Sains Malaysiana 53(1)(2024): 171-188
http://doi.org/10.17576/jsm-2024-5301-14

Kesan Transglutaminase kepada Ciri Fizikokimia dan Aktiviti Biologi Hidrolisat Sarang Burung Walit

(Effect of Transglutaminase towards Physicochemical Properties and Biological Activities of Edible Bird's Nest Hydrolysates)

KOH SHI YUN[1], ZHI YIN TER[1], RAFIDAH MOHD ARIFF[1,4], NUR FARHANA ABD RAHMAN[1,5], LEE SIN CHANG[2,3], ABDUL SALAM BABJI[1,2] & SENG JOE LIM[1,2,*]

[1]*Jabatan Sains Makanan, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia*

[2]*Pusat Inovasi Teknologi Manisan (MANIS), Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia*

[3]*Jabatan Sains Makanan dan Nutrisi, Fakulti Sains Gunaan, Universiti UCSI, No.1, Jalan Menara Gading, UCSI Heights, 56000 Cheras, Kuala Lumpur, Malaysia*

[4]*International Institute for Halal Research and Training (INHART), International Islamic University Malaysia (IIUM), 53100 Jalan Gombak, Kuala Lumpur, Malaysia*

[5]*School of Industrial Technology, Faculty of Applied Sciences, UiTM Shah Alam, Shah Alam 40450, Malaysia*

Diserahkan: 9 Mac 2023/Diterima: 8 Disember 2023

ABSTRAK

Kajian terdahulu menunjukkan bahawa glikoprotein sarang burung walit boleh dihidrolisis dan dipulihkan sebagai hidrolisat sarang burung walit (SBWh) yang boleh dimakan dalam bentuk serbuk. Kajian ini adalah kerja sambungan daripada kajian terdahulu, yang mana pelbagai kepekatan enzim transglutaminase (TG) telah digunakan dalam pembentukan semula bentuk serbuk SBWh menggunakan acuan dan kesannya terhadap sifat fizikokimia dan bioaktiviti SBWh. Proses hidrolisis enzim menunjukkan bahawa sampel SBWh mempunyai hasil pulih lebih daripada 60% dan menunjukkan warna yang lebih terang daripada SBW mentah. Kelarutan SBWh dengan TG lebih rendah tetapi ia boleh dibentuk semula ke bentuk yang diingini. Corak spektrum FTIR untuk sampel SBWh juga menunjukkan bahawa ketulenan glikopeptida SBW yang tinggi telah diperoleh. Untuk aktiviti antioksidan, produk sampingan SBWh (SBWhcp) menunjukkan aktiviti penyingkiran radikal bebas DPPH yang lebih tinggi. Secara ringkasnya, penambahan TG kepada SBWh telah meningkatkan sifat fizikokimia dan bioaktiviti. Penemuan ini menghasilkan wawasan tentang aplikasi dan pembangunan produk EBN menggunakan EBNh dengan TG yang mempunyai bioaktiviti yang tinggi.

Kata kunci: DPPH; gam daging; hidrolisat; sarang burung walit

ABSTRACT

Previous study has shown that edible bird's nest (EBN) glycoprotein can be hydrolysed and recovered as edible bird's nest hydrolysate (EBNh) in the form of powder. This research is a continuous work from previous study, in which different concentrations of transglutaminase enzyme (TG) was applied in reconstituting the shape of EBNh powder using mould, and its effect on the physicochemical properties and bioactivities of EBNh. Enzymatic hydrolysis process showed that EBNh samples had recovery yield exceeding 60% and demonstrated brighter colour than raw EBN. Solubility of EBNh with TG was lower but it can be reconstituted into desirable shape. Spectrum pattern of FTIR for EBNh sample also showed that high authenticity of EBN glycopeptide was obtained. For antioxidant activities, EBNh co-product ($EBNh_{cp}$) exhibited higher DPPH free radical scavenging activity. In short, addition of TG to EBNh has enhanced the physicochemical properties and bioactivities. The finding generates insight on the application and development of EBN products using EBNh with TG with high bioactivities.

Keywords: DPPH; edible bird's nest; hydrolysate; meat glue

Pengenalan

Sarang burung walit (SBW) dikenali sebagai '*Yan Wo'* dalam Bahasa Cina dan merupakan rembesan daripada kelenjar sublingua air liur burung walit yang berfungsi sebagai semen dalam sarang (Lai et al. 2022). Rembesan dihasilkan dalam kadar yang paling banyak semasa musim bersarang dan pembiakan. Biasanya, sarang dibina oleh burung walit jantan dalam tempoh lebih kurang 35 hari (Ramji et al. 2013). Rembesan berglutin membentuk sebahagian sarang dan mengikat dengan bahan lain seperti bulu, rumpai laut atau lumut. Rembesan lendir likat daripada kelenjar air liur burung walit digunakan sebagai bahan untuk membina sarang yang melindungi telur dan anak kecil (Yeo et al. 2021). SBW dibina dalam bentuk separuh mangkuk, yang biasanya dilihat oleh pengguna sebagai bentuk sebenar SBW apabila mereka membelinya (Chua & Zukefli 2016; Dai et al. 2021).

Komposisi SBW terdiri daripada lemak (0.14-1.28%), abu (2.10%), karbohidrat (10.00-31.40%) dan protein (40.00-66.00%), dengan komposisi protein adalah tertinggi dan ini menunjukkan bahawa SBW merupakan sumber protein yang baik (Ling et al. 2020; Ma & Liu 2012; Marcone 2005). SBW mempunyai protein 77 kDa yang memiliki ciri seperti protein ovotransferin (Marcone 2005). Ini menunjukkan SBW merupakan sumber protein berfungsi yang berkualiti tinggi (Babji et al. 2015). Komposisi karbohidrat dalam SBW adalah kedua tertinggi dan mengandungi asid sialik (9.0%), galaktosamina (7.2%), glukosamina (5.3%), galaktosa (16.9%) dan fukosa (0.7%) (Kathan & Weeks 1969; Ma & Liu 2012).

Hidrolisis berenzim merupakan satu proses apabila enzim yang khusus membelah tapak khusus dalam molekul yang disasar seperti dalam proses hidrolisis SBW. Dengan menggunakan enzim protease, glikoprotein dihidrolisis dan menjadi glikopeptida bioaktif. Dalam kajian terkini, hidrolisis berenzim dengan cara pendidihan menunjukkan teknik yang lebih cekap untuk penghasilan glikopeptida bioaktif daripada sumber SBW (Ng et al. 2020; Nurfatin et al. 2016; Unal et al. 2022). Proses hidrolisis boleh dipantau melalui perubahan saiz molekul komponen protein, pengukuran tahap hidrolisis, protein larut dan kandungan protein. Tindak balas khusus alkalase membolehkan hidrolisis glikoprotein dalam SBW ditukar kepada glikopeptida, menjadikannya larut dalam air dan meninggalkan bendasing lain yang tidak larut dalam air (Tan et al. 2022).

Transglutaminase (TGs) (E.C. 2.3.2.13) merupakan enzim yang memangkinkan paut silang protein melalui tindak balas transpengamidaan antara rantai sisi protein sisa glutamina dan lisin. Transpengamidaan ini melibatkan pengasilan fana tapak aktif sisa sisteina dan seterusnya aminolisis asil-enzim tiolester (Keillor et al. 2014). Tindak balas pemindahan asil berlaku melalui pemindahan kumpulan γ-karboksiamida daripada sisa glutamina ikatan peptida (penderma asil) kepada pelbagai jenis amina primer (penerima asil), termasuklah kumpulan ε-amino sisa lisin (Fatima & Khare 2018). Sekiranya penerima asil adalah lisin bebas atau amina primer, penerima asil dimasukkan dalam rantai protein sebagai tindak balas di permukaan hidrofobik (Serhan et al. 2020). Apabila sistem tindak balas tidak mengandungi sisa lisin, lisin bebas atau amina primer, air menjadi penerima kumpulan asil dan kumpulan karboksiamida sisa glutamina melalui deaminasi, ini meningkatkan bilangan sisa karboksilik, mengubah cas protein dan membentuk asid glutamik serta sisa ammonia (De Góes-Favoni & Bueno 2014; Yu et al. 2014).

TGs digunakan secara meluas dalam industri makanan. Ia berfungsi sebagai bahan yang mampu mempengaruhi tekstur, ketahanan dan kualiti makanan, justeru TGs boleh digunakan untuk membangunkan produk dengan ciri deria dan fungsi yang dipertingkatkan (Kolotylo, Piwowarek & Kieliszek 2023; Liu et al. 2021). TGs juga secara umumnya dikenali sebagai selamat dan boleh dinyahaktifkan dengan mudah apabila tindak balas telah selesai (Gurung et al. 2013). Ketersediaan dan kos yang rendah juga memudahkan penggunaannya (Singh et al. 2016). SBW dalam bentuk serbuk hidrolisat kurang diterima oleh pengguna. Ini mungkin disebabkan oleh pengguna kurang biasa dengan hidrolisat SBW dalam bentuk serbuk dan tidak pasti dengan ketulenannya. Oleh itu, kajian ini dijalankan untuk menangani masalah tersebut dengan penggunaan TG terhadap hidrolisat SBW untuk menghasilkan SBW reka semula. SBW reka semula ini dijangka akan mempunyai ciri fizikokimia dan aktiviti biologi yang lebih baik, di samping tahap kelarutan yang lebih tinggi.

Bahan dan Kaedah Kajian

Bahan

SBW bersih yang diproses (SBW_{bersih}) dan produk sampingan SBW yang diproses (SBW_{ps}) diperoleh daripada Mobile Harvester (M) Sdn Bhd., Shah Alam, Selangor, Malaysia. SBW_{bersih} merupakan SBW paling bersih yang melalui proses pembersihan dengan bulu dan bahan asing telah dibuang secara manual berdasarkan prosedur operasi

standard (SOP) Mobile Harvester (M) Sdn Bhd. SBW_{ps} pula merupakan sisa yang diperoleh daripada proses pembersihan SBW yang mengandungi kotoran, bulu dan bahan asing. Kedua-dua sampel SBW kemudian dikisar dengan pengisar Waring keluli kalis karat (7011HS, Waring, Amerika Syarikat) selama dua minit kepada zarah kecil dan disimpan untuk kegunaan selanjutnya. Protease yang digunakan untuk hidrolisis berenzim adalah dari *Bacillus licheniformis* (Novozyme Corps, Bagsværd, Denmark). TGs yang digunakan untuk reka semula hidrolisat SBW adalah daripada *S. mobaraense*. Kesemua bahan kimia gred analitik yang digunakan untuk analisis (reagen Bradford, serum albumin bovin (BSA), o-ftaldialdehid (OPA), b-mercaptoetanol, dan L-Leusin) dibeli dari Sigma-Aldrich, Dorset, United Kingdom, melainkan dinyatakan.

HIDROLISIS BERENZIM SARANG BURUNG WALIT

Hidrolisis berenzim dijalankan berdasarkan kaedah Ibrahim Khushairay et al. (2014) yang diubah suai. Dalam 250 mL kelalang kon, 4.5 g SBW_{bersih} dan SBW_{ps} direndam di dalam 150 mL air suling dan suhu dikekalkan pada 4 ± 1 °C selama 16 jam dengan meletakkan kelalang kon yang berisi sampel di dalam penyejuk (1D/DC-SM, Berjaya, Kuala Lumpur, Malaysia). Larutan tersebut seterusnya melalui pendidihan ganda dua pada suhu 90 ± 1 °C selama 30 minit dengan meletakkan kelalang kon tersebut ke dalam inkubator kukusan air (WB-11, WiseBath™, Wertheim, Jerman), lalu disejukkan kepada 60 ± 1 °C. Bagi penyediaan hidrolisat, alkalase ditambahkan ke dalam larutan berdasarkan parameter paten (no. paten: PI 2015702798). Kemudian, untuk menyahaktifkan enzim, larutan hidrolisat dipanaskan sehingga mendidih selama 5 minit. Supernatan dikumpul dan ditapis menggunakan penuras kain nilon terlebih dahulu, sebelum ditapis melalui penapis vakum menggunakan kertas turas selulosa (Gred 4, Whatman®, Amerika Syarikat). Kemudian, sampel disejuk beku dengan menggunakan pengering sejuk beku (LaboGene A/S, Lillerød, Denmark) dan dilabelkan masing-masing sebagai $SBWh_{bersih}$ dan $SBWh_{ps}$ untuk hidrolisat SBW_{bersih} dan SBW_{ps}. Perolehan hasil sampel SBW yang disejuk beku (SBW_{bersih}, SBW_{ps}, $SBWh_{bersih}$ dan $SBWh_{ps}$) dihitung berdasarkan Persamaan (1):

$$\text{Perolehan hasil (\%)} = \frac{\text{Jisim sampel yang disejuk beku}}{\text{Jisim sampel pemula}} \times 100 \quad (1)$$

REKA SEMULA HIDROLISAT SARANG BURUNG WALIT MENGGUNAKAN TRANSGLUTAMINASE

Berdasarkan kaedah Tang et al. (2006) yang diubah suai, $SBWh_{bersih}$ dan $SBWh_{ps}$ disediakan sebagai buburan (*slurry*) dengan mencampurkan air pada nisbah 1:1 (SBW:air). Buburan itu dieramkan dahulu pada suhu 37 °C dalam inkubator kukusan air (WB-11, WiseBath™, Wertheim, Jerman) sebelum menjalani proses sonikasi dengan menggunakan sonikator (Soniclean Pty Ltd, Thebarton, Australia) selama 15 minit. Seterusnya, TGs ditambahkan dengan nisbah enzim:substrat protein (nisbah E/S) dan masa pengeraman berdasarkan reka bentuk uji kaji pada Jadual 1. Pengeraman dilakukan pada suhu 37 °C. Semua sampel SBW dibeku kering dengan menggunakan pengering sejuk beku (LaboGene A/S, Lillerød, Denmark) untuk analisis selanjutnya (Hu et al. 2011).

Reka bentuk faktorial blok (3×2) digunakan untuk mengenal pasti nisbah E/S dan masa yang optimum untuk menjalankan proses reka semula ini seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 1. Sebanyak tiga replikasi telah dijalankan.

KANDUNGAN PROTEIN LARUT

Kaedah Bradford protein asai (Bradford 1976) digunakan untuk menentukan kandungan protein bagi sampel SBW. Dalam keadaan asidik, pengikatan *Coomassie Brilliant Blue G-250* kepada protein menyebabkan penukaran warna daripada kemerahan kepada kebiruan dengan λ_{mak} = 580 nm. Sebanyak 100 µL alikuot sampel SBW (1 g L^{-1}) ditambahkan ke dalam 5 mL reagen pewarna Bradford dan dibiarkan selama 5 minit pada suhu bilik. Penyerapan pada 595 nm diukur dengan mikroplat spektrofotometer *Epoch™* (Bio Tek, Amerika Syarikat). Pada masa yang sama, kandungan protein larut dikuantitikan dengan menggunakan serum albumin bovin (BSA) yang disediakan mengikut larutan piawai pada julat kepekatan 0.01-0.20 g L^{-1} (Ling et al. 2020).

KANDUNGAN PEPTIDA

Kandungan peptida sampel SBW dianalisis dengan menggunakan asai o-ftaldialdehid (OPA) spektrofotometrik yang diubah suai (Spellman et al. 2003). Sejumlah 75 µL sampel dieram dengan 2.25 mL reagen OPA selama 2 minit. Reagen OPA disediakan dengan 25 mL 100 mM natrium tetra-hidroborat (HmbG GmbH, Hamburg, Germany), 2.5 mL 20% (b/b) natrium dodekil sulfat (SDS) (Bendosen Laboratory Chemicals, Selangor,

JADUAL 1. Reka bentuk faktorial blok (3×2)

Susunan uji kaji	Replikasi	Nisbah E/S	Masa (jam)
1	1	2.5:100	2
2	1	5:100	2
3	1	2.5:100	1
4	1	1:100	2
5	1	1:100	1
6	1	5:100	1
7	2	2.5:100	2
8	2	2.5:100	1
9	2	5:100	2
10	2	1:100	1
11	2	1:100	2
12	2	5:100	1
13	3	5:100	1
14	3	5:100	2
15	3	1:100	1
16	3	2.5:100	1
17	3	1:100	2
18	3	2.5:100	2

Kawalan negatif disediakan tanpa penambahan TGs bagi $SBWh_{bersih}$ dan $SBWh_{ps}$

Malaysia), 40 mg larutan OPA yang dilarut dalam 1 mL metanol (Fisher Scientific (M) Sdn. Bhd., Shah Alam, Selangor, Malaysia) dan 100 µL b-mercaptoetanol diikuti dengan penambahan air suling sehingga mencapai isi padu 50 mL. Penyerapan sampel campuran dianalisis dengan mikroplat spektrofotometer *Epoch*^{TM} (Bio Tek, Amerika Syarikat) dengan jarak gelombang ditetapkan pada 340 nm. L-Leusin (1.0 mg/mL) digunakan sebagai piawai.

WARNA

Kolorimeter Minolta CR-400 dipasangkan dengan pemproses data Minolta DP-400 (Konica Minolta, Tokyo, Jepun) digunakan untuk mengukur warna kesemua sampel SBW (Sin et al. 2018). Data tersebut adalah berdasarkan ruang warna Commission Internationale de I'Eclairage (CIE) L* a* b*. Sebanyak 2 g sampel SBW seterusnya diisi ke dalam cawan sampel dan kepala pengukur diletakkan secara mendatar pada cawan sampel. Lampu *pulsed xenon arc* (PXA) membolehkan pencahayaan yang seragam pada sampel dan cahaya pemantul dibacakan sebagai warna sampel (Chang et al. 2018; Konca et al. 2021). Kroma (K) dihitung daripada Persamaan (2):

$$\text{Kroma, K} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (2)$$

Sudut hiu (H) dihitung daripada Persamaan (3):

$$H^* = \text{arkatan}\ \frac{b^*}{a^*} \quad (3)$$

Nilai sudut hiu berada dalam kadar 0° (merah), 90° (kuning), 180° (hijau) sehingga ke 270° (biru).

NILAI pH

Meter pH (LAQUAtwin-pH-11, HORIBA, Jepun) digunakan untuk menentukan nilai pH bagi sampel SBW. Sampel SBW disediakan pada 0.05 g L^{-1} (5%) dengan menggunakan air suling. Meter pH ditentukur dengan larutan penimbal pH 7 dan pH 4 dahulu pada suhu bilik 25 °C sebelum bacaan diambil (Park et al. 2017).

JUMLAH PEPEJAL TERLARUT

Pengukuran jumlah pepejal terlarut dijalankan dengan menggunakan refraktometer dalam skala 0-32 °Brix (Aichose, Shenzhen, China). Sampel SBW disediakan pada 0.05 g L^{-1} (5%) dengan menggunakan air suling. °Brix sampel SBW diukur dengan meletakkan larutan sampel pada permukaan prisma dengan menggunakan penitis dan dibiarkan selama 30 saat pada suhu bilik (25 ± 1) °C sebelum bacaan diambil (Ng et al. 2020).

SPEKTROSKOPI INFRAMERAH TRANSFORMASI FOURIER (FTIR)

Spektroskopi inframerah transformasi Fourier (Perkin Elmer Precisely, Spectrum 400, FT-IR/FT-NIR, Waltham, Massachusetts, Amerika Syarikat) digunakan untuk mengenal pasti kumpulan berfungsi yang hadir dalam semua sampel mentah dan hidrolisat SBW (Lim et al. 2014). Lapan sampel SBW, iaitu SBW_{bersih}, SBW_{ps}, $SBWh_{bersih}$, $SBWh_{ps}$, $SBWh_{bersih}$ dan$SBWh_{ps}$ yang diperlaku dengan enzim TGs, iaitu nisbah E/S (5:100) dengan masa pengeraman masing-masing 1 jam serta 2 jam telah dipilih. Nisbah E/S (5:100) dengan masa pengeraman 1 jam serta 2 jam dipilih untuk menentukan kesan enzim TGs yang paling banyak terhadap kehadiran kumpulan berfungsi dalam sampel SBWh dan dibandingkan dengan SBW mentah serta SBWh kawalan. Jumlah refleksi (ATR) Spektrum Universal Aksesori yang diatenuat dengan jarak gelombang 4000-650 cm^{-1} dipadankan ke dalam sistem. Sebanyak empat imbasan dijalankan pada sampel dalam resolusi 4 cm^{-1}. Spektrum getaran dikutip dan dianalisa dengan menggunakan Perisian Essential FTIR® 1.1.0.0 (Madison, *Wisconsin*, Amerika Syarikat) (Gan et al. 2020).

AKTIVITI PEMERANGKAPAN RADIKAL BEBAS DPPH

Aktiviti pemerangkapan radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) digunakan untuk menentukan aktiviti pemerangkapan radikal bebas kesemua sampel SBW (Muhammad, Babji & Ayub 2015). Sebanyak 0.2 mL sampel dalam kepekatan 1.0 g L^{-1} dicampurkan dengan 0.8 mL 0.1 mmol L^{-1} larutan metanolik DPPH. Larutan tersebut dibiarkan dalam keadaan gelap selama 30 minit dan penyerapannya diukur pada 517 nm dengan menggunakan mikroplat spektrofotometer *Epoch*™ (Bio Tek, Amerika Syarikat). Asid askorbik (HAMBURG Trading Corporation, Laguna, Filipina) dengan kepekatan dalam kadar 0.1-1.0 g L^{-1} digunakan untuk melakar lengkung normal penentukuran. Aktiviti pemerangkapan radikal bebas dihitung daripada Persamaan (4):

$$\text{Aktiviti pemerangkapan DPPH (\%)} = \frac{(A1-A2)}{A1} \times 100 \quad (4)$$

dengan A1 ialah penyerapan DPPH pengosong; dan A2 ialah penyerapan sampel.

ANALISIS STATISTIK

Kesemua analisis dijalankan dalam tiga replikasi. Analisis varians (ANOVA) sehala dan univariat (dua-hala) dikendalikan dan puratanya dibandingkan dengan menggunakan ujian pelbagai jarak Duncan. Signifikan statistik adalah pada $p < 0.05$. Kesemua analisis statistik dijalankan dengan menggunakan program SPSS (IBM SPSS Statistics V.26, Armonk, NY, USA).

HASIL DAN PERBINCANGAN

Kesemua sampel SBW telah dilabelkan seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 2.

PEROLEHAN HASIL SAMPEL SARANG BURUNG WALIT

Perolehan hasil merupakan nisbah peratus jisim sampel yang disejuk beku kepada jisim sampel pemula dan biasanya mempunyai nilai yang kurang daripada 100%. Ini adalah kerana perolehan jisim sampel yang disejuk beku adalah kurang daripada nilai jisim sampel pemula (Gan et al. 2020). Ini boleh terjadi disebabkan oleh tindak balas enzim yang tidak lengkap, serta kehilangan sampel semasa proses perolehan dan juga pengeringan yang lebih berkesan pada sampel hidrolisat SBW (Limpa et al. 2020). Perolehan hasil bagi sampel SBW_{bersih} reka semula (J2-J7) dan sampel SBW_{ps} reka semula (J9-J14) diambil kira setelah sampel tersebut menjalankan proses reka

semula selepas proses hidrolisis berenzim. Melalui kajian ini, proses hidrolisis berenzim menunjukkan perolehan hasil yang tinggi, iaitu lebih daripada 60%, seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 3. Proses ini juga menjanjikan perolehan hasil alternatif yang tinggi berbanding dengan cara pembersihan SBW secara konvensional yang melaporkan kehilangan SBW sebanyak 35-40% (Noor, Babji & Lim 2018).

KANDUNGAN PROTEIN LARUT

Kandungan protein larut bagi sampel SBW berada dalam lingkungan 64.28 ± 2.34 mg/g hingga 470.08 ± 103.46 mg/g. Sampel SBW_{bersih} J15 dan sampel SBW_{ps} J16 masing-masing mempunyai kandungan protein larut sebanyak 107.27 ± 18.84 mg/g dan 64.28 ± 2.34 mg/g. Sampel SBW_{bersih} J15 mempunyai kandungan protein larut yang lebih tinggi mungkin disebabkan oleh tahap ketulenan protein yang lebih tinggi dalam sampel tersebut berbanding dengan sampel SBW_{ps} J16. Kelarutan protein banyak bergantung pada pemisahan asid amino hidrofobik dan hidrofilik serta mekanisme termodinamik yang terlibat dengan protein dan air (Nurfatin et al. 2016). Ini menandakan aktiviti pemisahan asid amino hidrofobik dan hidrofilik adalah lebih sedia ada pada permukaan protein SBW_{bersih} (Ling et al. 2020).

JADUAL 2. Senarai sampel SBW

Kod sampel	Jenis SBW	Nisbah E/S	Masa pengeraman (jam)	Nama sampel
J1	SBW hidrol-isat bersih	-	-	$SBWh_{bersih}$
J2	SBW hidrolisat bersih reka semula	1.0:100	1	$SBWh_{b1;1}$
J3		2.5:100	1	$SBWh_{b2.5;1}$
J4		5.0:100	1	$SBWh_{b5;1}$
J5		1.0:100	2	$SBWh_{b2;1}$
J6		2.5:100	2	$SBWh_{b2.5;2}$
J7		5.0:100	2	$SBWh_{b5;2}$
J8	SBW hidro-lisat produk sampingan	-	-	$SBWh_{ps}$
J9	SBW hidro-lisat produk sampingan reka semula	1.0:100	1	$SBWh_{ps1;1}$
J10		2.5:100	1	$SBWh_{ps2.5;1}$
J11		5.0:100	1	$SBWh_{ps5;1}$
J12		1.0:100	2	$SBWh_{ps1;2}$
J13		2.5:100	2	$SBWh_{ps2.5;2}$
J14		5.0:100	2	$SBWh_{ps5;2}$
J15	SBW bersih	-	-	SBW_{bersih}
J16	SBW produk sampingan	-	-	SBW_{ps}

Kandungan protein larut bagi sampel $SBWh_{bersih}$ (J1, J3, J5, J6 dan J7) serta $SBWh_{ps}$ (J8-J14) adalah lebih tinggi daripada SBW_{bersih} J15 dan SBW_{ps} J16 masing-masing secara signifikan ($p < 0.05$). Ini adalah kerana hidrolisis berenzim bagi glikoprotein SBW (SBW_{bersih} dan SBW_{ps}) kepada glikopeptida SBW ($SBWh_{bersih}$ dan $SBWh_{ps}$) melepaskan rantaian peptida kecil yang meningkatkan kelarutan protein. Dalam kajian ini, protease daripada *Bacillus licheniformis* telah digunakan untuk memecahkan polipeptida besar kepada polipeptida kecil melalui hidrolisis. Caj ketumpatan juga meningkat apabila saiz molekul menurun. Oleh itu, kelarutan protein meningkat secara keseluruhannya (Aluko 2012).

KANDUNGAN PEPTIDA

Kandungan peptida bagi sampel SBW berada dalam lingkungan 5.07 ± 2.44 mg/g hingga 91.46 ± 4.40 mg/g. Sampel SBWh menunjukkan kandungan peptida yang lebih tinggi daripada sampel SBW mentah secara signifikan ($p < 0.05$). Ini menandakan proses pembersihan mempengaruhi kandungan peptida kerana proses itu mungkin memecahkan glikoprotein kepada glikopeptida, selain mengeluarkan bendasing (Ng et al. 2020).

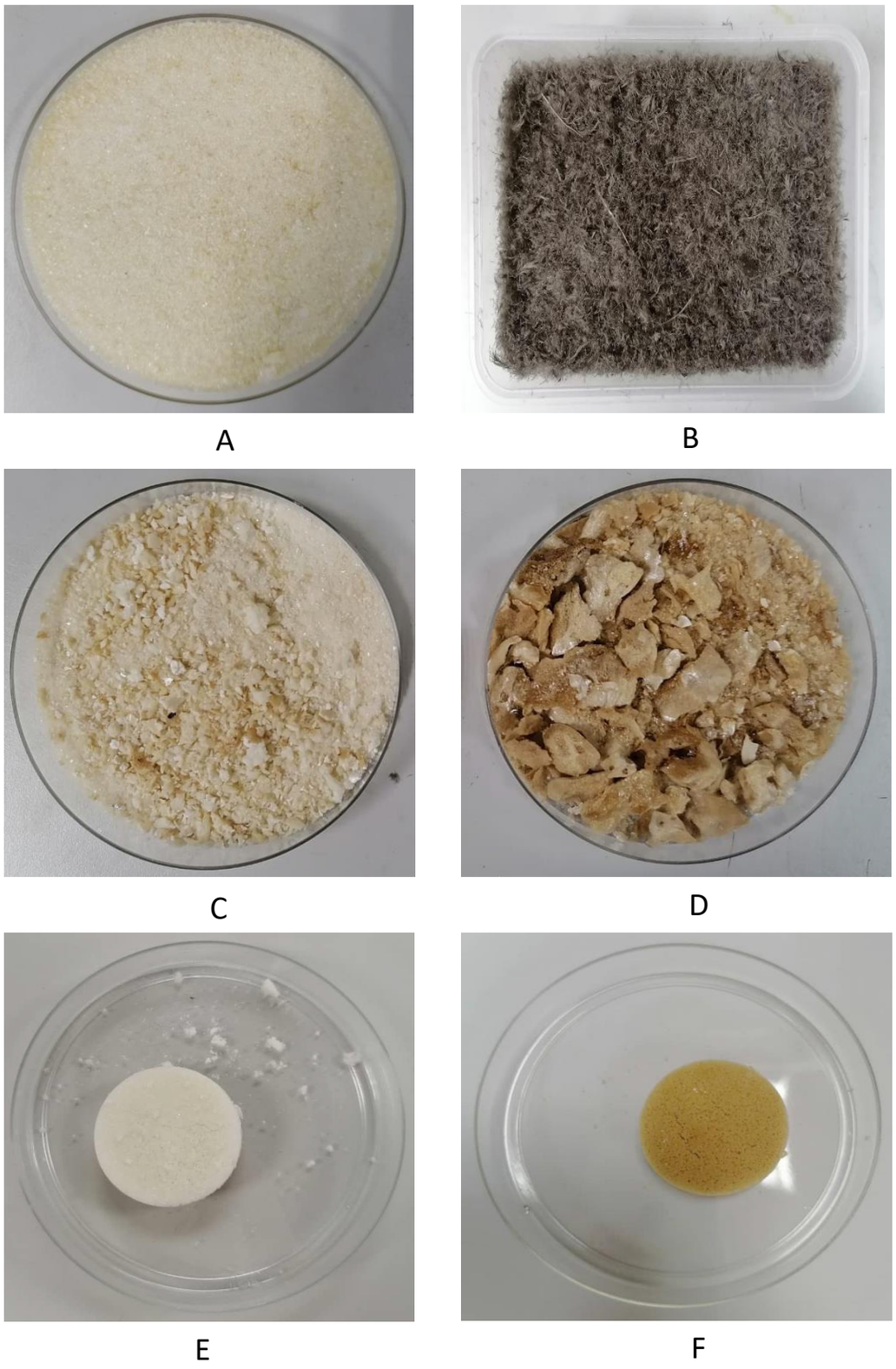
Sampel $SBWh_{bersih}$ J1 (91.46 ± 4.40) mg/g dan $SBWh_{ps}$ J8 (80.16 ± 0.26) mg/g mempunyai kandungan peptida yang lebih tinggi daripada sampel SBW_{bersih} J15 (5.07 ± 2.44) mg/g dan SBW_{ps} J16 (5.55 ± 1.36) mg/g masing-masing secara signifikan ($p < 0.05$). SBW mentah mempunyai kandungan peptida yang rendah menandakan saiz molekul glikoprotein SBW adalah lebih besar kerana cara OPA yang digunakan dalam kajian ini mengesan kumpulan amina primer dalam sampel. Namun begitu, enzim protease memecahkan glikoprotein SBW kepada glikopeptida semasa hidrolisis berenzim. Oleh itu, kumpulan amina primer dalam bentuk glikopeptida saiz molekul yang lebih kecil banyak terdapat dalam SBWh. Ini menunjukkan kecekapan enzim yang menghidrolisis glikoprotein untuk melepaskan peptida bioaktif yang boleh berfungsi secara fisiologi. Peptida bioaktif merupakan serpihan atau rantaian pendek dalam status tidak aktif tetapi boleh diaktifkan melalui beberapa kaedah seperti hidrolisis berenzim (Ramachandran, Babji & Sani 2018).

Didapati kandungan peptida bagi sampel SBW_{bersih} reka semula (J2, J3, J4, J5 dan J7) adalah lebih rendah secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding dengan $SBWh_{bersih}$ J1. Pengurangan kumpulan amina primer dalam sampel yang diperlakukan dengan enzim TGs menunjukkan bahawa pautan silang ikatan peptida antara glikopeptida dalam sampel telah terbentuk. Oleh itu, penggunaan enzim TGs telah berjaya reka semula serbuk SBWh dan ini merupakan pengesahan konsep, yang mana ia boleh dibentuk kepada pelbagai bentuk mengikut acuan yang digunakan, termasuk kepada bentuk asli SBW, iaitu dalam bentuk cawan.

WARNA

SBW_{bersih} berwarna kuning muda manakala $SBWh_{ps}$ berwarna hitam kelabu. Setelah melalui hidrolisis berenzim, $SBWh_{bersih}$ dan $SBWh_{ps}$ berwarna putih kekuningan serta berwarna perang masing-masing dengan sinaran kristal, seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 1. Nilai L* bagi sampel SBW berada dalam lingkungan 23.80 ± 3.60 hingga 72.32 ± 6.19, dapat dirujukkan daripada Jadual 3. Kesemua sampel SBW boleh dikategorikan sebagai sampel terang kerana nilai L* melebihi 50 daripada jumlah 100, kecuali sampel SBW_{ps} J16 (23.80 ± 3.60). Ini menandakan kesemua sampel SBW_{bersih} adalah lebih terang daripada kesemua sampel $SBWh_{ps}$. Sampel SBW_{ps} J16 mempunyai nilai L* yang paling rendah (23.80 ± 3.60) secara signifikan ($p < 0.05$) kerana terdapat bendasing seperti bulu yang berwarna lebih gelap. Ini menyumbang kepada warnanya yang paling gelap. Setelah melalui hidrolisis berenzim, keamatan keterangan sampel $SBWh_{ps}$ (J8-J14) menaik (62.01 ± 6.98) secara signifikan ($p < 0.05$). Ini adalah kerana hanya perolehan glikopeptida SBW terlarut, sedikit hidrolisat protein bulu dan keratin telah dikumpul. Bahagian yang tidak terlarut (bendasing) telah ditapis dan dibuang. Ini membolehkan sampel $SBWh_{ps}$ mempunyai keamatan warna yang lebih terang (Ng et al. 2020).

Kesemua sampel SBW_{bersih} reka semula (J2-J7) yang telah diperlaku dengan enzim TGs mempunyai warna kehijauan yang minimum, iaitu daripada -0.97 ± 0.20 hingga -0.91 ± 0.15, manakala sampel SBW_{ps} reka semula (J9-J14) yang telah diperlaku dengan enzim TGs mempunyai warna kemerahan 3.14 ± 0.08 hingga 3.54 ± 0.25. Sampel $SBWh_{bersih}$ J1 dan sampel SBW_{bersih} J15 mempunyai nilai a* yang lebih tinggi daripada sampel SBW_{bersih} reka semula (J2-J7) secara signifikan ($p < 0.05$). Kesemua sampel SBW_{bersih} adalah cenderung kepada warna hijau muda kecuali sampel $SBWh_{bersih}$ J1 cenderung kepada warna merah muda.



RAJAH 1. Sarang Burut Walit (A) SBW_{bersih}, (B) SBW_{ps}, (C) $SBWh_{bersih}$, (D) $SBWh_{ps}$, (E) $SBWh_{bersih}$ reka semula dan (F) $SBWh_{ps}$ reka semula

JADUAL 3. Perolehan hasil, ciri fizikokimia dan aktiviti biologi sampel $SBWh_{bersih}$, $SBWh_{ps}$, SBW_{bersih} dan SBW_{ps}

Sampel SBW	Perolehan hasil (%)	Kandungan protein terlarut (mg/g)	Kandungan peptida (mg/g)	Nilai pH	Jumlah pepejal terlarut (°Brix)	DPPH (%)
$SBWh_{bersih}$	62.46 ± 1.94^{d}	391.56 ± 4.52^{abc}	91.46 ± 4.40^{a}	6.80 ± 0.01^{b}	3.60 ± 0.20^{a}	20.79 ± 0.97^{abc}
$SBWh_{b1;1}$	68.39 ± 7.12^{cd}	219.53 ± 29.25^{de}	56.69 ± 13.47^{bc}	6.57 ± 0.12^{cd}	3.00 ± 0.60^{abc}	19.31 ± 2.48^{bc}
$SBWh_{b2.5;1}$	70.05 ± 9.06^{bcd}	302.34 ± 110.06^{bcd}	60.85 ± 15.36^{bc}	6.57 ± 0.06^{cd}	3.07 ± 0.31abc	19.46 ± 5.05^{bc}
$SBWh_{b5;1}$	76.26 ± 3.95^{abc}	234.15 ± 132.74^{cde}	46.83 ± 11.55^{c}	6.53 ± 0.06^{cde}	2.47 ± 0.81^{bc}	20.53 ± 2.30^{abc}
$SBWh_{b2;1}$	78.41 ± 8.79^{abc}	284.19 ± 93.56^{cd}	57.51 ± 18.45^{bc}	6.60 ± 0.10^{c}	2.60 ± 1.04^{bc}	21.39 ± 4.12^{abc}
$SBWh_{b2.5;2}$	74.90 ± 6.35^{abc}	350.40 ± 139.38^{abcd}	70.42 ± 36.39^{abc}	6.43 ± 0.06^{de}	2.87 ± 0.61^{abc}	19.71 ± 3.39^{bc}
$SBWh_{b5;2}$	81.25 ± 10.16^{a}	263.32 ± 112.16^{cd}	64.62 ± 10.89^{bc}	6.40 ± 0.10^{e}	3.00 ± 1.11^{abc}	17.49 ± 1.07^{c}
$SBWh_{ps}$	71.92 ± 2.57^{abcd}	325.35 ± 30.79^{abcd}	80.16 ± 0.26^{ab}	5.97 ± 0.06^{f}	3.27 ±0.23^{ab}	22.48 ± 0.71^{abc}
$SBWh_{ps1;1}$	78.97 ± 1.24^{ab}	345.26 ± 38.75^{abcd}	61.80 ± 9.57^{bc}	5.87 ± 0.06^{f}	2.47 ± 0.12^{bc}	22.37 ± 2.58^{abc}
$SBWh_{ps2.5;1}$	79.25 ± 1.50^{ab}	324.02 ± 122.47^{abcd}	60.01 ± 12.79^{bc}	5.87 ± 0.06^{f}	2.47 ± 0.31^{bc}	25.54 ± 3.63^{a}
$SBWh_{ps5;1}$	81.54 ± 2.90^{a}	350.11 ± 87.15^{abcd}	68.16 ± 11.15^{abc}	5.87 ± 0.06^{f}	2.93 ± 0.12^{abc}	25.52 ± 3.87^{a}
$SBWh_{ps1;2}$	79.34 ± 2.26^{ab}	470.08 ± 103.46^{a}	70.85 ± 12.69^{abc}	5.87 ± 0.06^{f}	2.27 ± 0.12^{c}	21.97 ± 4.05^{abc}
$SBWh_{ps2.5;2}$	79.04 ± 2.06^{ab}	331.22 ± 62.63^{abcd}	67.46 ± 3.17^{abc}	5.87 ± 0.06^{f}	2.93 ± 0.12^{abc}	21.37 ± 1.79^{abc}
$SBWh_{ps5;2}$	81.23 ± 1.18^{a}	459.75 ± 18.87^{ab}	66.03 ± 6.25^{abc}	5.87 ± 0.06^{f}	2.87 ± 0.23^{abc}	24.15 ± 0.51^{ab}
SBW_{bersih}	-	107.27 ± 18.84^{ef}	5.07 ± 2.44^{d}	7.70 ± 0.10^{a}	0.20 ± <0.01^{d}	19.60 ± 1.67^{bc}
SBW_{ps}	-	64.28 ± 2.34^{f}	5.55 ± 1.36^{d}	6.90 ± 0.17^{b}	0.20 ± <0.01^{d}	18.31 ± 0.37^{c}

Sampel $SBWh_{ps}$ J8 dan sampel SBW_{ps} J16 mempunyai nilai a* yang lebih rendah daripada sampel SBW_{ps} reka semula (J9-J14) secara signifikan ($p < 0.05$). Ini menandakan sampel SBW_{ps} reka semula (J9-J14) berwarna lebih merah berbanding dengan $SBWh_{ps}$ J8 dan sampel SBW_{ps} J16. Sampel SBW_{ps} reka semula (J9-J14) tidak mempunyai nilai a* yang berbeza antara satu sama lain. Kesemua warna sampel SBW_{ps} adalah cenderung kepada merah muda dan mempunyai nilai a* yang lebih tinggi daripada kesemua sampel SBW_{bersih} secara signifikan ($p < 0.05$).

Kesemua sampel SBW berwarna kekuningan kerana mempunyai nilai b* yang positif dalam lingkungan 7.06 ± 0.40 hingga 21.14 ± 0.89. Kesemua sampel SBW_{ps} mempunyai nilai b* yang lebih tinggi daripada kesemua sampel SBW_{bersih} secara signifikan ($p < 0.05$), kecuali sampel SBW_{bersih} J15 dan sampel SBW_{ps} J16. Sampel SBW_{bersih} J15 mempunyai nilai b* yang lebih tinggi (12.06 ± 1.67) daripada sampel SBW_{ps} J16 (7.06 ± 0.40) secara signifikan ($p < 0.05$) akibat daripada kesan penyamaran bendasing SBW_{ps} yang menyebabkan tahap kekuningan menjadi lebih rendah. Keadaan ini berubah setelah melalui hidrolisis berenzim. Sampel $SBWh_{ps}$ (J8-J14) mempunyai nilai b* yang lebih tinggi daripada sampel $SBWh_{bersih}$ (J1-J7) secara signifikan ($p < 0.05$). Ini menandakan rawatan berenzim dan proses penapisan telah mengeluarkan bulu dan bendasing yang menyamar sebagai glikopeptida dalam sampel SBW (Ng et al. 2020). Tambahan lagi, ini juga menunjukkan sampel $SBWh_{ps}$ (J8-J14) berwarna lebih kuning berbanding dengan sampel $SBWh_{bersih}$ (J1-J7).

Setelah diperlaku dengan enzim TGs, sampel SBW_{bersih} reka semula (J2-J7) mempunyai nilai b* yang lebih rendah daripada sampel $SBWh_{bersih}$ J1 secara signifikan ($p < 0.05$). Sebaliknya, sampel SBW_{ps} reka semula (J9-J14) pula mempunyai nilai b* yang lebih tinggi daripada sampel $SBWh_{ps}$ J8 secara signifikan ($p < 0.05$). Ini menandakan sampel $SBWh_{bersih}$ J1 adalah lebih kuning berbanding dengan sampel SBW_{bersih} reka semula (J2-J7), manakala sampel SBW_{ps} reka semula (J9-J14) adalah lebih kuning berbanding dengan sampel $SBWh_{ps}$ J8.

Nilai K* bagi sampel SBW berada dalam lingkungan 7.06 ± 0.40 hingga 21.14 ± 0.89. Ini menunjukkan keamatan sampel SBW adalah rendah mungkin disebabkan oleh bentuk kristal sampel. Kesemua sampel SBW_{ps} mempunyai nilai K* yang lebih tinggi daripada kesemua sampel SBW_{bersih} secara signifikan ($p < 0.05$), kecuali sampel SBW_{bersih} J15 dan sampel SBW_{ps} J16. Sampel SBW_{bersih} J15 mempunyai nilai K* yang lebih tinggi (12.06 ± 1.67) daripada sampel SBW_{ps} J16 (7.27 ± 0.41) secara signifikan ($p < 0.05$). Ini adalah kerana sampel daripada SBW_{ps} mempunyai bendasing terlarut daripada bulu burung yang menyumbang kepada warna keperangan (Rajah 1(B)), berbanding SBW_{bersih}, yang secara keseluruhannya, berwarna putih (Rajah 1(A)).

Setelah diperlaku dengan enzim TGs, sampel SBW_{bersih} reka semula (J2-J7) mempunyai nilai K* yang lebih rendah daripada sampel $SBWh_{bersih}$ J1 secara signifikan ($p < 0.05$). Sebaliknya, sampel SBW_{ps} reka semula (J9-J14) pula mempunyai nilai K* yang lebih tinggi daripada sampel $SBWh_{ps}$ J8 secara signifikan ($p < 0.05$). Ini menandakan sampel $SBWh_{bersih}$ J1 mempunyai keamatan warna yang lebih tinggi berbanding dengan sampel SBW_{bersih} reka semula (J2-J7), manakala sampel $SBWh_{ps}$ J8 mempunyai keamatan warna yang lebih rendah berbanding dengan sampel SBW_{ps} reka semula (J9-J14).

Nilai sudut *hue* (h) bagi sampel SBW berada dalam lingkungan (76.45 ± 1.01)° hingga (96.46 ± 1.17)°. Ini menunjukkan sampel SBW berwarna kuning dengan mengikuti petunjuk roda warna bagi nilai h. Menurut Quek et al. (2018), sampel SBW yang dikumpul dari Malaysia adalah 77.05°-87.79°. Ini menandakan warna SBW boleh dicirikan sebagai kuning muda kepada kuning pekat. Kesemua sampel SBW_{bersih} mempunyai nilai h yang lebih tinggi daripada kesemua sampel SBW_{ps} secara signifikan ($p < 0.05$). Sampel SBW_{bersih} J15 dan sampel SBW_{ps} J16 mempunyai nilai h yang lebih rendah daripada sampel SBW_{bersih} reka semula (J2-J7) serta sampel SBW_{ps} reka semula (J8-J14) masing-masing secara signifikan ($p < 0.05$).

Setelah diperlaku dengan enzim TGs, sampel SBW_{bersih} reka semula (J2-J7) mempunyai nilai h yang lebih tinggi daripada sampel $SBWh_{bersih}$ J1 secara signifikan ($p < 0.05$), manakala sampel $SBWh_{ps}$ (J8-J14) mempunyai nilai h yang hampir sama kerana tiada perbezaan yang signifikan antara satu sama lain ($p > 0.05$). Ini menandakan sampel $SBWh_{bersih}$ J1 berwarna lebih kuning berbanding dengan sampel SBW_{bersih} reka semula (J2-J7), manakala sampel $SBWh_{ps}$ (J8-J14) mempunyai warna kekuningan yang hampir sama.

NILAI pH

Nilai pH bagi sampel SBW berada dalam lingkungan 5.87 ± 0.06 hingga 7.70 ± 0.10. Kesemua sampel SBW_{bersih} mempunyai nilai pH yang lebih tinggi berbanding sampel SBW_{ps} secara signifikan ($p < 0.05$). Ini menandakan kesemua sampel SBW_{bersih} menghampiri pH neutral (pH 7)

manakala kesemua sampel SBW_{ps} adalah sedikit berasid mungkin disebabkan oleh SBW_{ps} mempunyai lebih banyak asid amino bebas kerana kandungan protein terlarut dan peptida yang tinggi.

JUMLAH PEPEJAL TERLARUT

Jumlah pepejal terlarut bagi sampel SBW berada dalam lingkungan 0.20 ± 0.00 °Brix hingga 3.60 ± 0.20 °Brix. Sampel SBW_{bersih} J15 dan sampel SBW_{ps} J16 mempunyai jumlah pepejal terlarut yang paling rendah (0.20 ± 0.00 °Brix) secara signifikan ($p < 0.05$). Sampel $SBWh_{bersih}$ (J1-J7) dan sampel $SBWh_{ps}$ (J8-J14) pula mempunyai jumlah pepejal terlarut yang lebih tinggi, iaitu dalam lingkungan 2.27 ± 0.12 °Brix hingga 3.60 ± 0.20 °Brix berbanding dengan sampel SBW_{bersih} J15 dan sampel SBW_{ps} J16 secara signifikan ($p < 0.05$). Hidrolisat SBW mempunyai kelarutan yang lebih tinggi daripada SBW mentah kemungkinan disebabkan oleh tindak balas enzim yang menghidrolisis glikopeptida SBW dengan struktur yang kompleks kepada glikopeptida SBW dengan struktur yang lebih ringkas dan lebih mudah terlarut dalam air.

Melalui kajian yang telah dijalankan, proses hidrolisis berenzim telah menambah baik kelarutan hidrolisat SBW. Kelarutan hidrolisat SBW yang lebih tinggi lebih digemari kerana dapat meluaskan kegunaannya dengan hidrolisat SBW mudah terlarut dalam matriks makanan dan mudah bercampur dengan bahan-bahan yang lain. Ini membolehkan hidrolisat SBW digunakan sebagai ingredien berfungsi dalam industri makanan (Ng et al. 2020). Namun, keterlarutan serbuk SBWh telah menyebabkan penerimaan pengguna yang rendah. Setelah diperlaku dengan enzim TGs, keterlarutan sampel SBWh telah dikurangkan dan boleh reka semula kepada bentuk SBW yang lebih mudah untuk diterima oleh pengguna.

SPEKTROSKOPI INFRAMERAH TRANSFORMASI FOURIER (FTIR)

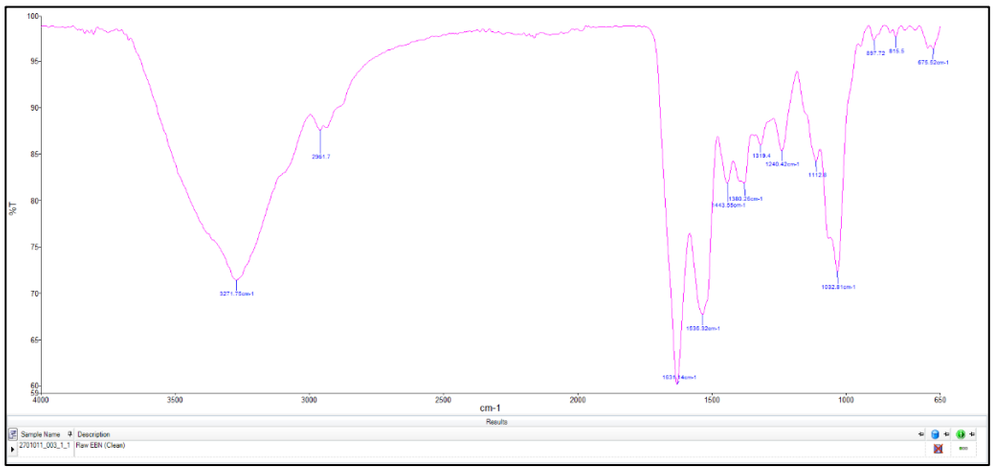
Secara visualnya, spektrum FTIR (Rajah 2) bagi kesemua sampel SBW itu menunjukkan corak yang hampir sama kecuali sampel SBW_{ps} J16. Perbezaan dalam jalur penyerapan bagi sampel J16 adalah disebabkan oleh ketulenan glikoprotein dalam SBW_{ps} yang mengandungi banyak benda asing, terutamanya bulu.

Puncak penyerapan yang terkandung dalam sampel SBW dengan kumpulan berfungsi yang sepadan adalah seperti yang dinyatakan pada Jadual 4. Jalur keserapan yang luas dalam lingkungan 3267.16-3277.96 cm^{-1} telah dikesan sebagai regangan getaran hidrogen terikat O-H simetri dan tidak simetri (Lim et al. 2014). Ini menandakan lembapan dalam bentuk molekul air terkandung dalam sampel SBW. Ajayi et al. (2019) dan Khajehpour, Dashnau dan Vanderkooi (2006) menyatakan getaran O-H kemungkinan disumbangkan oleh gangguan spektral daripada O-H lain yang mengandungi konstituen seperti gula, alkohol dan fenol. Ma dan Liu (2012) juga melaporkan glikoprotein SBW mengandungi lebih kurang 40% asid amino hidroksil yang berada di kedudukan ikatan karbohidrat-peptida. Dengan membandingkan peratusan penghantaran puncak (%T) bagi kumpulan berfungsi O-H, sampel SBW_{ps} J16 mempunyai %T yang lebih tinggi daripada sampel $SBWh_{ps}$ J8. Ini menunjukkan lebih banyak asid amino hidroksil atau O-H lain yang mengandungi konstituen dalam sampel SBW mentah.

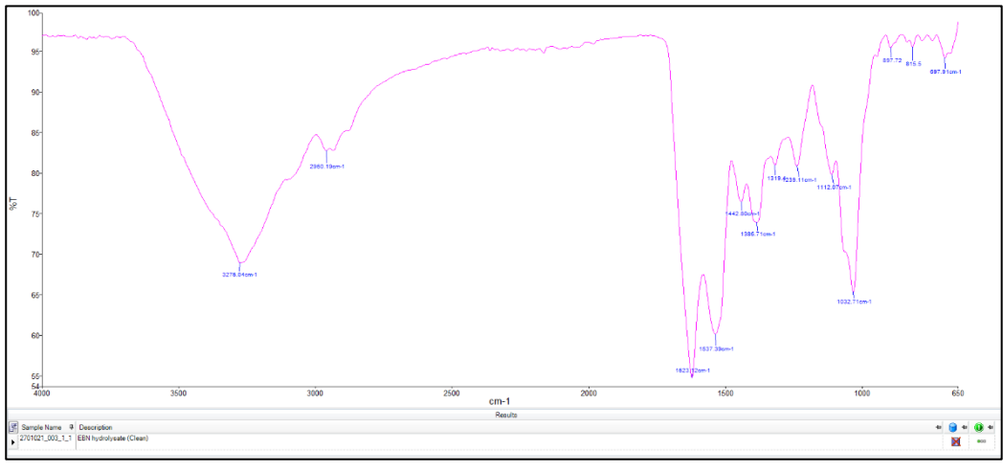
Puncak keserapan di sekitar 2923.70-2961.70 cm^{-1} diatribut kepada regangan getaran alkil C-H (Lim et al. 2014) yang mungkin disebabkan oleh regangan getaran metil (CH_3) (Hamzah et al. 2017) atau regangan getaran metilena tidak simetri (Guo et al. 2018). Jalur keserapan daripada 1623.12-1631.14 cm^{-1} adalah hasil daripada regangan getaran kumpulan karbonil C=O (amid I) manakala 1535.20-1538.90 cm^{-1} pula adalah hasil daripada lenturan getaran amina, iaitu ikatan N-H (amid II) (Guo et al. 2018; Hamzah et al. 2017). Kumpulan berfungsi yang hampir sama juga dikesan dalam SBW tulen dan SBW gred 2A hingga 5A oleh Guo et al. (2018) serta Hamzah et al. (2015). Set (2012) melaporkan puncak antara 1640-1520 cm^{-1} biasanya dikesan sebagai kumpulan berfungsi protein yang major.

Selain itu, lenturan getaran simetri bagi kumpulan karboksil (COOH) dengan nombor gelombang daripada 1442.42-1450.98 cm^{-1} telah dikesan dalam sampel SBW. Kesemua sampel SBW menunjukkan puncak yang hampir terhadap 1400 cm^{-1}. Ini menandakan kehadiran polisakarida seperti lenturan getaran bagi kumpulan C-H (CH_2). Kesemua sampel SBW yang mempunyai puncak pada nombor gelombang 1319.10-1321.50 cm^{-1} merupakan regangan kumpulan amina (C-N) (Guo et al. 2018). Kumpulan berfungsi fosfat (O=P-O) berada pada nombor gelombang 1234.98-1240.42 cm^{-1} disebabkan oleh regangan getaran fosfat dalam asid nukleik yang hampir sama dengan yang dilaporkan oleh Guo et al. (2018) dan Han et al. (2018) dalam sampel SBW.

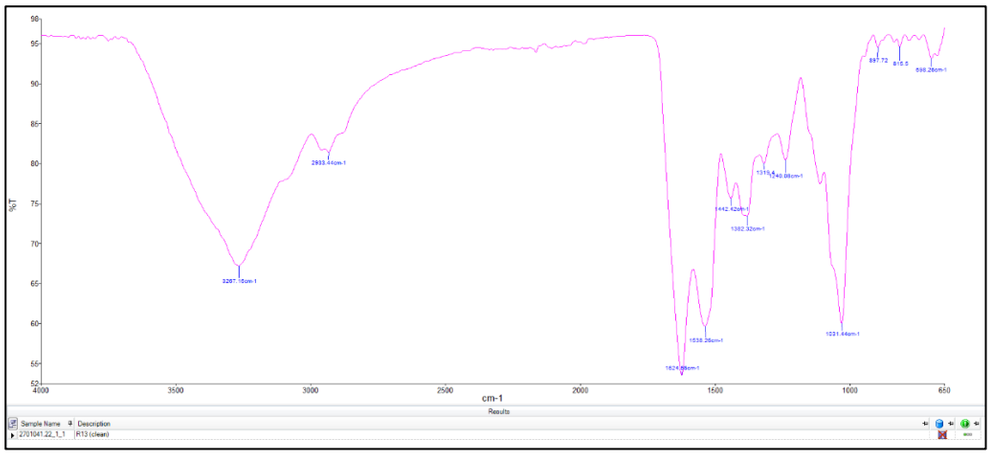
Penyerapan daripada 1031.44-1112.80 cm^{-1} dikenali sebagai regangan getaran kumpulan karboksil (C-O) ditambah dengan lenturan kumpulan C-OH bagi karbohidrat (Guo et al. 2018). Ini menunjukkan terdapat tanda kehadiran kumpulan karbohidrat dalam lingkungan ini (Guo et al. 2018; Hamzah et al. 2017).


%T
cm-1
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
650
Results
Sample Name
Description
2701011_003_1_1
Raw EBN (Clean)

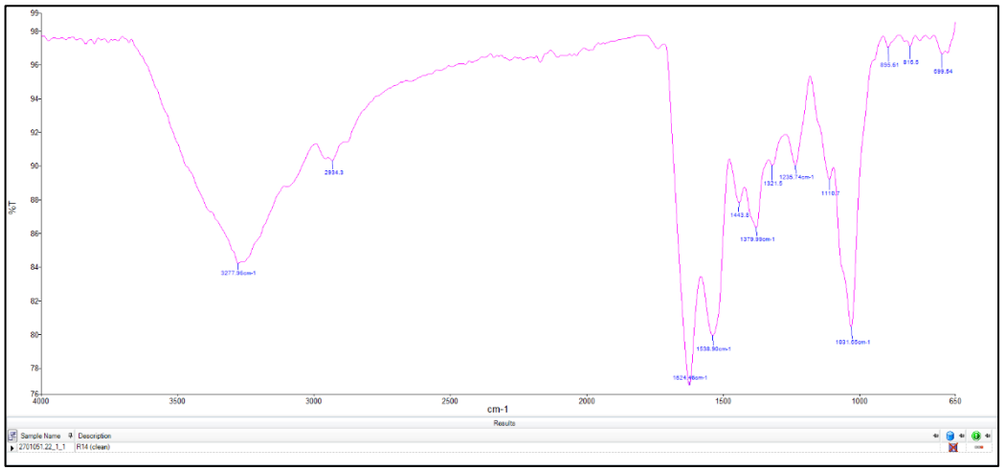
A


%T
cm-1
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
650
Results
Sample Name
Description
2701021_003_1_1
EBN hydrolysate (Clean)

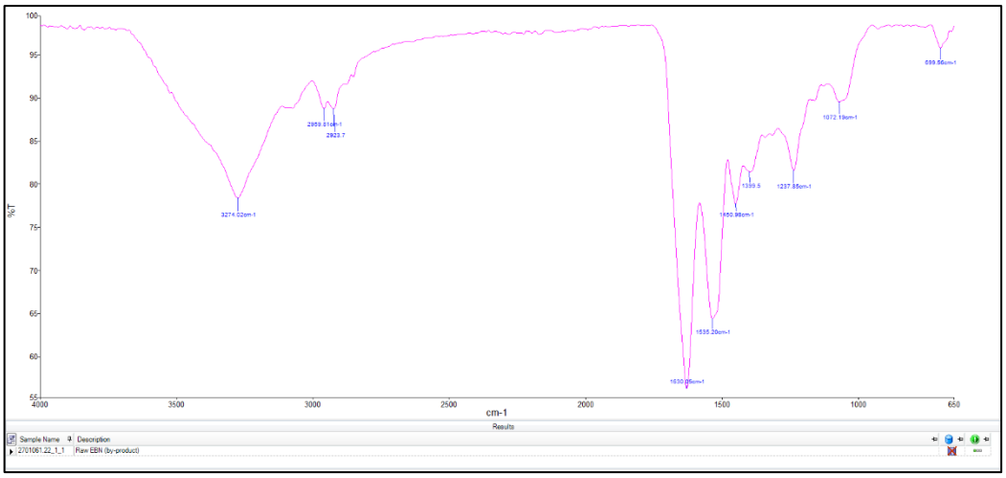
B


%T
cm-1
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
650
Results
Sample Name
Description
2701041_22_1_1
R13 (clean)

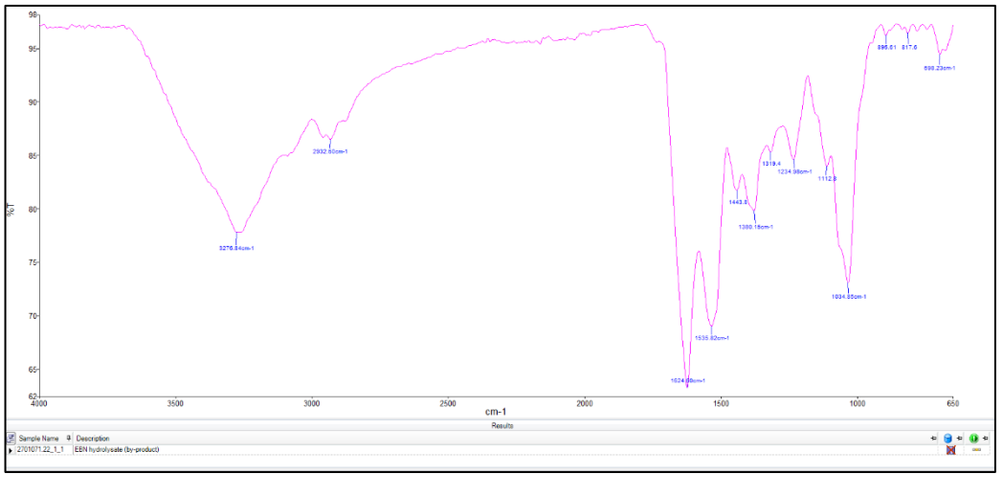
C


%T
cm-1
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
650
3277.95cm-1
2934.3
1624.48cm-1
1538.90cm-1
1443.8
1379.99cm-1
1321.5
1235.14cm-1
1118.07
1031.65cm-1
899.54
Results
Sample Name
Description
2701061.22_1_1
R14 (clean)

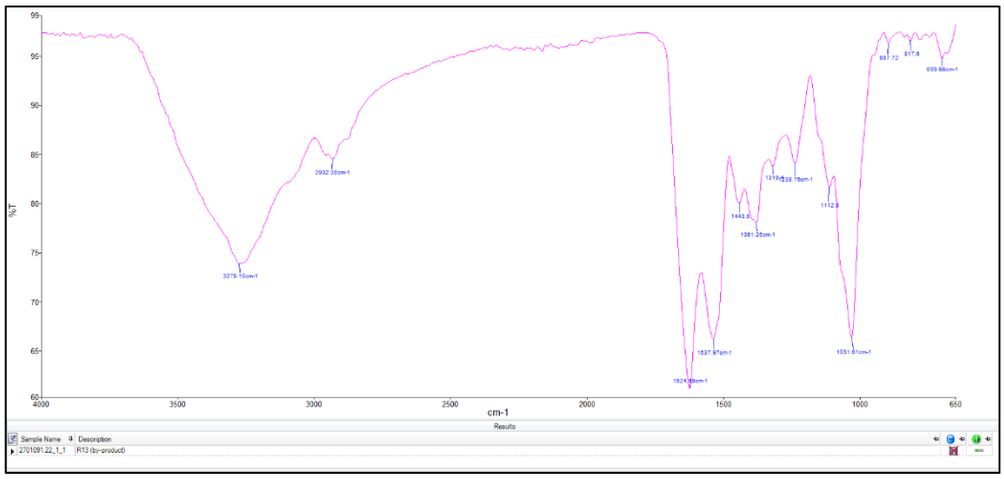
D


%T
cm-1
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
650
3274.02cm-1
2959.81cm-1
2923.7
1630.95cm-1
1535.20cm-1
1455.96cm-1
1399.5
1237.85cm-1
1072.19cm-1
899.56cm-1
Results
Sample Name
Description
2701061.22_1_1
Raw EBN (by-product)

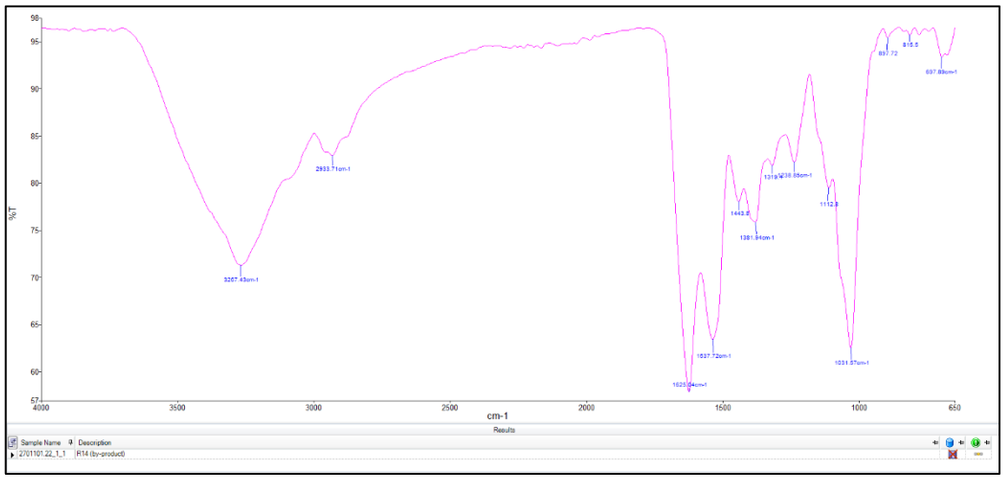
E


%T
cm-1
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
650
3276.84cm-1
2932.60cm-1
1624.68cm-1
1535.82cm-1
1443.8
1380.18cm-1
1319.4
1234.98cm-1
1112.8
1034.85cm-1
896.01
817.6
698.23cm-1
Results
Sample Name
Description
2701071.22_1_1
EBN hydrolysate (by-product)

F



G



H

RAJAH 2. Spektrum spektroskopi inframerah transformasi Fourier (FTIR) (A) SBW_{bersih} (B) $SBWh_{bersih}$ (C) $SBWh_{b5;1}$ (D) $SBWh_{b5;2}$ (E) SBW_{ps} (F) $SBWh_{ps}$ (G) $SBWh_{ps5;1}$ dan (H) $SBWh_{ps5;2}$

Terdapat juga signal yang dikesan di kawasan 815.50-897.72 cm^{-1} kerana keluar daripada lenturan satah bagi ikatan aromatik C-H (Guo et al. 2018). Kumpulan protein dan karbohidrat turut didapati dalam kawasan ini (Guo et al. 2018; Hamzah et al. 2017).

Kesemua spektra FTIR menandakan protein dan karbohidrat merupakan komponen utama yang terkandung dalam sampel SBW. Ketulenan SBW tulen dicerminkan secara utama di puncak penyerapan sebatian majornya (Mohamad Ibrahim et al. 2021). Secara umumnya, bentuk, kedudukan dan corak spektrum FTIR bagi sampel SBW mentah dalam kawasan yang hampir sama dengan yang diperhati dalam sampel SBWh melambangkan ketulenan glikopeptida SBW yang tinggi telah berjaya diperoleh melalui proses hidrolisis berenzim. SBWh yang ditambah dengan TGs mempunyai puncak protein dan karbohidrat yang menandakan ketulenannya.

JADUAL 4. Keputusan analisis spektrum FTIR bagi sampel SBW

No.	Kumpulan berfungsi	Nama kumpulan berfungsi	Nombor gelombang (cm^{-1}) Sampel							
			SBW_{bersih}			SBW_{ps}				
			$SBWh_{bersih}$	$SBWh_{b5;1}$	$SBWh_{b5;2}$	SBW_{bersih}	$SBWh_{ps}$	$SBWh_{ps5;1}$	$SBWh_{ps5;2}$	SBW_{ps}
1	O-H *stretching*	Hidroksil	3276.04	3267.16	3277.96	3271.75	3276.84	3275.15	3267.43	3274.02
2	C-H *stretching*	Alkil	2960.19	2933.44	2934.30	2961.70	2932.60	2932.38	2933.71	2959.81 2923.70
3	C=O *stretching*	Karbonil (Amid I)	1623.12	1624.56	1624.46	1631.14	1624.60	1624.58	1625.04	1630.05
4	N-H *bending*	Amina (Amid II)	1537.39	1538.26	1538.90	1536.32	1535.82	1537.97	1537.72	1535.20
5	COOH *bending*	Karboksil	1442.80	1442.42	1443.80	1443.55	1443.80	1443.80	1443.80	1450.98
6	C-H *bending*	Alkil	1386.71	1382.32	1379.99	1380.26	1380.15	1381.26	1381.94	1399.50
7	C-N *stretching*	Amina	1319.40	1319.40	1321.50	1319.40	1319.40	1319.40	1319.10	
8	O=P-O^- *stretching*	Fosfat	1239.11	1240.08	1235.74	1240.42	1234.98	1238.76	1238.85	1237.85
9	C-OH *stretching*	Karboksil ester	1112.07	-	1110.70	1112.80	1112.80	1112.80	1112.80	-
10	C-O *stretching*	Karboksil	1032.71	1031.44	1031.65	1032.81	1034.85	1031.61	1031.57	1072.19
11	C-H *bending*	Aril	897.72	897.72	895.61	897.72	895.61	897.72	897.72	-
12	C-H *bending*	Aril	815.50	815.50	815.50	815.50	817.60	817.60	815.50	-
13	C=C *bending*	Alkena	697.91	698.26	699.54	675.52	698.23	699.66	697.89	699.56

AKTIVITI PEMERANGKAPAN RADIKAL BEBAS DPPH

Aktiviti pemerangkapan radikal bebas DPPH berada dalam lingkungan 17.49 ± 1.0 % hingga 25.54 ± 3.63 %. Sampel SBW_{ps} reka semula J10 (25.54 ± 3.63 %), J11 (25.52 ± 3.87 %) dan J14 (24.15 ± 0.51 %) menunjukkan aktiviti pemerangkapan radikal bebas DPPH yang lebih tinggi daripada sampel SBW_{ps} J16 (18.31 ± 0.37 %) secara signifikan ($p < 0.05$). Menurut Ali et al. (2019), aktiviti DPPH dalam SBWh adalah lebih tinggi (45%) daripada SBW mentah (35%) kerana mungkin disebabkan oleh jumlah asid amino yang hadir dalam SBW adalah berbeza. Ini menandakan aktiviti pemerangkapan adalah lebih tinggi selepas proses hidrolisis berenzim dengan glikopeptida bioaktif telah dibebaskan daripada glikoprotein asal yang kompleks. Ianya selari dengan kajian yang dilakukan oleh Zulkifli et al. (2019) yang menunjukkan bahawa pembebasan glikopeptida SBW selepas proses hidrolisis menyumbang kepada peningkatan aktiviti DPPH daripada 0% kepada 28.4 ± 3.0% selepas 3 jam hidrolisis menggunakan enzim alkalase. Terbaharu, Noor et al. (2022) juga membuktikan bahawa peningkatan aktiviti DPPH dikaitkan dengan penghasilan lebih banyak peptida bioaktif apabila masa hidrolisis SBW meningkat dengan aktiviti DPPH tertinggi (43.65±0.53%) telah diperoleh setelah 3 jam hidrolisis oleh alkalase. Dalam kajian ini, hanya sampel SBW_{ps} reka semula J10 dan J11 mempunyai aktiviti pemerangkapan radikal bebas DPPH yang lebih tinggi secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding dengan sampel SBW_{bersih} reka semula J2, J3, J6 dan J7, sampel $SBWh_{bersih}$ J15 serta sampel SBW_{ps} J16. Ini menunjukkan aktiviti DPPH daripada hidrolisat $SBWh_{ps}$ reka semula adalah lebih tinggi kerana dipercayai disebabkan oleh kandungan protein larut dan kandungan peptida yang lebih tinggi.

KESIMPULAN

Melalui kajian ini, proses hidrolisis berenzim menunjukkan kesemua sampel SBWh mempunyai perolehan hasil melebihi 60%, di samping berjaya menghasilkan warna yang diingini jika dibandingkan dengan SBW mentah. Sampel $SBWh_{bersih}$ (J1, J3, J5, J6 dan J7) serta $SBWh_{ps}$ (J8-J14) mempunyai kandungan protein larut yang lebih tinggi daripada SBW mentah secara signifikan ($p < 0.05$). Kandungan peptida bagi sampel SBW_{bersih} reka semula (J2, J3, J4, J5 dan J7) juga adalah lebih rendah secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding dengan $SBWh_{bersih}$ kawalan.

Hasil kajian juga mendapati bahawa kesemua sampel $SBWh_{ps}$ adalah lebih berasid berbanding dengan sampel $SBWh_{bersih}$ yang menghampiri tahap neutral. Setelah diperlaku dengan enzim TGs, keterlarutan sampel SBWh didapati telah dikurangkan dan boleh reka semula kepada pelbagai bentuk, termasuk bentuk cawan SBW yang lebih mudah untuk diterima oleh pengguna, kerana lebih menyerupai produk SBW asal. Hasil spektrum FTIR bagi kesemua sampel SBWh juga menunjukkan corak yang hampir sama dengan SBW mentah. Dalam kajian ini, aktiviti antioksidan menandakan aktiviti pemerangkapan radikal bebas DPPH bagi sampel $SBWh_{ps}$ adalah lebih tinggi selepas proses hidrolisis berenzim.

Secara kesimpulannya, perlakuan enzim TGs terhadap SBWh menunjukkan ciri-ciri fizikokimia dan aktiviti biologi yang ditambah baik. Kajian ini berupaya diaplikasikan dalam pembangunan hidrolisat SBW dengan aktiviti biologi yang tinggi, dan lebih diterima oleh pengguna selepas diperlakukan dengan enzim TGs.

PENGHARGAAN

Kajian ini disokong oleh Skim Geran Penyelidikan Prototaip (PRGS/1/2022/WAB04/UKM/02/1) yang disediakan oleh Kementerian Pendidikan Tinggi (KPT), Malaysia. Para pengarang ingin mengucapkan terima kasih kepada Jabatan Sains Makanan dan Pusat Inovasi Teknologi Manisan (MANIS), Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia yang menyediakan semua kemudahan yang diperlukan untuk kajian ini.

RUJUKAN

Ajayi, O., Okedina, T., Samuel, A., Asieba, G., Jegede, A., Onyemali, C., Ehiwuogu-Onyibe, J., Lawal, A. & Elemo, G. 2019. Evaluation of starter culture fermented sweet potato flour using FTIR spectra and GCMS chromatogram. *African Journal of Microbiology Research* 13(1): 1-13.

Ali, A.A.M., Noor, H.S.M., Chong, P.K., Babji, A.S. & Lim, S.J. 2019. Comparison of amino acids profile and antioxidant activities between edible bird nest and chicken egg. *Malaysian Applied Biology* 48(2): 63-69.

Aluko, R.E. 2012. *Functional Foods and Nutraceuticals.* Springer.

Babji, A., Nurfatin, M., Etty Syarmila, I. & Masitah, M. 2015. Secrets of edible bird nest. *UTAR Agricultural Science Journal* 1(1): 32-37.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2): 248-254.

Chang, L.S., Karim, R., Abdulkarim, S.M. & Ghazali, H.M.

2018. Production and characterization of enzyme-treated spray-dried soursop (*Annona muricata* L.) powder. *Journal of Food Process Engineering* 41(5): e12688.

Chua, L.S. & Zukefli, S.N. 2016. A Comprehensive review of edible bird nests and swiftlet farming. *Journal of Integrative Medicine* 14(6): 415-428.

Dai, Y., Cao, J., Wang, Y., Chen, Y. & Jiang, L. 2021. A comprehensive review of edible bird's nest. *Food Research International* 140: 109875.

De Góes-Favoni, S.P. & Bueno, F.R. 2014. Microbial transglutaminase: General characteristics and performance in food processing technology. *Food Biotechnology* 28(1): 1-24.

Fatima, S.W. & Khare, S.K. 2018. Current insight and futuristic vistas of microbial transglutaminase in nutraceutical industry. *Microbiological Research* 215: 7-14.

Gan, J.Y., Chang, L.S., Nasir, N.A.M., Babji, A.S. & Lim, S.J. 2020. Evaluation of physicochemical properties, amino acid profile and bioactivities of edible bird's nest hydrolysate as affected by drying methods. *LWT* 131: 109777.

Guo, L., Wu, Y., Liu, M., Ge, Y. & Chen, Y. 2018. Rapid authentication of edible bird's nest by FTIR spectroscopy combined with chemometrics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98(8): 3057-3065.

Gurung, N., Ray, S., Bose, S. & Rai, V. 2013. A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International* 2013: 329121.

Hamzah, Z., Jeyaraman, S., Hashim, O. & Hussin, K. 2017. Application of Fourier transform infrared spectroscopy on edible bird nest authenticity. *Contemporary Issues and Development in the Global Halal Industry: Selected Papers from the International Halal Conference 2014*. hlm. 557-566.

Hamzah, Z., Jeyaraman, S., Hashim, O. & Kamarudin, H. 2015. Waste to wealth for the edible bird nest industry. *Applied Mechanics and Materials* 754-755: 990-997.

Han, Y., Han, L., Yao, Y., Li, Y. & Liu, X. 2018. Key factors in FTIR spectroscopic analysis of DNA: The sampling technique, pretreatment temperature and sample concentration. *Analytical Methods* 10(21): 2436-2443.

Hu, X., Zhao, M., Sun, W., Zhao, G. & Ren, J. 2011. Effects of microfluidization treatment and transglutaminase cross-linking on physicochemical, functional, and conformational properties of peanut protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(16): 8886-8894.

Kathan, R.H. & Weeks, D.I. 1969. Structure studies of collocalia mucoid: I. Carbohydrate and amino acid composition. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 134(2): 572-576.

Keillor, J.W., Clouthier, C.M., Apperley, K.Y., Akbar, A. & Mulani, A. 2014. Acyl transfer mechanisms of tissue transglutaminase. *Bioorganic Chemistry* 57: 186-197.

Khajehpour, M., Dashnau, J.L. & Vanderkooi, J.M. 2006. Infrared spectroscopy used to evaluate glycosylation of proteins. *Analytical Biochemistry* 348(1): 40-48.

Kolotylo, V., Piwowarek, K. & Kieliszek, M. 2023. Microbiological transglutaminase: Biotechnological application in the food industry. *Open Life Sciences* 18(1): 20220737.

Konca, Y., Kaliber, M., Uzkulekci, H.H., Cimen, B. & Yalcin, H. 2021. The effect of rosehip (*Rosa canina* L.) supplementation to diet on the performance, egg and meat quality, antioxidant activity in laying quail. *Sains Malaysiana* 50(12): 3617-3629.

Lai, Q.W.S., Fan, Q., Zheng, B.Z., Chen, Y., Dong, T.T. & Tsim, K.W.K. 2022. Edible bird's nest, an Asian health food supplement, possesses anti-inflammatory responses in restoring the symptoms of atopic dermatitis: An analysis of signaling cascades. *Frontiers in Pharmacology* 13: 941413.

Lim, S.J., Aida, W.M.W., Maskat, M.Y., Mamot, S., Ropien, J. & Mohd, D.M. 2014. Isolation and antioxidant capacity of fucoidan from selected Malaysian seaweeds. *Food Hydrocolloids* 42(P2): 280-288.

Limpa, S.I., Islam, Z. & Reza, M.S. 2020. Comparative evaluation of bromhexine HCI mucoadhesive microspheres prepared by anionic, cationic and nonionic polymers. *Bangladesh Pharmaceutical Journal* 23(2): 117-124.

Ling, J.W.A., Chang, L.S., Babji, A.S. & Lim, S.J. 2020. Recovery of value-added glycopeptides from edible bird's nest (EBN) co-products: Enzymatic hydrolysis, physicochemical characteristics and bioactivity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100(13): 4714-4722.

Liu, Y., Zhang, Y., Guo, Z., Wang, C., Kang, H., Li, J., Wang, W., Li, Y., Lu, F. & Liu, Y. 2021. Enhancing the functional characteristics of soy protein isolate via cross-linking catalyzed by *Bacillus subtilis* transglutaminase. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 101(10): 4154-4160.

Ma, F. & Liu, D. 2012. Sketch of the edible bird's nest and its important bioactivities. *Food Research International* 48(2): 559-567.

Marcone, M.F. 2005. Characterization of the edible bird's nest the "Caviar of the East". *Food Research International* 38(10): 1125-1134.

Mohamad Ibrahim, R., Mohamad Nasir, N.N., Abu Bakar, M.Z., Mahmud, R. & Ab Razak, N.A. 2021. The authentication and grading of edible bird's nest by metabolite, nutritional, and mineral profiling. *Foods* 10(7): 1574.

Muhammad, N.N., Babji, A.S. & Ayub, M.K. 2015. Antioxidative activities of hydrolysates from edible birds nest using enzymatic hydrolysis. *AIP Conference Proceedings*. hlm. 050038.

Ng, S.R., Mohd Noor, H.S., Ramachandran, R., Tan, H.Y.,

Ch′ng, S-E., Chang, L.S., Babji, A.S. & Lim, S.J. 2020. Recovery of glycopeptides by enzymatic hydrolysis of edible bird's nest: The physicochemical characteristics and protein profile. *Journal of Food Measurement and Characterization* 14: 2635-2645.

Noor, H.S.M., Ariff, R.M., Chang, L.S., Chai, X.Y., Tan, H.Y., Babji, A.S. & Lim, S.J. 2022. Enzymatic recovery of glycopeptides from different industrial grades edible bird's nest and its by-products: Nutrient, probiotic and antioxidant activities, and physicochemical characteristics. *Food Science and Human Wellness* 11(6): 1555-1564.

Noor, H.S.M., Babji, A.S. & Lim, S.J. 2018. Nutritional composition of different grades of edible bird's nest and its enzymatic hydrolysis. *AIP Conference Proceedings.* hlm. 1-7.

Nurfatin, M., Syarmila, I.E., Aliah, D.N., Zalifah, M., Babji, A. & Ayob, M. 2016. Effect of enzymatic hydrolysis on angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity in swiftlet saliva. *International Food Research Journal* 23(1): 141-146.

Park, Y-S., Choi, Y-S., Hwang, K-E., Kim, T-K., Lee, C-W., Shin, D-M. & Han, S.G. 2017. Physicochemical properties of meat batter added with edible silkworm pupae (*Bombyx mori*) and transglutaminase. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 37(3): 351-359.

Ramachandran, R., Babji, A.S. & Sani, N.A. 2018. Antihypertensive potential of bioactive hydrolysate from edible bird's nest. *AIP Conference Proceedings*. hlm. 1-7.

Ramji, S., Fizl, M., Koon, L.C. & Rahman, M.A. 2013. Roosting and nest-building behaviour of the white-nest swiftlet *Aerodramus fuciphagus* (Thunberg)(Aves: Apodidae) in farmed colonies. *Raffles Bulletin of Zoology* 29: 225-235.

Serhan, M., Jackemeyer, D., Long, M., Sprowls, M., Perez, I.D., Maret, W., Chen, F., Tao, N. & Forzani, E. 2020. Total iron measurement in human serum with a novel smartphone-based assay. *IEEE Journal of Translational Engineering in Health and Medicine* 8: 2800309.

Set, J. 2012. Fast, effective evaluation of edible bird nests using the handheld agilent 4100 ExoScan FTIR. *Food Testing, Application Note* 566: 1-6.

Sin, T.C., Khalafu, S.H.S., Mustapha, W.A.W., Maskat, M.Y. & Lim, S.J. 2018. Deodorisation of fucoidan and its effect towards physicochemical characteristics and antioxidation activities. *Sains Malaysiana* 47(7): 1501-1510.

Singh, R., Kumar, M., Mittal, A. & Mehta, P.K. 2016. Microbial enzymes: Industrial progress in 21st Century. *3 Biotech* 6(2): 174.

Spellman, D., Mcevoy, E., O'Cuinn, G. & Fitzgerald, R. 2003. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal* 13(6): 447-453.

Tan, H.Y., Mun, S.L., Lee, J.L., Lim, S.J., Daud, N.A., Babji, A.S. & Sarbini, S.R. 2022. Bioactive sialylated-mucin (SiaMuc) glycopeptide produced from enzymatic hydrolysis of edible swiftlet's nest (ESN): Degree of hydrolysis, nutritional bioavailability, and physicochemical characteristics. *International Journal of Food Properties* 25(1): 252-277.

Tang, C-H., Chen, Z., Li, L. & Yang, X-Q. 2006. Effects of transglutaminase treatment on the thermal properties of soy protein isolates. *Food Research International* 39(6): 704-711.

Unal, K.I., Chang, L.S., Mustapha, W.A.W., Razali, N.S.M., Babji, A.S. & Lim, S.J. 2022. Edible bird's nest, a valuable glycoprotein source: Current research prospects and challenges in Malaysia. *Sains Malaysiana* 51(9): 2829-2842.

Yeo, B-H., Tang, T-K., Wong, S-F., Tan, C-P., Wang, Y., Cheong, L-Z. & Lai, O-M. 2021. Potential residual contaminants in edible bird's nest. *Frontiers in Pharmacology* 12: 631136.

Yu, F., Cangelosi, V.M., Zastrow, M.L., Tegoni, M., Plegaria, J.S., Tebo, A.G., Mocny, C.S., Ruckthong, L., Qayyum, H. & Pecoraro, V.L. 2014. Protein design: Toward functional metalloenzymes. *Chemical Reviews* 114(7): 3495-3578.

Zulkifli, A.S., Babji, A.S., Lim, S.J., Teh, A.H., Daud, N.M. & Rahman, H.A. 2019. Effect of different hydrolysis time and enzymes on chemical properties, antioxidant and antihyperglycemic activities of edible bird nest hydrolysate. *Malaysian Applied Biology* 48(2): 149-156.

*Corresponding author; email: joe@ukm.edu.my