.

Penentuan konsentrasi optimum asam benzoat sebagai inhibitor enzim HDC

Penentuan konsentrasi optimum asam benzoat ditentukan dengan menambahkan asam benzoat dengan konsentrasi 10, 15, 20, 25, dan 30 mM ke dalam enzim kasar yang telah diperoleh. Penelitian dilakukan dengan 3 ulangan. Aktivitas enzim diukur dengan metode Hardy & Smith (1976).

Karakterisasi enzim HDC yang ditambah dengan asam benzoat sebagai inhibitor

Karakterisasi dilakukan terhadap enzim yang ditambah asam benzoat pada konsentrasi optimum. Diawali dengan memproduksi enzim HDC seperti yang telah disebutkan di atas, selanjutnya 500 mL enzim kasar yang diperoleh dipisahkan dengan ultrafiltrasi UFP-10-C-3MA 10 kDa dan menghasilkan filtrat sebanyak 70 mL (dengan 7 kali pemekatan).

Karakterisasi dilakukan dengan melihat pengaruh suhu, pH, dan ion logam. Variasi suhu yang digunakan adalah 25, 30, 35, 40, dan 45°C. Penentuan aktivitas enzim HDC dilakukan dengan mereaksikan sebanyak 1,0 mL ekstrak enzim kasar dengan 1,0 mL L-Histidin 0,05 M dan 2,0 mL bufer fosfat 0,1 M pada pH 6,8 selama 1 jam pada berbagai variasi suhu. Selanjutnya, aktivitas enzim dihentikan dengan cara pemanasan pada suhu 90°C selama 15 menit (Atmadjaja, 1994).

Untuk pH, variasi yang dibuat adalah 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; dan 8,0. Penentuan aktivitas enzim HDC dilakukan dengan mereaksikan sebanyak 1,0 mL ekstrak enzim kasar dengan 1,0 mL L-Histidin 0,05 M dan 2,0 mL bufer fosfat (dengan berbagai variasi pH) selama 1 jam pada suhu optimum.

Pengaruh ion logam diamati dengan menambahkan ion-ion Ba^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , dan Fe^{2+} dalam bentuk garam klorida (Cl_2). Penentuan aktivitas enzim HDC dilakukan dengan mereaksikan sebanyak 1,0 mL ekstrak enzim kasar dengan 1,0 mL L-Histidin 0,05 M dan 2,0 mL bufer fosfat pH 6,8, pada suhu optimum selama 1 jam dengan menggunakan substrat yang ditambah dengan ion-ion logam divalen dengan konsentrasi akhir 10 mM.

Untuk perlakuan pH dan ion logam, inaktivasi enzim sebelum pengukuran aktivitas dilakukan dengan cara yang sama dengan pada perlakuan suhu. Aktivitas enzim diukur menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 495 nm berdasarkan metode Hardy & Smith (1976). Percobaan ini dilakukan dengan 3 ulangan.

Aplikasi penghambatan kadar histamin pada ikan tongkol lisong (*Euthynnus affinis*)

Aplikasi penghambatan kadar histamin dengan menggunakan asam benzoat dilakukan pada ikan tongkol lisong (*Euthynnus affinis*). Ikan yang telah diuji bebas formalin dibawa dari pasar dalam kemasan stirofom bersama dengan es sesuai dengan persyaratan penanganan ikan, kemudian disortasi menurut ukuran dan kesegaran. Konsentrasi asam benzoat yang digunakan adalah 0,1%. Percobaan dilakukan dengan cara merendam ikan tongkol lisong

di dalam wadah yang berisi larutan asam benzoat 0,1% selama 30 menit, kemudian ikan diangkat dan ditiriskan. Selanjutnya ikan disimpan pada suhu kamar selama 8 jam. Untuk kontrol, perendaman dilakukan menggunakan akuades. Terhadap semua kelompok ikan, baik yang segar, kontrol, maupun yang diberi perlakuan dilakukan penentuan kadar histamin (SNI ICS 67.120.30., 2006), penghitungan jumlah bakteri pembentuk histamin (Poerwadi & Indriati, 1984), serta analisis kadar air dan pH (AOAC, 1980). Percobaan dilakukan dengan 3 ulangan.

HASIL DAN BAHASAN

Efektivitas Asam Benzoat Sebagai Inhibitor Enzim HDC

Efektivitas asam benzoat sebagai inhibitor enzim HDC diamati dengan menambahkan asam benzoat pada berbagai konsentrasi (10, 15, 20, 25, dan 30 mM) pada ekstrak enzim kasar yang diproduksi dari isolat A4. Ekstrak enzim kasar merupakan hasil fermentasi dalam medium sintetik menurut Omura *et al.* (1978), pada suhu 30°C, pH 6,8 dengan inkubasi pada penangas air goyang 125 rpm selama 8 jam. Hasil pengukuran aktivitas enzim HDC yang ditambah dengan berbagai konsentrasi asam benzoat dapat dilihat pada Gambar 1.

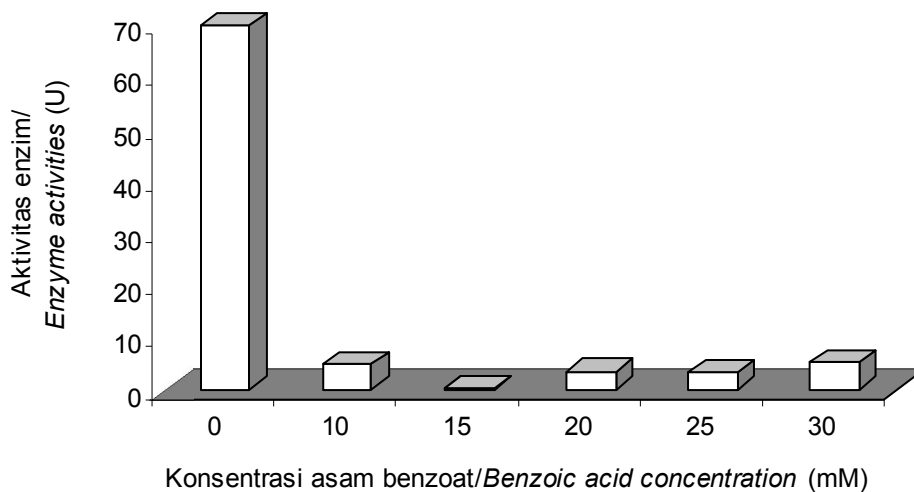
Gambar 1 menunjukkan bahwa penambahan asam benzoat pada konsentrasi 10, 15, 20, 25, dan 30 mM dapat menurunkan aktivitas enzim HDC dibandingkan dengan kontrol. Aktivitas enzim HDC dengan penambahan asam benzoat pada konsentrasi 10 mM sebesar 4,79 U; 20 mM sebesar 3,44 U; 25 mM

sebesar 3,25 U; dan 30 mM sebesar 5,08 U. Penambahan asam benzoat pada konsentrasi 15 mM mempunyai kemampuan menghambat tertinggi dengan aktivitas enzim sebesar 0,17 U. Sangat besar kemungkinan bahwa hal ini berkaitan dengan pH substrat, karena penambahan asam benzoat mempengaruhi pH substrat, sedangkan aktivitas enzim dipengaruhi oleh pH substrat.

Menurut Clark & Pogrund (1961) mekanisme penghambatan kelompok enzim dekarboksilase termasuk dalam tipe penghambat kompetitif. Penghambat kompetitif adalah sebuah substansi yang berikatan dengan enzim bebas untuk menghambat pengikatan substrat (Segel, 1975). Penghambat kompetitif juga berikatan pada situs katalitik, dan sering menunjukkan efek yang sama dengan substrat (Wiseman, 1978).

Hampir semua enzim dapat dihambat oleh senyawa kimia tertentu, yang disebut sebagai senyawa penghambat enzim (Lehninger, 1982). Penghambatan enzim HDC mengakibatkan tertundanya atau tidak terbentuknya produk sehingga mengakibatkan pengurangan atau bahkan tidak dihasilkannya histamin (Wendakoon & Sakaguchi, 1995).

Penelitian ini menunjukkan bahwa asam benzoat merupakan senyawa penghambat enzim HDC. Asam benzoat merupakan tipe asam lemah tetapi paling efektif digunakan sebagai senyawa pengawet (Warth, 1991). Penelitian yang dilakukan oleh Lane & Snell (1976) juga melaporkan bahwa 5,5'-*dithiobis* (2-nitrobenzoic acid) atau yang disingkat DTNB, yang merupakan senyawa turunan asam benzoat, dapat menghambat aktivitas enzim HDC secara kinetika



Gambar 1. Aktivitas enzim HDC yang diproduksi dari isolat A4 setelah ditambah dengan asam benzoat dengan berbagai konsentrasi, diukur pada suhu 30°C, pH 6,8.

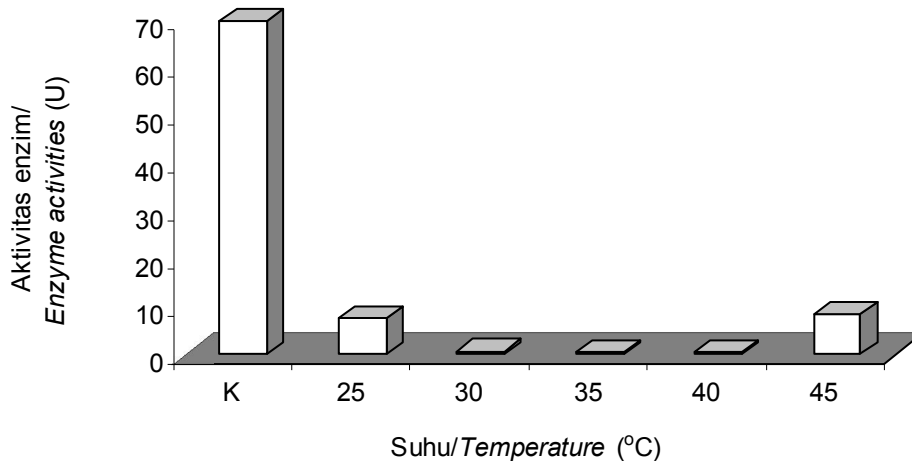
Figure 1. Activities of HDC enzyme produced from A4 isolate after addition of various concentrations of benzoic acid, measured at 30°C, pH 6.8.

pada proses *order* kedua ($K_{app} = 660 \pm 20 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ pada pH 7,6 dan suhu 25°C).

Karakterisasi Enzim HDC yang Diproduksi dari Isolat A4 Setelah Penambahan Asam Benzoat

Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim HDC

Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim HDC yang telah ditambah dengan asam benzoat pada konsentrasi 15 mM dapat dilihat pada Gambar 2.



K = kontrol tanpa penambahan asam benzoat/control without addition of benzoic acid

Gambar 2. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim HDC yang diproduksi dari isolat A4 dan telah ditambah dengan asam benzoat 15 mM, diukur pada suhu 30°C, pH 6,8.

Figure 2. Effect of temperature on the activity of HDC enzyme produced by A4 isolate after addition of 15 mM benzoic acid, measured at 30°C, pH 6.8.

Gambar 2 menunjukkan bahwa aktivitas enzim HDC yang telah ditambah dengan 15 mM asam benzoat dapat dihambat pada semua variasi suhu yang diujikan. Aktivitas enzim HDC yang ditambah dengan asam benzoat 15 mM pada suhu 25°C adalah sebesar 6,81 U; pada suhu 30°C sebesar 1,04 U; pada suhu 35°C sebesar 2,19 U; dan pada suhu 45°C sebesar 7,19 U. Aktivitas enzim HDC terendah adalah pada suhu 40°C, yaitu sebesar 0,09 U. Hasil ini menunjukkan bahwa dengan inhibitor asam benzoat, suhu optimum penghambatan adalah antara 30-40°C. Pada suhu 25°C dan 45°C aktivitasnya lebih tinggi dibandingkan suhu 30-40°C, namun aktivitas pada suhu 25°C dan 45°C tersebut hanya 10% dari enzim yang tidak diberi inhibitor.

Enzim merupakan senyawa yang labil terhadap panas dan dapat terdenaturasi oleh panas. Kenaikan suhu akan mengakibatkan cepatnya terjadi inaktivasi enzim (Reed, 1975). Penelitian yang dilakukan oleh Eitenmiller *et al.* (1982) melaporkan bahwa penurunan aktivitas enzim HDC terjadi pada suhu di atas 40°C.

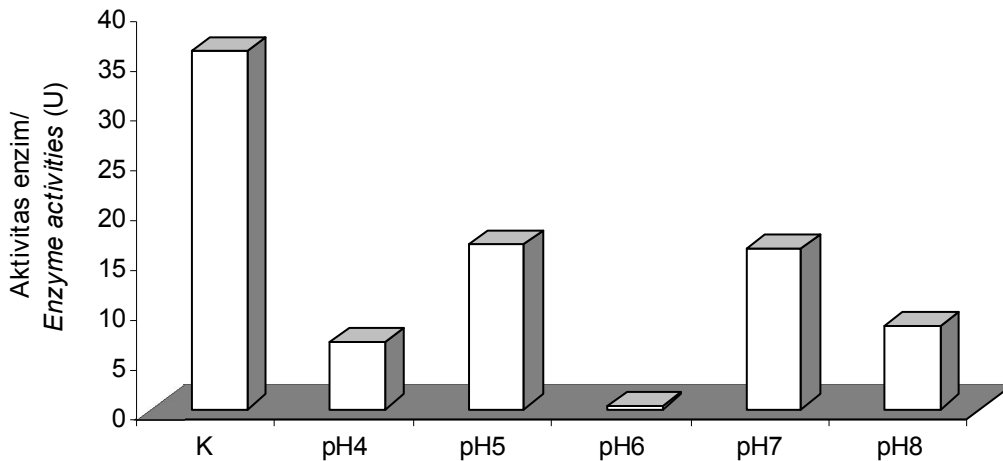
Akan tetapi, pada penelitian ini terlihat bahwa enzim HDC dapat dihambat dengan asam benzoat pada semua variasi suhu, dan pada suhu 40°C pengaruh penghambatan enzim HDC adalah yang terbesar dibandingkan perlakuan suhu yang lain. Hal tersebut menunjukkan ketidakstabilan (termolabil) enzim HDC (Eitenmiller *et al.*, 1982). Selain suhu, penurunan aktivitas enzim HDC yang ditambah dengan asam benzoat juga dapat terjadi karena terlalu banyak menyerap energi, sehingga struktur tersier enzim dan ikatan-ikatan yang mempertahankan konformasi, akan terputus dan terdenaturasi (Segel, 1975).

Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim HDC

Hasil dari karakterisasi pH enzim HDC yang ditambah dengan asam benzoat pada konsentrasi 15 mM suhu 40°C dapat dilihat pada Gambar 3.

Gambar 3 menunjukkan bahwa aktivitas enzim HDC yang ditambah dengan 15 mM asam benzoat dapat dihambat pada semua variasi pH yang diuji. Hasil pengamatan aktivitas enzim HDC pada pH 4,0 sebesar 6,71 U; pH 5,0 sebesar 16,42 U; pH 7,0 sebesar 16,13 U; dan pH 8,0 sebesar 8,35 U. Penghambatan tertinggi dicapai pada pH 6 dengan aktivitas enzim sebesar 0,27 U. Berkaitan dengan hal tersebut, Eitenmiller (1982) mengatakan bahwa aktivitas optimum untuk enzim HDC adalah pada pH sekitar 6. Hal itu kemungkinan besar merupakan pH optimum hubungan substrat-enzim. Dengan adanya inhibitor, hubungan tersebut dapat terganggu, oleh karena itu pada pH tersebut justru aktivitas enzim menjadi paling rendah.

Faktor pH mempengaruhi kombinasi antara enzim dan substrat, pH juga mempengaruhi kombinasi antara



K = kontrol tanpa penambahan asam benzoat/control without addition of benzoic acid

Gambar 3. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim HDC yang diproduksi dari isolat A4 dan ditambah dengan asam benzoat 15 mM, diukur pada suhu 40°C.

Figure 3. Effect of pH on the activity of HDC enzyme produced by A4 isolate after addition of 15 mM benzoic acid, measured at 40°C.

enzim dan inhibitor (Whitaker, 1972). Faktor pH mempengaruhi stabilitas enzim, pengikatan substrat dan reaksi katalisis. Perubahan pH akan mengakibatkan perubahan konsentrasi ion H⁺ dalam larutan. Hal tersebut akan mengakibatkan perubahan konformasi gugus aktif sehingga aktivitas katalitik enzim akan terganggu (Segel, 1975).

Kestabilan pH enzim juga dipengaruhi oleh faktor bufer yang sesuai dengan sifat kimiawinya. Pemilihan bufer yang tepat akan menentukan kondisi ionik pada saat pengujian aktivitas enzim, sehingga kondisi ionik yang tidak sesuai akan mempengaruhi hasil pengujian. Pada penelitian ini pengaturan pH dilakukan menggunakan bufer fosfat. Dari hasil yang diperoleh terlihat bahwa bufer fosfat sesuai digunakan untuk mengontrol aktivitas enzim HDC. Hal tersebut sejalan dengan penelitian yang dilakukan Atmadjaja (1994) dan Shakila *et al.* (1996) yang menguji aktivitas enzim dengan menggunakan bufer fosfat.

Pengaruh ion logam divalen terhadap aktivitas enzim HDC

Pengaruh ion-ion logam divalen pada konsentrasi 10 mM terhadap aktivitas enzim HDC yang ditambah dengan asam benzoat pada konsentrasi 15 mM, suhu 40°C, dan pH 6,0 bufer fosfat, dapat dilihat pada Gambar 4.

Gambar 4 menunjukkan bahwa aktivitas enzim HDC pada penambahan 15 mM asam benzoat dapat dihambat oleh semua jenis ion divalen pada konsentrasi 10 mM yang diujikan. Aktivitas enzim HDC pada penambahan ion Ba²⁺ sebesar 17,38 U;

ion Mg²⁺ sebesar 19,98 U; ion Mn²⁺ sebesar 12,58 U; ion Co²⁺ sebesar 40,56 U; ion Zn²⁺ sebesar 27,77 U; ion Cu²⁺ sebesar 14,12 U; dan ion Ca²⁺ 43,44 U. Penghambatan enzim tertinggi terjadi pada penambahan ion Fe²⁺ dengan aktivitas sebesar 0,27 U. Dengan demikian ion Fe²⁺ potensial digunakan untuk penghambatan pembentukan histamin.

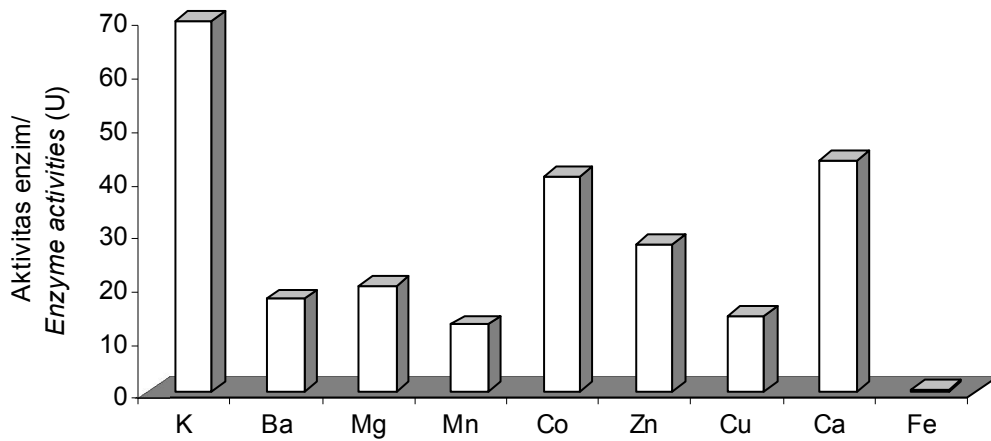
Ion logam memiliki peran yang penting sebagai aktivator bagi enzim dengan cara berikatan pada enzim dan mempengaruhi aktivitas enzim tersebut (Segel, 1975). Ion-ion logam divalen mempengaruhi konformasi pada gugus aktif enzim, sehingga enzim mampu melakukan aktivitas katalitik (Smith *et al.*, 1991).

Substansi kompleks apapun yang memindahkan atau tidak sebuah kation esensial dari sebuah apoenzim merupakan inhibitor dari enzim tersebut. Faktor penghambatan oleh ion juga dipengaruhi oleh pH dari enzim tersebut (Whitaker, 1972). Dalam hal tersebut, ion Fe²⁺ diduga merupakan ion penghambat enzim HDC yang dapat bekerja secara optimal pada pH dan suhu optimum penghambatan enzim HDC.

Aplikasi pada Ikan Tongkol lisong (*Euthynnus affinis*)

Jumlah bakteri pembentuk histamin

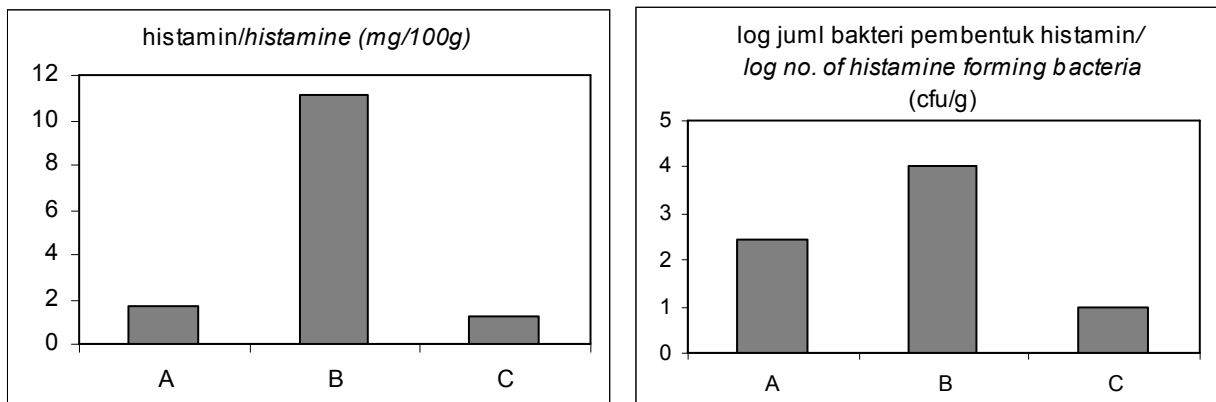
Pengaruh perendaman ikan tongkol segar selama 30 menit dalam larutan asam benzoat 0,1% kemudian disimpan selama 8 jam pada suhu ruang terhadap jumlah bakteri pembentuk histamin dapat dilihat pada Gambar 5. Gambar tersebut menunjukkan bahwa



K = kontrol tanpa penambahan asam benzoat dan ion logam divalen/
control without addition of benzoic acid and divalent metal ions

Gambar 4. Pengaruh ion-ion logam divalen pada konsentrasi 10 mM terhadap aktivitas enzim HDC yang diproduksi dari isolat A4 dan ditambah dengan asam benzoat 15 mM, diukur pada suhu 40°C, pH 6,8.

Figure 4. Effect of divalent metal ions at 10 mM on the activity of HDC enzyme produced by A4 isolate after addition of 15 mM benzoic acid, measured at 40°C, pH 6.8.



- A: ikan segar tanpa perlakuan, pengamatan langsung tanpa penyimpanan/untreated fresh fish, direct assessment without storage
 B: ikan direndam dalam akuades selama 30 menit, diamati setelah 8 jam pada suhu ruang/fish dipped in aquadest for 30 min, assessed after 8 hrs storage at room temperature
 C: ikan direndam dalam asam benzoat 0,1% selama 30 menit, diamati setelah 8 jam pada suhu ruang/fish dipped in 0.1% benzoic acid for 30 min, assessed after 8 hrs storage at room temperature

Gambar 5. Pertumbuhan bakteri pembentuk histamin dan produksi histamin pada ikan tongkol lisong (*Euthynnus affinis*).

Figure 5. Growth of histamine forming bacteria and the production of histamine on skipjack (*Euthynnus affinis*).

perlakuan perendaman pada 0,1% asam benzoat berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan jumlah bakteri pembentuk histamin. Pertumbuhan bakteri pembentuk histamin terbesar ditemukan pada ikan tongkol yang diberi perlakuan perendaman dalam akuades (kontrol) yaitu sebesar $13,5 \times 10^2$ cfu/g.

Perlakuan perendaman dalam asam benzoat menunjukkan jumlah bakteri yang jauh lebih rendah dibandingkan kontrol (pertumbuhan bakteri pembentuk histamin $<10^2$ cfu/g). Data yang diperoleh menunjukkan bahwa perlakuan dengan asam benzoat mampu menghambat pertumbuhan bakteri pembentuk

histamin hingga 75%. Hal tersebut diduga karena pH asam benzoat yang rendah (pH 3,66) dapat menghambat pertumbuhan bakteri pembentuk histamin, selain karena sifat asam benzoat yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri (Medikasari, 2002).

Proses pengasaman merupakan salah satu cara yang dilakukan untuk mengawetkan makanan (Fardiaz, 1992). Pada medium dengan pH rendah, bakteri akan bereaksi untuk mempertahankan pH konstan/optimum. Pada waktu pH turun dari pH optimum, proton yang terdapat dalam jumlah tinggi di dalam medium akan masuk ke dalam sitoplasma sel. Proton tersebut harus dihilangkan dari dalam sel untuk mencegah terjadinya pengasaman dan denaturasi komponen-komponen sel. Proses penghilangan proton tersebut memerlukan energi yang besarnya tergantung tinggi-rendahnya pH. Hal tersebut mengakibatkan energi untuk pertumbuhan sel menjadi berkurang, bahkan pertumbuhan bakteri dapat berhenti sama sekali (Fardiaz, 1992 *dalam* Dwiwitno *et al.*, 2005). Mekanisme penghambatan asam benzoat dimulai dengan absorpsi asam benzoat yang mempunyai pH rendah masuk ke dalam sel. Setelah mencapai sitoplasma (yang mempunyai pH antara 6,0 dan 7,0), akan terjadi proses disosiasi, sehingga menghasilkan basa konjugat. Pelepasan proton di dalam sitoplasma sangat potensial mengakibatkan keadaan asam di dalam sitoplasma tersebut, sehingga terjadi penghambatan pertumbuhan bakteri (Hazan *et al.*, 2004). Dalam hal ini, asam benzoat menghambat pertumbuhan bakteri pembentuk histamin.

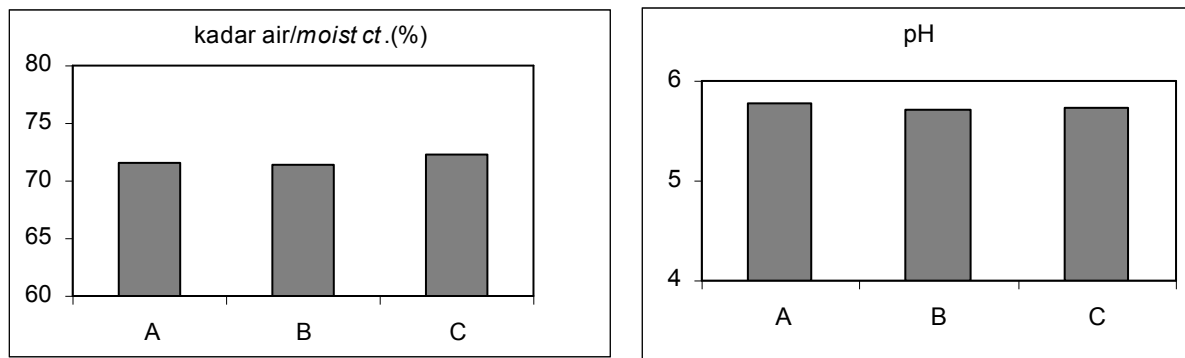
Kadar histamin

Pengaruh perlakuan perendaman ikan tongkol selama 30 menit dalam larutan asam benzoat 0,1% dan disimpan selama 8 jam pada suhu ruang terhadap kadar histamin dapat dilihat pada Gambar 5. Gambar tersebut menunjukkan bahwa perlakuan perendaman ikan tongkol selama 30 menit dalam larutan asam benzoat 0,1% yang disimpan selama 8 jam pada suhu ruang berpengaruh nyata terhadap kadar histamin ikan tongkol. Kadar histamin ikan tongkol segar yang digunakan dalam penelitian ini adalah 17,23 mg/100 g. Hal tersebut menunjukkan bahwa histamin telah ada pada ikan, dengan kadar yang rendah. Kadar histamin pada ikan yang diberi perlakuan ternyata lebih rendah, yaitu hanya 12,36 mg/100 g, sedangkan pada kontrol mencapai 111,25 mg/100 g. Hal tersebut menunjukkan bahwa asam benzoat dapat menghambat pembentukan histamin pada ikan hingga 88,9%. Ini berarti bahwa penghambatan pembentukan histamin tidak saja disebabkan oleh penghambatan pada pertumbuhan bakteri pembentuk histamin, tetapi juga karena asam benzoat dapat menghambat enzim HDC yang dihasilkan oleh bakteri.

Nilai pH

Pengaruh perlakuan perendaman ikan tongkol selama 30 menit dalam larutan asam benzoat 0,1% dan disimpan selama 8 jam pada suhu ruang terhadap pH ikan dapat dilihat pada Gambar 6.

Gambar 6 menunjukkan bahwa pH antara perlakuan ikan tongkol yang direndam dalam asam benzoat 0,1% selama 30 menit yang diinkubasi 8 jam



- A: ikan segar tanpa perlakuan, pengamatan langsung tanpa penyimpanan/*untreated fresh fish, direct assessment without storage*
- B: ikan direndam dalam akuades selama 30 menit, diamati setelah 8 jam pada suhu ruang/*fish dipped in aquadest for 30 min, assessed after 8 hrs storage at room temperature*
- C: ikan direndam dalam asam benzoat 0,1% selama 30 menit, diamati setelah 8 jam pada suhu ruang/*fish dipped in 0.1% benzoic acid for 30 min, assessed after 8 hrs storage at room temperature*

Gambar 6. Kadar air dan pH ikan tongkol lisong (*Euthynnus affinis*).
 Figure 6. Moisture content and pH of skipjack (*Euthynnus affinis*).

pada suhu ruang (pH 5,73), ikan tongkol yang direndam dalam akuades selama 30 menit sebagai kontrol yang diinkubasi 8 jam pada suhu ruang (pH 5,77) dan ikan segar (awal/jam ke-0) (pH 5,71) tidak berbeda nyata. Hal tersebut kemungkinan terjadi karena waktu perendaman yang singkat, sehingga tidak memungkinkan larutan asam meresap ke dalam daging ikan, melainkan hanya di permukaan saja (Dwiyitno *et al.*, 2005). Dengan tidak adanya perbedaan tersebut maka asam benzoat dapat digunakan tanpa mengganggu rasa ikan yang diperlakukan.

Kadar air

Pengaruh perlakuan perendaman ikan tongkol selama 30 menit dalam larutan asam benzoat 0,1% dan disimpan selama 8 jam pada suhu ruang terhadap kadar air ikan dapat dilihat pada Gambar 6.

Gambar 6 menunjukkan bahwa kadar air antara perlakuan ikan tongkol yang direndam dalam larutan asam benzoat 0,1% selama 30 menit sebesar 71,91%; perendaman ikan tongkol dalam akuades selama 30 menit sebagai kontrol sebesar 72,27%; dan ikan segar (awal/jam ke-0) sebesar 73,07%, tidak berbeda nyata. Hal tersebut menunjukkan bahwa asam benzoat tidak mempengaruhi kadar air ikan yang diperlakukan.

KESIMPULAN

- Penghambatan aktivitas enzim HDC dapat dilakukan dengan penambahan asam benzoat pada konsentrasi 10, 15, 20, 25, dan 30 mM, tetapi konsentrasi optimum asam benzoat untuk menghambat enzim HDC adalah 15 mM dengan aktivitas enzim sebesar 0,17 U.
- Karakterisasi enzim HDC yang diproduksi dari isolat A4, yang diidentifikasi sebagai *Enterobacter* sp., yang telah ditambah dengan asam benzoat 15 mM menunjukkan penghambatan optimum pada suhu 40°C, dan pH 6,0 bufer fosfat, dan adanya ion Fe²⁺.
- Aplikasi pada ikan dengan perlakuan perendaman ikan dalam 0,1% asam benzoat selama 30 menit, diikuti penyimpanan selama 8 jam pada suhu ruang, menunjukkan penghambatan pertumbuhan bakteri histamin maupun produksi histamin, sementara perlakuan tersebut tidak mempengaruhi kadar air dan pH ikan.

SARAN

Penelitian ini seyogyanya dilengkapi dengan kajian tentang mekanisme penghambatan enzim HDC oleh asam benzoat dan ditindak lanjuti dengan menguji cara aplikasi asam benzoat yang terbaik di lapangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Allen Jr, D.G. 2004. *Regulatory Control of Histamine Production in North Carolina Harvested Mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) and Yellow Fin Tuna (*Thunnus albacares*): A HACCP-based industry survey*. Thesis Graduated Faculty of North Carolina State University, Raleigh. 91 pp.
- Anonim. 2005. Pengolahan pangan. www.iptek.net.id. Diakses tanggal 27 Desember 2005.
- Anonymous. 2008. *NCI Database Query Result Table: NSC Number 8444*. caches.nci.nih.gov/ggi-bin/nciz/tcl?opi=nscl. Diakses tanggal 19 Maret 2008.
- Antoine, FR., Wei, Cl., Little, RC., and Marshall, MR. 1999. HPLC method for analysis of free amino acids in fish using o-phthaldialdehyde precolumn derivatization. *J. of Agric. and Fd Chem.* 47(12): 5100–5107.
- AOAC. 1980. *Official Methods of Analysis*. 13th ed. Association Official of Analytical Chemist. Washington DC. 1018 pp.
- Atmadjaja, J.S. 1994. *Isolasi dan Identifikasi Morganella morganii JD-37 Sebagai Bakteri Pembentuk Histamin dari Ikan Tongkol (Euthynnus sp.)*. Thesis. PPS-UGM. 57 pp.
- Badan Pengawasan Obat dan Makanan. 2002. *Panduan Pengolahan Pangan yang Baik Bagi Industri Rumah Tangga – Amankan dan Bebaskan Produk dari Bahan Berbahaya*. Direktorat Surveilans dan Penyuluhan Keamanan Pangan, Jakarta. 24 pp.
- Bennour, M., A.E. Marrakchi, N. Bouchriti, A.Hamama, and M.E.Ouadaa. 1991. Chemical and microbiological assessment of mackerel (*Scomber scombrus*) stored in ice. *J. Food Prot.* 54: 789 – 792.
- Clark, W.G., and R.S.Pogrud. 1961. Inhibition of DOPA decarboxylase in vitro and in vivo. *J. of American Heart Association.* 9: 721–733.
- Coton, E., G.C.Rollan, and A.Lonvaud-Funnel. 1998. Histidine decarboxylase of *Leuconostoc eonos* 9204: purification, kinetic properties, cloning and nucleotide sequence of the HDC gene. *J. of Appl. Microbiology.* 84: 143–151.
- Dwiyitno, Ariyani, F., Kusmiyati, T., dan Harmita. 2005. Perlakuan perendaman dalam larutan asam untuk menghambat perkembangan histamin pada pindang ikan lisong (*Scomber australasius* CV). *J. Penel. Perik. Indonesia*. Jakarta. 11(8): 1–8.
- Eitenmiller, R.R., Orr, J.H., and Wallis, W.W. 1982. Histamine formation in fish: microbiological and biochemical conditions. In Martin, R.E., Flick, G.J. and Hebard, C.E. (eds.). *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Product* AVI Publishing.Co. p. 39–50.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pengolahan Pangan Lanjut*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Institut Pertanian Bogor, Bogor. 283 pp.
- Gonowiak, Z, R. Gajewska, and E. Lipka. 1990. Histidine decarboxylase activity and free histidine and histamine levels in fish meat. *Pantstw Zokl Hiq.* 41(1-2): 50–57.

- Hardy, R. and Smith, J.G.M. 1976. The storage of mackerel (*Scomber scombus*). Development of histamine and rancidity. *J. Sci. Food.* 27: 595–599.
- Hazan, R., Levine, A., and Abeliovich, H. 2004. Benzoic acid, a weak organic acid food preservative, exert specific effect on intracellular membrane trafficking pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *App. Environ. Microbiol.* 70(8): 4449–4457.
- Ko, IS. 2006. *Factors affecting histamine level in Indonesian canned albacore tuna (Thunnus alalunga)*. Thesis. Dep. Of Marine Biotechnology. Norwegian College of Fishery Science, Univ. of Tromso, Norway. 64 pp.
- Krebs, H.A., Wiggins, D., Stubbs, M., Sols, A., and Bedoya, F. 1983. Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochem. J.* 214: 657–663.
- Lane, R.S. and Snell, E.E. 1976. Histidine decarboxylase of *Lactobacillus* 30a: function and reactivity of sulfhydryl groups. *Biochemistry.* 15(19): 4175–4179.
- Lehane, L. and Olley, J. 1999. *Histamine (Scombroid) Fish Poisoning. A review in a risk – assessment framework*. National Office of Animal and Plant Health, Canberra: iv + 80 pp.
- Lehninger, A.L. 1982. *Dasar-dasar Biokimia*. Terj: M. Thenawijaya. Penerbit Erlangga. Jakarta. xv + 369 pp.
- Lukton, A. and Olcott, HS. 1958. Content of free imidazole compounds in the muscle tissue of aquatic animals. *J. of Fd Res.* 23: 518–611.
- Medikasari. 2002. Bahan Tambahan Makanan. Fungsi dan Penggunaannya dalam Makanan. *Makalah Falsafah Sains* (PPs 702). Program Pascasarjana/S3. Institut Pertanian Bogor. 14 pp.
- Omura, Y., Price, R.J., and Olcott, H.S. 1978. Histamine forming bacteria isolated from skipjack tuna and jack mackerel. *J. Food. Sci.* 43: 1779–1781.
- Ozogul, F., Polat, A., and Ozogul, Y. 2004. The effect of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardinella pilchardus*). *J. Food. Chem.* 85(1): 49–57.
- Perez-Martin, RI., Franco, JM., Aubourg, S., and Gallardo, JM. 1988. Changes in free amino acids content in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during thermal processing. *European Fd Res. And Tech.* 187(5): 678–682.
- Poerwadi and Indriati, N. 1984. *A Preliminary Study of Bacteria and Histamine Production in Dried Salted Chub Mackerel (Rastrelliger neglectus) from Indonesia*. Report on visit by RIFT personnel to Hobart, Tasmania (Australia). Uni. of Tasmania, CSIRO, ACIAR.
- Reed, G. 1975. Effect of temperature and pH. In Reed, G. (ed.). *Enzymes in Food Processing*. 2nd ed. Academic Press. New York: xvi + 573 pp.
- Rodriguez-Caso, C., Rodriguez-Agudo, D., Sánchez-Jiménez, F., and Medina, MA. 2003. Green tea epigallocatechin-3-gallate is an inhibitor of mammalian histidine decarboxylase. *Cell Mol Life Sci. Springerlink.* 60(8): 1760–1763.
- Segel, I.H. 1975. *Enzyme kinetics. Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-state Enzyme Systems*. John Wiley & Sons Inc. New York. xxii + 957 pp.
- Shakila, R.J., Vasundhara, T.S., and Rao, D.V. 1996. *Inhibitory Effect of Spices on in Vitro Histamine Production and Histidine Decarboxylase Activity of Morganella morganii and on the Biogenic Amine Formation in Mackerel Stored at 30°C*. Springer-Verlag. 203: 71–76.
- Smith, D., Burgin, A.B., Haas, E.S., and Pace, N.R. 1991. Influence of metal ions on the ribonuclease P reaction: distinguishing substrate binding from catalysis. *The J. of Biol. Chem.* 267(4): 2429–2436.
- SNI ICS 67.120.30. 2006. Cara uji kimia – Bagian 6: *Penentuan Kadar Histamin pada Produk Perikanan dengan Spektrofluorometri dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) pada Produk Perikanan*. Badan Standarisasi Nasional. ii + 7 pp.
- Warth, A.D. 1991. Mechanism of action of benzoic acid on *Zygosaccharomyces bailii*: Effect on glycolytic metabolite levels, energy production, and intracellular pH. *App. Environ. Microbiol.* 57(12): 3410–3414.
- Wendakoon, C.N., and M. Sakaguchi. 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J. Food Prot.* 58(3): 280–283.
- Whitaker, J.R. 1972. *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. Marcel Dekker Inc. New York. xiv + 636 pp.
- Wiseman, A. 1978. Stabilisation of enzymes. In Wiseman, A. (ed). *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*. 2nd ed. Ellis Horwood Limited, Chichester. 308 pp.