

## **Kesan air EO (*electrolyzed-oxidizing*) terhadap pertumbuhan bacteria penghasil histamin dan pembentukan histamin dalam ikan segar**

(Effects of electrolyzed-oxidizing water on histamine producing bacterial growth and histamine production in fresh fish)

Mohd Effendi Mohamed Nor dan Yangmurni Zamani

### **Pendahuluan**

Histamin adalah sebatian molekul kimia toksik yang terbentuk daripada proses enzimatik molekul kimia histidin dalam makanan oleh enzim *histidine decarboxylase*. Pencemaran histamin selalu berlaku di dalam ikan segar atau produk berasaskan ikan yang telah tercemar. Daging ikan terutamanya daripada kelas Scombroidea seperti tuna, sardin, ikan kembung (*mackerel*), tenggiri, *bonito*, *sauri*, ikan todak dan ikan layar mengandungi histidin bebas yang banyak di dalam tisu-tisu otot. Proses pembentukan histamin daripada histidin bebas ini berlaku apabila ikan-ikan segar ini tercemar oleh spesies bacteria penghasil histamin akibat daripada cara penyimpanan ikan segar yang tidak betul. Antara bacteria penghasil histamin yang paling kerap dikaitkan dengan pencemaran histamin ialah *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumonia* dan *Enterobacter aerogenes*.

Bacteria ini didapati daripada kulit dan insang ikan tercemar. Pencemaran bacteria ini berlaku apabila ikan segar yang telah ditangkap, tidak disimpan dengan cara yang betul pada suhu simpanan melebihi 7.2 °C. Bacteria ini mempunyai enzim *histidine decarboxylase* yang akan menjalankan proses menukarkan histidin bebas di dalam daging ikan kepada histamin. Pengumpulan histamin bertambah apabila ikan-ikan segar ini dicemari bacteria dalam jangka masa yang lama. Apabila ikan telah dicemari dengan histamin, ia tidak dapat dimusnahkan walaupun dengan cara memasak, menyejuk beku, mengasap atau proses haba yang tinggi sekalipun.

Pengumpulan histamin ini juga boleh berlaku semasa ikan segar dinyahbeku dalam masa yang agak lama pada suhu bilik sebelum sesuatu pemprosesan makanan dilakukan. Pemprosesan makanan daripada ikan yang sudah tercemar dengan histamin menyebabkan hasil produk-produk tersebut membahayakan pengguna. Simptom-simptom keracunan histamin pada badan manusia antaranya adalah muka menjadi kemerah-merahan, sakit kepala, mual-mual, sesak nafas, pengsan dan rasa seperti terbakar di dalam mulut dan tekak.

Kajian daripada sekumpulan penyelidik dari Universiti Sains Malaysia (USM) telah menemui 58% budu yang belum diproses daripada 12 pengilang berbeza mengandungi kandungan histamin yang tinggi iaitu 50 mg/100 g sampel, melebihi aras histamin yang dibenarkan oleh *United States Food and Drug Administration* (FDA) iaitu 50 mg/kg (FDA, 2001). Kajian SIRIM Berhad pula menemui kandungan histamin yang tinggi di dalam bebola ikan yang dijual di beberapa pasar malam tempatan melebihi 100 mg/kg. Penemuan ini sangat membimbangkan kerana budu dan bebola ikan merupakan makanan yang digemari ramai.

Penyimpanan dan pengendalian ikan segar pada suhu bawah 4 °C dengan segera bermula selepas tangkapan di atas kapal sehingga pemprosesan makanan merupakan cara yang terbaik untuk mengelakkan kontaminasi bakteria penghasil histamin, seterusnya menghalang pembentukan histamin. FDA menyarankan ikan perlu disimpan sejuk (< 4 °C) sejeurus selepas mati. FDA turut mengeluarkan aras yang mengehadkan kandungan histamin tidak melebihi 50 mg/kg di dalam ikan yang selamat dimakan. Bagaimanapun, pendedahan ikan segar kepada peningkatan suhu melebihi 8 °C dan kontaminasi bakteria semasa pengangkutan dan jualan tidak dapat dielakkan sepenuhnya. Dengan itu, kaedah rawatan lepas tuai untuk mengelakkan kontaminasi bakteria dan pembentukan histamin perlu dilakukan pada peringkat sama ada selepas proses tangkapan, semasa pengangkutan atau semasa jualan ikan segar.

#### **Air EO (*electrolyzed-oxidizing*)**

Penghasilan air EO merupakan teknologi yang masih baharu di Malaysia. Air EO mula dicipta dan diperkenalkan di Jepun sekitar tahun 1980-an untuk menyahjangkit bakteria pada alatan dan mesin pemprosesan makanan dalam industri pemprosesan makanan dan peralatan perubatan sebelum diaplikasikan oleh pengusaha industri makanan untuk membersihkan bahan-bahan mentah seperti ikan, ayam, daging segar, sayur-sayuran dan buah-buahan yang digunakan untuk memproses produk makanan.

Air EO dihasilkan melalui proses elektrolisis terhadap larutan garam (natrium klorida, NaCl) pada kepekatan tertentu menggunakan mesin penjana air EO. Proses elektrolisis mengubah natrium klorida kepada asid hipoklorus (HOCl) dan asid hidroklorik (HCl). Air EO yang terhasil mempunyai pH bawah 3.0 dan klorin bebas yang memberi ciri-ciri antibakteria. Walaupun mempunyai nilai pH yang rendah, air EO tidak bersifat menghakis dan tidak merosakkan kulit, membran mukus dan bahan organik. Air EO adalah selamat digunakan dan tidak memberi kesan buruk kepada kesihatan kerana dihasilkan hanya menggunakan air dan garam, selain tidak memerlukan kos yang tinggi.

United States Environmental Protection Agency (EPA) telah membenarkan air EO digunakan dalam industri makanan. Terdapat beberapa kajian yang membuktikan air EO adalah selamat dan berkesan mengurangkan populasi pelbagai patogen makanan dan kulat dalam pelbagai jenis makanan segar, terproses dan juga permukaan pemprosesan makanan.

### **Kesan air EO terhadap bakteria penghasil histamin pada ikan segar**

Aktiviti penyelidikan ini dijalankan dengan objektif untuk menilai keberkesanan air EO dalam mengurangkan kontaminasi bakteria penghasil histamin, seterusnya mengurangkan kandungan histamin di dalam ikan segar.

Ikan kembung dipilih sebagai sampel kajian kerana berasal daripada kumpulan Scombroidae yang mempunyai histidin bebas yang banyak di dalam otot. Air EO yang digunakan dihasilkan daripada empat larutan natrium klorida (NaCl) yang berbeza kepekatan iaitu 4, 6, 8 dan 10% menggunakan mesin penjana air EO (Aqua Tec Saraya Co. Ltd. Japan) (*Gambar 1*). Kesemua air EO yang terhasil mempunyai nilai pH 2.8 dan 20 ppm klorin bebas.

Sampel ikan segar dipotong kepada bentuk filet dengan berat 10 g sebelum dikontaminasikan dengan 100  $\mu$ l stok kultur bakteria penghasil histamin berkepekatan  $10^7$  cfu yang telah dihidupkan semalaman. Bakteria penghasil histamin yang digunakan ialah *Klebsiella pneumonia* dan *Morganella morganii* yang dibeli daripada pembekal berdaftar. Sampel ikan segar yang telah dijangkiti, dibiarkan selama 60 minit pada suhu bilik sebelum rawatan dijalankan. Rawatan terhadap sampel ikan segar yang telah diinokulasi dilakukan dengan merendam sampel di dalam 100 ml air EO selama 60 minit (*Gambar 2*). Selepas 60 minit rendaman, sampel dituskan dan dibungkus dengan bekas polisterina (*Gambar 3*) sebelum analisis mikrobiologi dan histamin dijalankan.

Bagi pengambilan data koloni bakteria, sampel ikan yang telah dirawat, ditimbang (10 g) dan digoncang di dalam beg stomacher yang mengandungi 90 ml larutan reagen Ringers menggunakan stomacher sebelum



*Gambar 1. Mesin penjanaan air EO (Aqua Tec Saraya Co. Ltd. Japan)*



*Gambar 2. Sampel ikan dipotong kepada bentuk filet, dirawat dengan kaedah rendaman di dalam air EO*

dipindahkan ke dalam botol Schott. Pencairan bersiri  $10^1$  hingga  $10^5$  dilakukan menggunakan larutan reagen Ringers. Sebanyak 1 ml daripada setiap pencairan dipindahkan ke dalam piring petri sebelum dicurahkan dengan medium pertumbuhan untuk bakteria penghasil histamin. Medium pertumbuhan dibiarkan mengeras sebelum dieram di dalam inkubator pada suhu  $35\text{ }^\circ\text{C}$  selama 48 jam. Koloni berwarna ungu dengan bulatan halo di sekeliling yang tumbuh di dalam piring petri dikira sebagai bakteria penghasil histamin (*Gambar 4*).

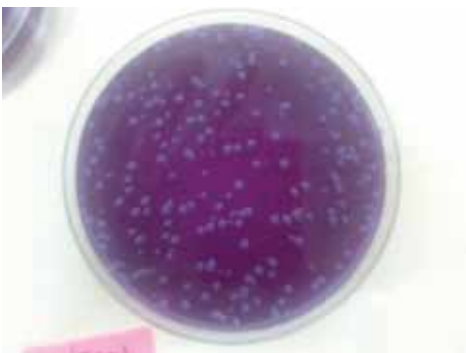
Kandungan histamin yang terhasil di dalam sampel ikan dikesan menggunakan *Histamine ELISA Diagnostic Kit* (*Taiwan Advance Bio-Pharmaceutical Inc.*) (*Gambar 5*). Kandungan histamin dibaca menggunakan *microplate reader* dan peratusan histamin dikira.

Kesan air EO terhadap kualiti sensori ikan juga dinilai menerusi analisis sensori 9-poin Skala Hedonik (1 sangat tidak menyukai hingga 9 sangat menyukai). Sampel ikan yang dibasuh dengan air EO dinilai dari segi warna, bau, rasa, kesegaran, tekstur dan penerimaan keseluruhan oleh 25 panel terlatih dan dibandingkan dengan sampel ikan yang dibasuh dengan air paip.

Analisis mikrobiologi yang dijalankan menunjukkan sampel ikan yang dirawat dengan air EO berlaku pengurangan jumlah populasi kedua-dua bakteria penghasil histamin yang lebih banyak berbanding dengan sampel ikan yang dirawat dengan air suling (*Jadual 1*). Pengurangan populasi *K. pneumoniae* adalah paling tinggi pada sampel ikan yang dirawat air EO 10% iaitu 3.29 log cfu/g, diikuti sampel yang dirawat air EO 6% dan 8% dengan 3.0 log cfu/g. Sampel ikan yang dirawat air EO 4%



*Gambar 3. Sampel ikan yang telah dirawat, ditus dan dikeringkan sebelum analisis mikrobiologi dan histamin dijalankan*



*Gambar 4. Koloni berwarna ungu dengan halo ungu di sekelilingnya yang tumbuh di atas agar Niven ialah bakteria penghasil histamin*



*Gambar 5. Histamine ELISA Diagnostic Kit digunakan dalam menentukan kandungan histamin yang terhasil di dalam sampel ikan*

mencatatkan pengurangan paling sedikit iaitu 2.23 log cfu/g sahaja. Sampel yang dirawat dengan air suling pula mencatatkan pengurangan populasi *K. pneumoniae* sebanyak 0.78 – 2.51 log cfu/g. Bagi populasi *M. morgani* pula, pengurangan paling banyak berlaku pada sampel ikan yang dirawat dengan air EO 6% iaitu sebanyak 3.16 log cfu/g, diikuti sampel yang dirawat dengan air EO 8% dengan 2.94 log cfu/g dan sampel ikan yang dirawat dengan air EO 10% sebanyak 2.46 log cfu/g. Air EO 4% mencatatkan pengurangan populasi paling sedikit iaitu 2.01 log cfu/g. Sampel yang dirawat dengan air suling pula mencatatkan pengurangan populasi *M. morgani* sebanyak 0.18 – 2.49 log cfu/g. Jumlah klorin bebas yang terhasil dalam keempat-empat air EO adalah sama iaitu 20 ppm walaupun berbeza kepekatan NaCl yang digunakan (4, 6, 8 dan 10%). Nilai pH keempat-empat air EO juga sama iaitu 2.8. Ini menunjukkan kepekatan garam tidak mengubah nilai pH dan jumlah klorin bebas di dalam air EO. Ini bermakna kepekatan garam yang rendah sudah memadai untuk menghasilkan air EO. Pengurangan pertumbuhan bakteria penghasil histamin di dalam sampel ikan yang dirawat air EO menyebabkan penghasilan dan pengumpulan histamin di dalam sampel ikan segar juga berkurang (*Rajah 1*). Air EO telah merencat penghasilan histamin oleh bakteria *K. pneumoniae* dan *Morganella morgani* masing-masing sebanyak 28.56 – 36.16 mg/kg dan 15.56 – 27.86 mg/kg.

Analisis sensori pula mendapati air EO tidak mengubah kualiti dan nilai rasa sampel ikan (mentah dan dimasak). Semua nilai rasa yang diuji iaitu warna, kesegaran, rasa, bau, tekstur dan penerimaan keseluruhan oleh 25 panel terlatih menunjukkan tiada perbezaan antara ikan yang dibasuh dengan air EO dengan sampel ikan yang dibasuh menggunakan air paip (*Jadual 2*). Ini menunjukkan walaupun air EO mempunyai pH yang rendah, tetapi ia tidak bersifat menghakis atau merosakkan kesegaran dan tekstur isi ikan. Kajian yang telah dilakukan membuktikan aktiviti antibakteria air EO terhadap pelbagai jenis patogen makanan seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*,

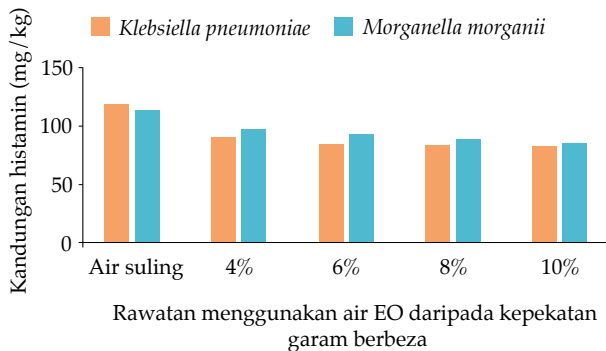
Jadual 1. Populasi bakteria penghasil histamin pada sampel ikan yang dirawat menggunakan air suling dan air EO yang berbeza

Rawatan	Populasi bakteria (log cfu/g)	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Morganella morgani</i>
	4%	
Populasi awal	7.38 ± 0.03	6.66 ± 0.03
Air suling	6.61 ± 0.08	6.84 ± 0.17
Air EO	5.15 ± 0.12	4.65 ± 0.09
	6%	
Populasi awal	7.81 ± 0.18	7.74 ± 0.03
Air suling	6.30 ± 0.08	6.25 ± 0.08
Air EO	4.80 ± 0.03	4.78 ± 0.06
	8%	
Populasi awal	7.25 ± 0.03	8.05 ± 0.03
Air suling	5.69 ± 0.12	6.06 ± 0.06
Air EO	4.25 ± 0.08	5.11 ± 0.01
	10%	
Populasi awal	7.96 ± 0.02	7.93 ± 0.03
Air suling	5.86 ± 0.11	6.14 ± 0.07
Air EO	4.67 ± 0.07	5.47 ± 0.08

*Enterobacter aerogenes* dan *Vibrio parahaemolyticus*. Kajian ini dilakukan pada pelbagai jenis makanan segar seperti daging, ayam, ikan, makanan laut, sayuran, buah-buahan dan juga pada permukaan pemprosesan makanan seperti papan pemotong, kaca, besi tahan karat dan seramik.

Sifat antibakteria air EO terletak pada pH yang rendah dan kehadiran klorin bebas di dalamnya. Secara umum, bakteria mampu hidup pada pH 4 – 9 dan pH yang rendah pada air EO (< 3) membunuh bakteria. Walaupun mempunyai pH yang rendah seperti asid, tetapi air EO tidak bersifat menghakis. Ini dibuktikan oleh beberapa kajian, antaranya rendaman daun salad di dalam air EO yang mempunyai 50 ppm klorin selama tiga minit tidak memberi kesan kepada ciri-ciri kualiti seperti warna dan kesegaran. Begitu juga rendaman sayur tauge, tomato, epal yang dipotong di dalam air EO selama beberapa minit tidak menyebabkan kerosakan pada warna dan kesegaran.

Air EO adalah selamat dan tidak menjejaskan persekitaran. Air EO yang bercampur dengan air paip akan bertukar menjadi air biasa dan tidak membahayakan kesihatan pengguna serta alam sekitar. Penggunaan air EO juga tidak memerlukan kos yang tinggi. Kajian menyebut kos penghasilan air EO adalah sekitar 5.3 Yen/L bersamaan RM0.20, lebih murah daripada penggunaan bahan sanitasi kimia seperti formaldehid atau asid organik.



Rajah 1. Kandungan histamin di dalam sampel ikan selepas dirawat menggunakan air suling dan air EO yang berbeza

Jadual 2. Nilai sensori sampel ikan yang dirawat air EO

Rawatan	Warna	Kesegaran/rasa	Bau	Tekstur	Penerimaan keseluruhan
Ikan mentah					
Air paip	6.83 ± 1.01	6.93 ± 0.82	6.63 ± 1.35	7.13 ± 1.13	6.83 ± 1.08
Air EO	6.76 ± 1.67	6.63 ± 1.54	6.16 ± 1.53	6.56 ± 1.43	6.43 ± 1.54
Ikan dimasak					
Air paip	6.83 ± 1.51	6.86 ± 1.10	7.10 ± 1.12	7.13 ± 1.07	7.03 ± 1.03
Air EO	6.53 ± 1.13	6.60 ± 1.63	6.70 ± 1.02	6.86 ± 1.25	6.60 ± 1.47

## **Kesimpulan**

Daripada analisis mikrobiologi dan kimia yang telah dijalankan, dapat disimpulkan bahawa air EO dapat mengurangkan populasi bakteria penghasil histamin dan boleh mengurangkan kandungan histamin di dalam ikan segar. Larutan garam serendah 6% didapati sudah mencukupi untuk menjadikan air EO berpotensi sebagai disinfektan untuk membasuh atau merawat ikan segar selepas tangkapan dan semasa proses pengangkutan dan jualan di pasaran. Dengan kos yang rendah dan tidak membahayakan kesihatan, penggunaan air EO sudah tentu tidak membebankan nelayan atau penjual ikan di pasar raya.

## **Penghargaan**

Projek ini merupakan salah satu aktiviti penyelidikan bawah Projek Mega P160 dengan pembiayaan Projek Pembangunan MARDI. Pengarang juga ingin merakamkan penghargaan kepada ketua projek, Dr. Mohamad Shafit bin Hussain dan ahli projek dalam menjayakan aktiviti penyelidikan ini.

## **Bibliografi**

- Food and Drug Administration (FDA) (2001). Fish and Fisheries Products Hazards and Control Guidance, 4<sup>th</sup> edition. Chapter 7: Scombrototoxin (Histamine) Formation. Diambil dari <https://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM252400.pdf>.
- Huang, Y.R., Hung, Y.C., Hsu, S.Y., Huang, Y.W. dan Hwang, D.F. (2008). Application of electrolyzed water in the food industry. *Food Control* 19: 329 – 345
- Niven, C.F., Jeffrey, M.B. dan Corlett, D.A. (1981). Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 41: 321 – 322
- Subrota, H., Surajit, M., Minz, P.S., Shilpa, V., Yogesh, K., Singh, B.P. dan Dipika, Y. (2012). Electrolyzed oxidized water (EOW): Non-thermal approach for decontamination of food borne microorganisms in food industry. *Food and Nutrition Sciences* 3: 760 – 768

## Ringkasan

Air EO (*electrolyzed-oxidizing*) telah diiktiraf sebagai bahan sanitasi dan pembasmi kuman yang selamat dalam industri makanan di Jepun. Manakala alat penjana air EO (*electrolyzed oxidizing water generator*) pula telah dibenarkan dalam industri makanan oleh *US Environmental Protection Agency* (EPA). Objektif kajian ini untuk menilai keberkesanan air EO dalam merencat pertumbuhan bakteria penghasil histamin di dalam ikan segar, seterusnya merencat penghasilan histamin dalam isi ikan. Dalam kajian ini, air EO dihasilkan daripada larutan natrium klorida (NaCl) dengan empat kepekatan berbeza iaitu 4, 6, 8 dan 10% menggunakan mesin penjana air EO. Semua larutan NaCl menghasilkan air EO dengan pH 2.8 dan 20 ppm klorin bebas. Sampel ikan kembung dipotong (bentuk filet) sebelum diinokulasikan dengan  $10^7$  cfu bakteria penghasil histamin iaitu *Klebsiella pneumoniae* dan *Morganella morganii*. Sampel ikan yang telah dijangkiti seterusnya dirawat dengan air EO dan pertumbuhan bakteria penghasil histamin dan kandungan histamin ditentukan. Air EO mengurangkan populasi *K. pneumoniae* dan *Morganella morganii* masing-masing 2.23 – 3.29 log cfu dan 2.01 – 3.16 log cfu. Air EO juga membantu merencatkan penghasilan histamin di dalam sampel ikan oleh bakteria *K. pneumoniae* dan *Morganella morganii* masing-masing sebanyak 28.56 – 36.16 mg/kg dan 15.56 – 27.86 mg/kg. Air EO didapati tidak mengubah kualiti sensori sampel ikan, di mana nilai sensori yang diuji seperti warna, bau, tekstur, kesegaran, rasa dan penerimaan keseluruhan tidak berbeza dengan sampel ikan yang dibasuh dengan air paip. Maka dapat disimpulkan bahawa rawatan menggunakan air EO dapat mengurangkan pertumbuhan bakteria penghasil histamin seterusnya menghalang pembentukan histamin di dalam ikan segar di samping masih mengekalkan kualiti sensori ikan.

## Summary

Electrolyzed-oxidizing (EO) water has been approved as safe sanitizer and disinfectant in food industries in Japan. US Environmental Protection Agency (EPA) had officially allowed the usage of EO water generator in food industries. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of EO water in inhibition of histamine-producing bacterial growth in fresh fish, thus inhibit histamine production in fish flesh. In this study, EO water was produced from 4 different concentrations of sodium chloride (NaCl) solution, using EO water generator. These four different concentrations of NaCl solution produced pH 2.8 and 20 ppm free chlorine EO water. Mackerel samples were cut into fillet before been inoculated with  $10^7$  cfu of histamine-producing bacteria, *Klebsiella pneumoniae* and *Morganella morganii*. Inoculated samples were then treated with EO water and the bacterial



growth and histamine production were evaluated. EO water reduced the population of *K. pneumoniae* and *M. morgani* in samples by 2.23 – 3.29 log cfu and 2.01 – 3.16 log cfu, respectively. EO water also suppressed histamine production in fish samples by *K. pneumoniae* and *M. morgani* as much 28.56 – 36.16 mg/kg and 15.56 – 27.86 mg/kg, respectively. By washing the fish samples with EO water, it doesn't change sensory characteristics of the fish samples, whereas sensory attributes tested (colour, smell, texture, freshness, flavour and overall acceptance) were not significantly different from fish samples washed with tap water. It can be concluded that EO water treatment can reduce histamine-producing bacterial growth, thus suppressed histamine production in fish flesh, besides sustaining the sensory characteristics of the fish.

**Pengarang**

Mohd Effendi Mohamed Nor

Pusat Penyelidikan Sains Teknologi Makanan, Ibu Pejabat MARDI,  
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

E-mel: effendi@mardi.gov.my

Yangmurni Zamani

Pusat Penyelidikan Sains Teknologi Makanan, Ibu Pejabat MARDI,  
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor