

Pengekstrakan dan Pengenalpastian Peptida Perencat α -Amilase daripada Benih *Elateriospermum tapos*

(Extraction and Identification of α -Amylase Inhibitory Peptides from *Elateriospermum tapos* Seeds)

PEI-GEE YAP, NAUFAL ARSHAD & CHEE-YUEN GAN*

Pusat Penyelidikan Biokimia Analisis (ABrC), Kampus SAINS@USM, Universiti Sains Malaysia, Lebuhr Bukit Jambul, 11900 Bayan Lepas, Pulau Pinang, Malaysia

Diserahkan: 14 Mac 2025/Diterima: 16 Julai 2025

ABSTRAK

Elateriospermum tapos adalah tumbuhan unik yang berasal dari Asia Tenggara, digunakan secara tradisi untuk merawat penyakit kronik termasuk kencing manis. Uji kaji ini bertujuan untuk mengekstrak dan mengenal pasti peptida perencat α -amilase daripada benih *E. tapos*. Protein daripada benih *E. tapos* (ETSPI) telah dihidrolisis dengan menggunakan enzim Neutrase dan darjah hidrolisis tertinggi ($34.09 \pm 2.50\%$) diperoleh dari nisbah enzim-ke-substrat 1:10 (b/b) selama 4 jam. Aktiviti perencatan α -amilase tertinggi ($41.74 \pm 1.45\%$) diperoleh pada nisbah yang sama tetapi pada masa hidrolisis selama 2 jam. Ultrafiltrasi kemudian digunakan untuk memecahkan hidrolisat dengan pecahan <3 kDa memberikan potensi yang paling tinggi dalam perencatan α -amilase. Dalam pecahan ini, empat peptida: ME, LLAH, LLHA dan LLPL telah dikenal pasti dan dipilih melalui teknik bantuan enzim yang digabungkan dengan pendekatan spektrometri jisim. Peptida ini diramalkan sebagai tidak toksik dan bukan agregat melalui pendekatan bioinformatik. Kajian hubungan aktiviti struktur menunjukkan bahawa semua peptida terpilih menunjukkan interaksi yang signifikan (nilai p PepSite2 < 0.25) dengan α -amilase pankreas and air liur manusia. Aktiviti perencatan α -amilase peptida telah disahkan dengan nilai IC_{50} adalah seperti berikut: LLAH (2.88 ± 0.01 mg/mL), LLHA (8.05 ± 0.07 mg/mL), LLPL (4.22 ± 0.01 mg/mL) dan ME (1.41 ± 0.00 mg/mL). Penemuan ini menunjukkan kejayaan pengenalpastian peptida perencat α -amilase dengan potensi aplikasi dalam penemuan ubat dan industri nutraseutikal.

Kata kunci: α -amilase; anti-kencing manis; bioinformatik; peptida bioaktif; terapi semula jadi

ABSTRACT

Elateriospermum tapos is a unique plant native to Southeast Asia, traditionally used to treat chronic diseases including diabetes mellitus. This experiment aimed to extract and identify α -amylase inhibitor peptides from *E. tapos* seeds. *E. tapos* seed protein isolate (ETSPI) was hydrolysed using Neutrase enzyme, obtaining the highest degree of hydrolysis ($34.09 \pm 2.50\%$) at enzyme-to-substrate ratio of 1:10 (w/w) over 4 h. The highest α -amylase inhibitory activity ($41.74 \pm 1.45\%$) was obtained at the same ratio but at a hydrolysis time of 2 h. Ultrafiltration was used to fractionate the hydrolysate, in which the fraction <3 kDa gave the most potent potential in inhibiting α -amylase. In this fraction, four peptides: ME, LLAH, LLHA, and LLPL were identified and selected through the enzyme-assisted technique incorporated with tandem mass spectrometry approach. These peptides were predicted as non-toxic and non-aggregate through bioinformatics approach. Structure activity relationship study demonstrated that all selected peptides showed significant (PepSite2 p -value < 0.25) interaction with human pancreatic and salivary α -amylases. The α -amylase inhibitory activity of the peptides was validated whereby the IC_{50} values were as follows: LLAH (2.88 ± 0.01 mg/mL), LLHA (8.05 ± 0.07 mg/mL), LLPL (4.22 ± 0.01 mg/mL), and ME (1.41 ± 0.00 mg/mL). These findings demonstrated successful identification of α -amylase inhibitor peptides with potential applications in drug discovery and the nutraceutical industry.

Keywords: α -amylase; anti-diabetes; bioactive peptide; bioinformatics; natural therapeutics

PENGENALAN

Menurut Naeem et al. (2022), peptida bioaktif dirujuk sebagai serpihan protein khusus dengan urutan asid amino antara 2 dan 20, yang biasanya disulitkan dalam keadaan terpendam dalam teras protein dan berfungsi secara aktif sebaik sahaja ia dilepaskan daripada rantai induknya. Peptida bioaktif ini telah diakui dengan kepelbagaian

aktiviti biologi yang berpotensi seperti anti-mikrob, anti-hipertensi, antioksidan dan anti-radang kerana kecekapan, kekhususan dan kapasiti pengikatan pertalian tinggi dalam perencatan interaksi enzim (Daliri, Oh & Lee 2017). Oleh demikian, banyak kajian telah melaporkan penggunaan peptida bioaktif sebagai salah satu pendekatan dalam merawat penyakit kronik, terutamanya kencing manis.

Secara umumnya, makanan berasaskan tumbuhan seperti bijirin dan kekacang semakin diakui sebagai sumber peptida bioaktif yang mampan, seiring dengan peningkatan bukti saintifik dan permintaan global terhadap protein alternatif (Ashaolu & Suttikhana 2023; Fan et al. 2022; Nirmal et al. 2024; Sun et al. 2024). Dalam penyelidikan ini, *Elateriospermum tapos* dicadangkan sebagai sumber peptida bioaktif. Spesies ini dikenali sebagai salah satu tumbuhan besar yang biasa ditemui di Asia Tenggara (Hoang & Van Welzen 2004). Bijinya berbentuk bujur, berkilat dan berwarna kelabu pucat coklat. Penduduk tempatan biasanya memakan benih yang dipanggang atau dimasak dan sesetengah orang akan menggunakannya sebagai hidangan makanan selepas penapaian (Hoang & Van Welzen 2004). Benih itu juga disukai ramai dalam kalangan penduduk tempatan kerana mereka percaya bahawa ekstrak (sebagai minuman perubatan tradisi) daripada benih *E. tapos* mempunyai keupayaan dalam rawatan penyakit kronik, seperti kencing manis. Benih *E. tapos* didapati mengandungi jumlah protein yang tinggi berbanding kacang komersial lain, seperti pecan, walnut dan kacang hazel (Choonhahirun 2010). Menurut Yong dan Salimon (2006), benih *E. tapos* mengandungi asid oleik (34.55%) dan asid linoleik (31.76%) yang tinggi dan boleh digunakan sebagai salah satu minyak benih berkhasiat yang berpotensi.

Walaupun potensi nutraseutikal benih *E. tapos* telah dikaji secara meluas dari segi lemak, terpenoid dan sebatian fenol, penyelidikan mengenai peptida bioaktifnya masih terhad. Kekurangan kajian ini amat ketara memandangkan kandungan proteinnya yang tinggi dan kegunaan tradisinya dalam pengurusan kencing manis. Tambahan pula, kaedah konvensional untuk mengenal pasti peptida bioaktif seperti hidrolisis protein berskala besar dan saringan aktiviti biologi mempunyai kelemahan ketara dari segi kos, masa dan kecekapan (Li et al. 2025; Udenigwe 2014). Justeru, terdapat keperluan mendesak untuk meneroka pendekatan alternatif yang lebih tepat dan praktikal. Sebagai penyelesaian, enzim dicadangkan sebagai ligan dan bersepadu dengan pendekatan spektrometri jisim dalam mengenalpastian peptida bioaktif. Prinsip asas teknik ini ialah peptida akan melekat pada sasaran yang tidak bergerak melalui interaksi pengikatan pertalian, manakala sebatian yang tidak terikat akan dibuang. Sebaliknya, peptida terikat akan dielusi untuk proses mengenalpastian menggunakan analisis spektrum MS/MS. Teknik afiniti ini telah berjaya mengenal pasti peptida pencegah darah tinggi (Lan et al. 2015; Su et al. 2023). Oleh itu, adalah dipercayai bahawa pendekatan ini berpotensi untuk mengisi jurang pengetahuan sedia ada tentang peptida perencat α -amilase daripada *E. tapos*.

Objektif utama penyelidikan ini adalah untuk mengekstrak dan mengenal pasti peptida perencat α -amilase daripada benih *E. tapos*. Objektif khusus adalah untuk mengkaji kesan masa hidrolisis dan nisbah enzim-substrat berbeza yang digunakan dalam pengekstrakan

peptida perencat α -amilase. Kajian ini turut bertujuan untuk mengenal pasti peptida perencat α -amilase menggunakan teknik-berbantuan enzim, untuk meramalkan ketoksikan, pengagregatan dan sifat fisiokimianya serta untuk mengkaji mekanisme perencatannya. Akhirnya, aktiviti peptida yang terpilih akan disahkan dengan menggunakan peptida tersintesis dan mengukur nilai IC_{50} aktiviti perencatan α -amilase.

BAHAN DAN KAEDAH

BAHAN

Buah *E. tapos* dibeli dari Pasar Satok, Kuching, Sarawak, Malaysia. Biji benih telah diasingkan dan dibilas dengan air ternaik sebelum dibeku keringkan dengan menggunakan pembeku kering Labconco dari Fisher Scientific, Amerika Syarikat. Selepas itu, benih kering dikisar menjadi serbuk, diayak pada 30 lubang per inci dan disimpan pada suhu 4 °C sebelum pengekstrakan protein. Bahan kimia dan reagen lain telah dibeli dari Sigma-Aldrich, Malaysia.

PENGEKSTRAKAN PROTEIN DARIPADA BENIH *E. tapos*

Serbuk benih, seperti yang disediakan dinyahlemak dengan menggunakan n-heksana iaitu nisbah sampel kepada heksana 1:10 dengan pengacauan pada 200 rpm secara berterusan selama 1 jam pada suhu bilik. Proses dinyahlemak ini diulang sebanyak dua kali sehingga tiada kesan minyak dengan memerhatikan tompok lutsinar pada kertas turas dan seterusnya serbuk benih dikeringkan di bawah laminar hood semalaman pada suhu bilik. Sampel yang terhasil disimpan pada suhu 4 °C sebelum proses pengekstrakan dijalankan.

Pengekstrakan protein terasing daripada benih *E. tapos* (ETSPI) dilakukan mengikut kaedah yang dioptimumkan oleh Arshad dan Gan (2019). Secara ringkas, serbuk benih yang dinyahlemak ditambah dalam larutan penimbal fosfat pada pH 8 dengan nisbah sampel:penimbal 1:50 (b/v) diikuti dengan penggeraman pada 80 °C selama 2 jam dengan pengadukan berterusan pada 250 rpm berlaku dalam penggoncang inkubator kawalan KS4000i berjenama IKA, Staufen, Jerman. Sampel kemudiannya diempar pada 4500 rpm selama 30 min dan supernatan dikumpulkan. Seterusnya, protein dimendakkan dengan melaraskan pH kepada pH 4.5 menggunakan 0.1 M HCl. Mendakan kemudiannya dikumpul selepas emparan pada kelajuan 4500 rpm selama 30 min. Selepas itu, protein yang terhasil dibeku keringkan dan disimpan pada 4 °C sebelum hidrolisis.

PENGHASILAN PEPTIDA BIOAKTIF *E. tapos* (ETBP)

Dua parameter (iaitu nisbah sampel-kepada-enzim dan masa hidrolisis) dikaji. ETSPI (0.1 g) telah ditambah ke dalam 10 mL penimbal fosfat, pH 7 dan seterusnya,

Neutrase telah ditambah kepada sampel dengan nisbah sampel-kepada-enzim (S/E) 10, 20 atau 30. Hidrolisis telah dijalankan dengan penggeraman pada suhu 50 °C selama 1, 2, 3 atau 4 jam dengan pengadukan berterusan pada 300 rpm. Proses hidrolisis kemudiannya ditamatkan dengan memanaskan sampel pada suhu 95 °C selama 30 min, diikuti dengan emparan 14000 rpm selama 15 min pada 4 °C. Supernatan dikumpul dan kemudian disimpan pada -20 °C sebelum analisis selanjut.

ANALISIS NATRIUM DODESIL SULFAT POLIAKRILAMIDA ELEKTROFORESIS GEL (SDS-PAGE)

SDS-PAGE telah dijalankan dengan menggunakan 12% gel. Secara ringkas, sampel telah disediakan dengan mencampurkan 15 µL ETBP, 10 µL penimbal Laemmli dan 1 µL 2-mercaptoethanol sebelum analisis, diikuti dengan pemanasan pada 95 °C selama 5 min. Uji kaji elektroforesis dijalankan pada voltan 80 V selama 10 min dan diteruskan dengan 120 V selama 60 min dengan menggunakan Mini Protean III dari Bio-Rad, Hercules, CA, Amerika Syarikat.

Gel kemudiannya diwarnakan menggunakan larutan yang mengandungi 0.1% (B/v) Commassie-Blue R-250, 40% (v/v) metanol dan 10% (v/v) asid asetik selama 2 jam. Kemudian, gel dinyahwarnakan dengan menggunakan larutan yang mengandungi 40% (v/v) metanol dan 10% (v/v) asid asetik selama 2 jam lagi. Imej gel yang terhasil telah ditangkap menggunakan Fujifilm Luminescent Image Analyzer LAS-3000 dan dianalisis menggunakan perisian Multi Gauge Version 3.0 berjenama Fujifilm, Tokyo, Jepun. *Plus Protein Standard* dengan julat berat molekul yang luas (10–250 kDa) telah digunakan sebagai penanda piawai.

DARJAH HIDROLISIS

Darjah hidrolisis dijalankan berdasarkan kandungan protein larut dalam 10% (b/v) asid trikloroasetik (TCA) seperti yang diterangkan oleh Silva dan Silveir (2013). Secara ringkas, 200 µL ETBP telah ditambah dengan 200 µL 20% (b/v) larutan TCA untuk mendapatkan pecahan protein yang larut dan tidak larut. Campuran diinkubasi selama 30 min pada suhu bilik, diikuti dengan emparan pada 3000 rpm selama 30 min. Supernatan dikumpul dan protein larut ditentukan menggunakan kaedah Lowry seperti yang diubah suai oleh Waterborgh (2002). Reagen disediakan dengan mencampurkan 2% (b/v) natrium karbonat (Na_2CO_3), 1% (b/v) kuprum sulfat pentahidrat ($\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) dan 2% (b/v) natrium kalium tartrat dengan nisbah 100:1:1. Reagen (1 mL) kemudiannya ditambah kepada 100 µL sampel, diikuti dengan penggeraman selama 10 min pada suhu bilik. Selepas itu, 100 µL 1 N reagen Folin telah ditambah ke dalam campuran dan penggeraman diteruskan selama 30 min sebelum bacaan pada 750 nm. Keluk penentukuran albumin serum bovin (BSA) dengan julat kepekatan (0.125–1.000 mg/mL) digunakan sebagai rujukan dalam menentukan kandungan protein larut. Hidrolisis darjah dikira menggunakan persamaan (1):

$$\text{Darjah hidrolisis, \%} = \frac{\text{kandungan protein terlarut}}{\text{jumlah kandungan protein}} \times 100 \quad (1)$$

PENENTUAN AKTIVITI PERENCATAN α -AMILASE

Ujian aktiviti perencatan α -amilase telah dijalankan berdasarkan kaedah Apostolidis, Kwon dan Shetty (2007). Secara ringkas, 25 µL sampel (1 mg/mL) dan 25 µL α -amilase (0.5 mg/mL) dicampur dan diinkubasi selama 10 min pada 25 °C. Selepas itu, 25 µL 1% (b/v) kanji dalam 0.02 M penimbal natrium fosfat yang mengandungi 0.006 M NaCl (pH 6.9) telah ditambah ke dalam campuran. Penggeraman diteruskan selama 10 min pada 25 °C. Selepas itu, 50 µL reagen asid dinitrosalisilik ditambah dan campuran ini dipanaskan pada 95 °C selama 5 min. Campuran yang terhasil disejukkan pada suhu bilik dan dicairkan dengan 750 µL air ternyahion sebelum bacaan pada 540 nm menggunakan pembaca plat mikro (Spectramax M5, Peranti Molekul, Sunnyvale, CA). Aktiviti perencatan α -amilase (%) dikira menggunakan persamaan (2):

$$\% \text{ perencatan } \alpha \text{-amilase} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100\% \quad (2)$$

dengan A_c dirujuk sebagai absorbans kawalan, manakala A_s adalah absorbans sampel. Sampel dengan aktiviti perencatan tertinggi telah dipilih untuk analisis selanjutnya.

PEMECAHAN ETBP

Peptida bioaktif *E. tapos* (ETBP) telah dipecahkan mengikut berat molekul melalui satu siri penapis membran ultrafiltrasi emparan (Amicon, Milipore, Ireland) dengan potongan berat molekul (MWCO) 3, 10, 30 dan 50 kDa. Sebagai permulaan, sampel disalurkan melalui penapis 50 kDa dengan emparan pada 4500 rpm dan 4 °C selama 30 min. Retentat kemudiannya dikumpul sebagai pecahan ≥ 50 kDa. Turasan yang terhasil kemudiannya dipindahkan ke penapis MWCO yang lebih rendah dan prosedur diulang. Sebanyak 5 pecahan peptida (≥ 50 , $30 \leq \text{MWCO} < 50$, $10 \leq \text{MWCO} < 30$, $3 \leq \text{MWCO} < 10$ and < 3 kDa) telah diperoleh dan setiap pecahan ini kemudiannya dibeku keringkan. Sebelum analisis lanjut, pecahan peptida ini telah ditambah dengan air ternyahion sebelum penentuan kandungan peptida melalui analisis Kjeldahl (Patil & Post 2017) dan penentuan aktiviti perencatan α -amilase yang disebutkan sebelum ini.

PENGENALPASTIAN PEPTIDA BIOAKTIF

Secara ringkas, manik nanozarah magnetik SiMAG-amine telah diaktifkan melalui kaedah karbodiimida seperti yang diterangkan oleh protokol pengilang (Chemicell, German). Sebagai permulaan, manik (200 µL, 10 mg/mL) telah dibasuh dengan 1 mL larutan garam penimbal fosfat (PBS) selama 3 kali, diikuti dengan 1 mL larutan

asid 2-morfolin-4-ylethanesulfonik (MES) (pH 6.0). Manik tersebut kemudiannya ditambah semula dengan 250 μ L larutan MES yang mengandungi 10 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimida (EDC). Selepas itu, 200 μ L manik yang diaktifkan telah digunakan dalam gandingan dengan 500 μ L α -amilase (100 mg/mL). Enzim-manik kemudiannya diinkubasi semalaman pada suhu 4 °C dan 250 μ L penimbal penyekat susu skim (2%, b/v) dalam 0.1% PBS dengan Tween 20 (PBST) kemudiannya ditambahkan dan pengeraman diteruskan selama 1 jam lagi. Enzim-manik yang digabungkan kemudiannya dibasuh dengan 1 mL 0.1% (b/v) PBST selama 3 kali. Analisis SDS-PAGE dan penentuan aktiviti α -amilase telah dilakukan terhadap enzim manik yang digabungkan untuk mengesahkan interaksi mereka.

Selepas itu, 100 μ L pecahan peptida yang terpilih telah ditambah kepada manik dan campuran itu diinkubasi selama 1 jam lagi pada 4 °C. Setelah pengeraman tamat, manik dicuci semula dengan 1 mL PBST selama 3 kali. Untuk tarik keluar peptida terikat, manik pada mulanya diempar (300 rpm) dan supernatan dibuang. Selepas itu, 200 μ L 0.2 M glisin-HCl/NaOH pada pelbagai pH (2-10) telah ditambah kepada manik dan manik terkonjugasi kemudiannya diinkubasi selama 10 min pada 4 °C. Campuran yang terhasil diempar selama 1 min pada 5000 rpm untuk mengumpul supernatan dan prosedur ini diulang dua kali. Selepas itu, supernatan yang terhasil ditapis dengan unit ultra-empuran dengan MWCO sebanyak 30 kDa (Microcon, Millipore, Ireland) untuk mengasingkan baki enzim α -amilase daripada peptida. Turasan kemudiannya dipekatkan dengan vakum sebelum analisis spektroskopi jisim tandem.

ANALISIS SPEKTROSKOPI JISIM TANDEM (MS/MS)

Peptida reaktif diperoleh daripada proses menggunakan nanozarah magnetik SiMAG-amine seperti yang dinyatakan sebelum ini dan seterusnya peptida pekat akan dinyagaram seperti yang dinyatakan seterusnya sebelum analisis LCMS/MS. Sampel tersebut pada mulanya tertakluk kepada prosedur penyahgaraman dengan menggunakan lajur putaran peptida penyahgaraman Pierce (Thermo Fisher Scientific, Amerika Syarikat). Secara ringkas, lajur putaran telah dikondisikan dengan menggunakan 300 μ L asetonitril dengan emparan pada 3000 rpm selama 1 min. Langkah itu diulang dua kali dan seterusnya, prosedur penyahman yang sama diulang menggunakan 0.1% (v/v) asid trifluoroacetic (TFA). Kemudian, 300 μ L sampel diisikan dan diempar (3000 rpm) selama 1 min. TFA (300 μ L, 0.1% (v/v)) kemudiannya ditambah dan diempar selama 1 min dan langkah yang sama diulang untuk dua kali lagi. Selepas itu, 300 μ L 50% (v/v) ACN yang mengandungi 0.1% (v/v) TFA telah ditambah dan diempar selama 1 min untuk mengeluskan peptida dan langkah ini diulang dua kali. Eluen yang terhasil dikumpul dan dikeringkan di bawah keadaan vakum dengan menggunakan pemekat vakum 5301 (Eppendorf, Jerman)

pada suhu bilik. Sampel kemudiannya dilarutkan semula dengan 50 μ L air ternyahion sebelum dianalisis.

Analisis spektrometri jisim tandem telah dijalankan mengikut protokol seperti yang diterangkan oleh Sarah et al. (2016). Sampel (10 μ L) disuntik ke dalam sistem melalui autosampler dan pemisahan peptida dilakukan menggunakan AdvanceBio Peptide Map C18 (2.1 $\times$ 100 mm, zarah 2.7 μ m; Agilent, Amerika Syarikat) pada kadar aliran 15 μ L/min. Fasa bergerak yang digunakan ialah: (A) air ternyahion yang mengandungi 0.1% asid formik dan (B) asetonitril yang mengandungi 0.1% (v/v) asid formik. Jadual masa dan komposisi fasa bergerak sistem HPLC adalah seperti berikut: (a) 0-5 min, 10% B; (b) 5-115 min, 10-95% B, (c) 115-120 min, 95% B, (d) 120-135 min, 95-10% B dan (e) 140-150 min, 10 % B. Eluen dianalisis menggunakan sistem ESI-QTOF (model 6520, Agilent, USA) dengan keadaan berikut: (a) julat jisim: 100-2000 m/z; (b) tenaga: 6V/100 Da (offset -2); (c) kadar aliran: 15 μ L/min; (d) sumber semburan ion: 3.5 kV; (e) gas pengeringan: nitrogen pada suhu 350 °C dengan kadar aliran 10 L/min; (f) tekanan nebuliser: 3 psig; (g) voltan pemecah: 110 V; dan (h) mod pemecahan: penceraian akibat perlanggaran (CID).

Studio Peaks versi 6.0 telah digunakan untuk penjujukan *de novo*. Purata keyakinan tempatan (ALC) dalam ringkasan data ditetapkan pada >70% dan taburan peptida yang dipilih dikira menggunakan persamaan (3):

$$\text{Taburan peptida (\%)} = \frac{\text{Bilangan peptida terpilih}}{\text{jumlah peptida}} \times 100\% \quad (3)$$

PEMERIKSAAN KEBAHARUAN PEPTIDA MENGGUNAKAN PANGKALAN DATA

BIOPEP digunakan untuk mengesahkan kebaruan aktiviti biologi peptida terpilih, (<https://biochemia.uwm.edu.pl/en/biopep-uwm-2/>).

RAMALAN PENGUMPULAN, KETOKSIKAN DAN SIFAT FISIOKIMIA

AGGRESCAN (<http://bioinf.uab.es/aggreSCAN/>) digunakan untuk meramalkan kecenderungan peptida untuk terkumpul di dalam badan. ToxinPred (<http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/>) telah digunakan untuk meramalkan ketoksikan peptida dan sifat fizikokimia lain (iaitu titik isoelektrik (pI), hidrofobisiti, hidrofilik, berat molekul, cas, halangan sterik, pukal sisi, amfifatisiti dan hidrogen bersih).

KAJIAN HUBUNGAN STRUKTUR-AKTIVITI

Hubungan struktur-aktiviti peptida yang dipilih telah diramalkan menggunakan PepSite2 (<http://pepsite2.russelllab.org/>). Model enzim yang digunakan dalam kajian ini ialah: alfa amilase daripada pankreas manusia (kod PDB: 1XGZ) dan alfa amilase daripada air liur manusia (PDB kod: 1SMD). Kesemua struktur enzim tiga dimensi

ini diperoleh daripada Protein Data Bank di <https://www.rcsb.org/>. Dalam analisis PepSite2, interaksi ditentukan melalui nilai p PepSite2 dengan nilai p PepSite2 < 0.25 menunjukkan interaksi enzim-peptida yang signifikan (Trabuco et al. 2012).

PENGESAHAN PEPTIDA PERENCATAN α -AMILASE TERPILIH

Peptida terpilih (ketulenan >99%) daripada ETBP telah disintesis oleh Life Science Product & Services (Sangon Biotech Co., Ltd, Shanghai, China). Aktiviti perencatan α -amilase peptida kemudiannya dinilai dan IC_{50} juga ditentukan.

ANALISIS STATISTIK

Analisis statistik telah dijalankan menggunakan Statistical Package for the Social Science, SPSS versi 21 (IBM, Amerika Syarikat). Analisis sehala varians (ANOVA) dengan ujian berbilang julat Duncan ($p < 0.05$) telah dijalankan untuk membandingkan perbezaan ketara ($p < 0.05$) bagi nilai min, manakala analisis dua hala ANOVA dengan ujian Duncan ($p < 0.05$) digunakan untuk membandingkan perbezaan kedua-dua faktor. Semua analisis telah dijalankan dalam sekurang-kurangnya 3 ulangan.

KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

SDS-PAGE PROFIL BAGI ETBP

Corak elektroforesis ETSPI dan ETBP berdasarkan nisbah dan masa S/E yang berbeza ditunjukkan dalam Rajah 1. Jalur ETSPI yang tidak tercerna mempunyai berat molekul antara 13 hingga 54 kD, yang dikenal pasti sebagai vicilin dan legumin sub-unit. Berbanding hidrolisis protein dengan ETSPI yang tidak tercerna, didapati bahawa majoriti jalur protein dalam ETSPI tidak dapat dilihat dalam hidrolisatnya dan ia boleh disahkan bahawa protein telah dihidrolisis untuk menjadi peptida.

DARJAH HIDROLISIS (DH)

Rajah 2 menunjukkan DH ETBP merentas masa dan dalam nisbah enzim-ke-substrat yang berbeza. DH meningkat secara berkadar dari $11.06 \pm 2.25\%$ ke $34.09 \pm 2.50\%$ apabila kedua-dua parameter ini meningkat. Analisis ANOVA dua hala telah dijalankan dalam mengkaji kesan masa, nisbah enzim-substrat (nisbah E/S) serta interaksi kedua-dua parameter (Jadual 1a). Berdasarkan analisis, DH telah menunjukkan peningkatan yang ketara ($p < 0.001$) apabila nisbah E/S meningkat. Senario sedemikian boleh membayangkan bahawa bilangan peptida yang lebih kecil dalam hidrolisat yang lebih tinggi dihasilkan kerana lebih banyak enzim digunakan untuk menghidrolisis ETSPI. Trend yang sama juga diperhatikan melalui hidrolisis enzimatik kacang Boston dan plasma darah itik masing-

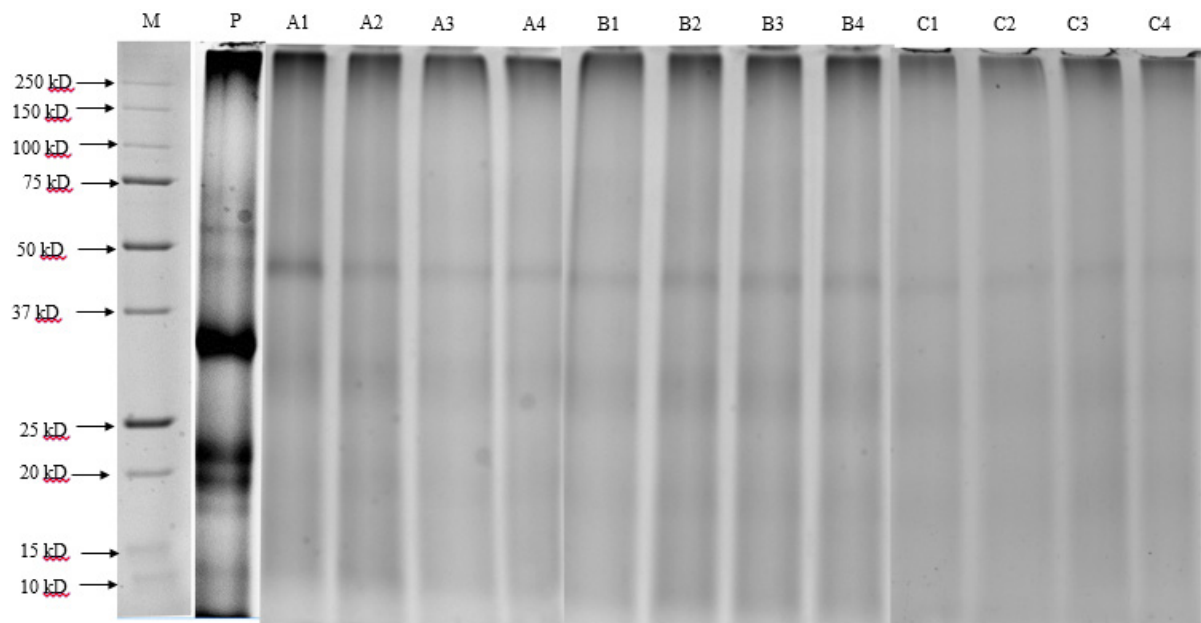
masing oleh Yang et al. (2020) dan Zhang dan Romero (2020). Mereka melaporkan bahawa nisbah E/S yang lebih tinggi telah menyebabkan peningkatan DH disebabkan oleh hidrolisis yang meluas berlaku kepada protein apabila jumlah enzim yang tinggi ditambah. Dari segi masa, DH didapati meningkat dengan ketara ($p < 0.001$) sepanjang tempoh inkubasi dari 1 hingga 4 jam. Tempoh inkubasi yang panjang adalah penting kerana ia memberi masa yang mencukupi untuk enzim mengakses struktur dalaman protein yang mengakibatkan peningkatan proteolisis (Shahbal et al. 2023). Interaksi nisbah masa dan E/S juga telah menunjukkan kesan yang ketara ($p < 0.0001$). Dengan nisbah E/S yang lebih tinggi bersama-sama dengan masa pengekstrakan yang lebih lama, proteolisis ETSPI didapati meningkat apabila lebih banyak peptida larut terhasil, sekali gus menghasilkan aliran menaik dalam DH. Oleh demikian, DH tertinggi (34.90%) diperoleh pada nisbah enzim-substrat 1:10 dan proteolisis masa pada 4 jam.

AKTIVITI PERENCATAN α -AMILASE

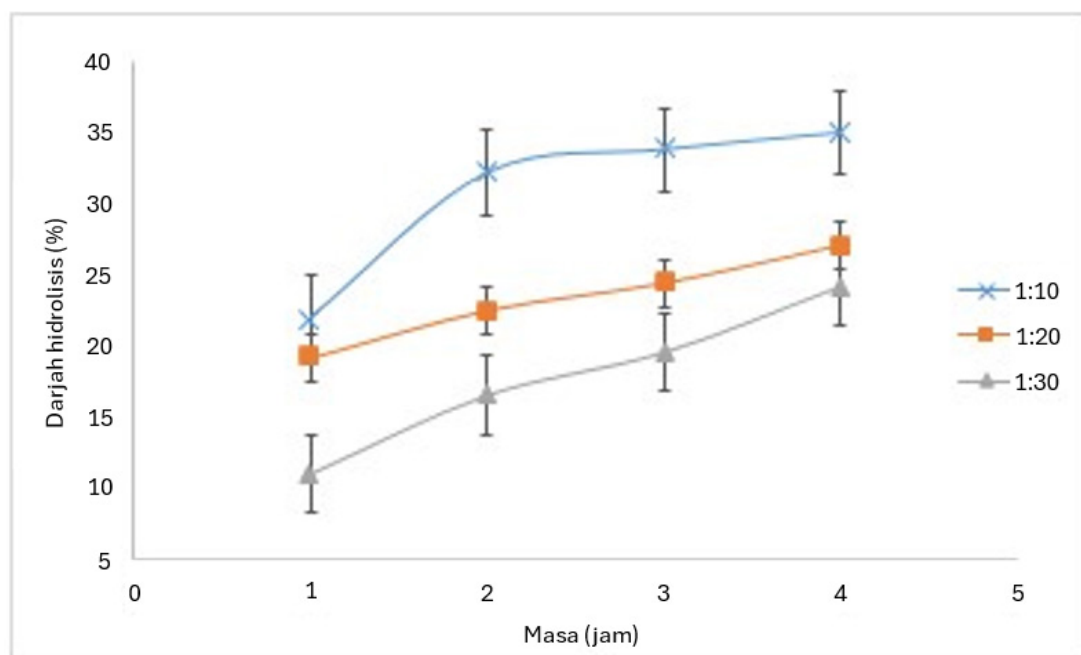
Aktiviti perencatan α -amilase sebagai fungsi masa hidrolisis dan nisbah E/S ditunjukkan dalam Rajah 3 dan boleh diperhatikan bahawa nilai aktiviti perencatan α -amilase berada dalam julat 18.43–41.74%. Berdasarkan ANOVA dua hala, aktiviti perencatan α -amilase didapati meningkat dengan ketara ($p < 0.001$) apabila nisbah E/S meningkat. Senario ini berlaku disebabkan oleh lebih banyak peptida bioaktif yang dihasilkan pada nisbah E/S yang lebih tinggi, kerana tindak balas yang mencukupi berlaku antara enzim dan protein dalam membelah ikatan peptida dalam ETSPI, yang mengakibatkan lebih banyak peptida perencat α -amilase dibebaskan. Sementara itu, masa juga didapati berpengaruh dalam aktiviti perencatan α -amilase. Aktiviti didapati berubah dengan ketara ($p < 0.001$) sepanjang masa hidrolisis. Berdasarkan Jadual 1(b), apabila tempoh inkubasi ditingkatkan dari 1 ke 2 jam, peratusan perencatan meningkat dari 30.05 ke 34.34%. Tempoh inkubasi yang lebih lama ini ketara kerana ia diberi masa yang mencukupi untuk enzim menghidrolisis ETSPI supaya menghasilkan peptida yang lebih pendek. Walau bagaimanapun, trend tersebut mempunyai kesan yang signifikan ($p < 0.001$) menurun dari 3 hingga 4 jam kerana potensi tapak peptida bioaktif mungkin merosot apabila tempoh inkubasi dipanjangkan dalam masa yang lebih lama. Sepanjang kajian interaksi, didapati bahawa nisbah E/S 1:10 dan 2 jam masa hidrolisis memberikan aktiviti perencatan yang paling tinggi.

PEMECAHAN ETBP

Jadual 2 menunjukkan kandungan peptida dan aktiviti perencatan α -amilase bagi pecahan peptida yang berbeza menggunakan sampel terpilih apabila keadaan hidrolisis adalah pada nisbah S/E 1:10 dan masa hidrolisis selama 2 jam. Jumlah kandungan peptida tertinggi didapati pada ≥ 50 kDa (3.73 mg/mL), diikuti oleh pecahan $3 \leq MWCO < 10$



RAJAH 1. Corak elektroforetik ETSPi dan ETBP yang dihasilkan mengikut nisbah S/E dan masa yang berbeza; M: penanda piawai; P: ETSPi; A1-A4: ETBP dihasilkan menggunakan nisbah E/S 1:30 dalam masa 1-4 jam; B1-B4: ETBP dihasilkan menggunakan nisbah E/S 1:20 dalam masa 1-4 jam; dan C1-C4: ETBP dihasilkan menggunakan nisbah E/S 1:30 dalam masa 1-4 jam



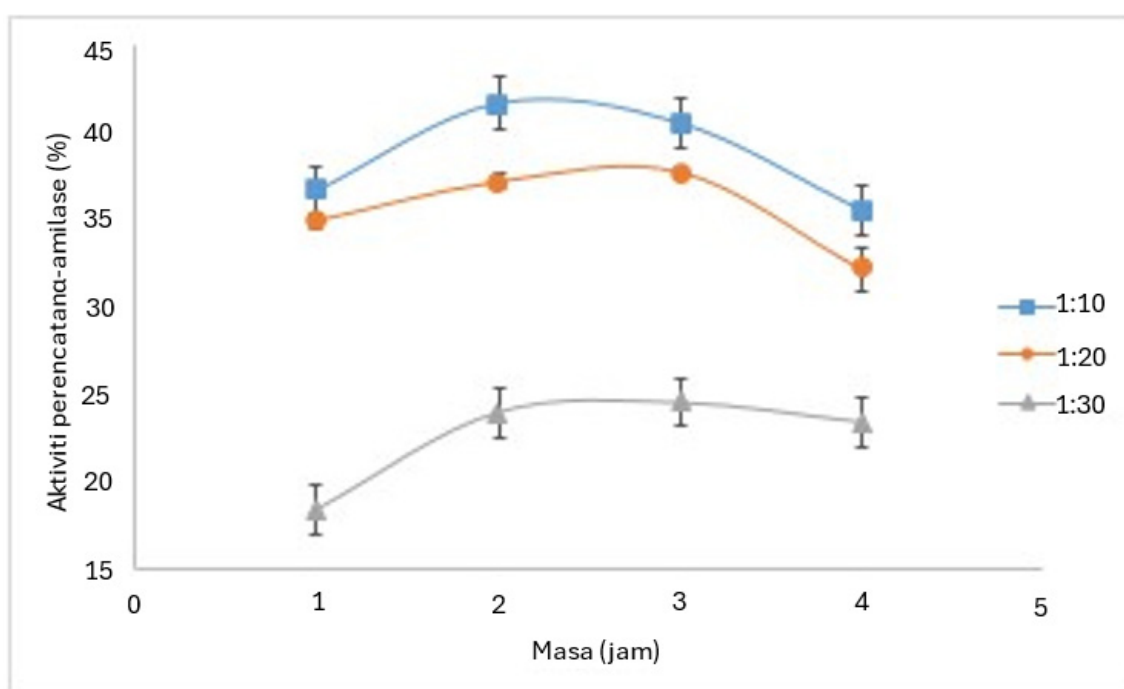
Huruf yang berbeza di atas bar menunjukkan perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$) mengikut ujian Duncan

RAJAH 2. DH ETBP sebagai fungsi masa (1-4 jam) dan nisbah E/S (1:10-1:30)

JADUAL 1. ANOVA dua hala bagi (a) DH dan (b) aktiviti perencatan α -amilase ETBP

Parameter		Respons	
		(a) DH (%)	(b) Aktiviti perencatan α -amilase (%)
Nisbah E/S	1:10	30.69 $\pm$ 5.51 ^c	38.66 $\pm$ 2.82 ^c
	1:20	23.30 $\pm$ 3.01 ^b	35.57 $\pm$ 2.62 ^b
	1:30	17.85 $\pm$ 4.99 ^a	22.63 $\pm$ 3.03 ^a
Masa	1 j	17.43 $\pm$ 5.12 ^a	30.05 $\pm$ 8.78 ^a
	2 j	23.74 $\pm$ 6.81 ^b	34.34 $\pm$ 8.13 ^b
	3 j	25.91 $\pm$ 6.26 ^c	34.34 $\pm$ 7.49 ^b
	4 j	28.72 $\pm$ 4.82 ^d	30.42 $\pm$ 5.60 ^a
Sumber variasi		Nilai P	
Nisbah E/S		p<0.0001	p<0.0001
Masa		p<0.0001	p<0.0001
Interaksi nisbah E/S dengan masa		p<0.0001	p<0.005

Perbandingan dalam lajur dalam jadual dengan data yang ditulis sebagai min $\pm$ sisihan piawai (n= 3). Min dalam lajur yang sama tidak diikuti dengan huruf yang sama adalah berbeza secara signifikan pada tahap keertian p<0.05 mengikut ujian Duncan



Huruf yang berbeza di atas bar menunjukkan perbezaan yang signifikan (p<0.05) mengikut ujian Duncan

RAJAH 3. Aktiviti perencatan α -amilase ETBP pada masa (julat 1-4 jam) dan nisbah E/S (1:10-1:30) berlainan

kDa (3.29 mg/mL), pecahan $30 \leq \text{MWCO} < 50$ kDa (2.13 mg/mL), pecahan $10 \leq \text{MWCO} < 30$ kDa (1.33 mg/mL) dan terakhir pecahan < 3 kDa (0.8 mg/mL). Keputusan ini boleh dijelaskan lagi dengan corak SDS-PAGE (Rajah 1, Lorong C2) bahawa tidak semua protein dihidrolisiskan, terutamanya subunit protein dalam julat $30 \leq \text{MWCO} < 50$ kDa. Namun begitu, didapati aktiviti perencatan α -amilase tertinggi diperoleh dalam pecahan < 3 kDa dengan nilai 135.3%/100 μg . Trend yang sama ini juga diperhatikan dalam kajian lain yang dilaporkan. Contohnya, pecahan peptida bioaktif < 3 kDa daripada kacang Pinto memberikan aktiviti perencatan α -amilase tertinggi, menunjukkan sokongan yang baik kepada penyelidikan ini (Ngoh & Gan 2016). Saiz peptida yang kecil ini membolehkan ia untuk interaksi lebih berkesan dengan tapak aktif enzim α -amilase, seterusnya mengganggu proses pemecahan kanji, seperti mana yang dibincangkan oleh Tan et al. (2022). Tambahan pula, urutan peptida memainkan peranan dalam mengawal aktiviti perencatan α -amilase. Hal ini kerana susunan khusus asid amino boleh membentuk tapak atau permukaan yang menggalakkan interaksi pengikatan dengan enzim sasaran. Sebagai contoh, kajian hubungan struktur-aktiviti (SAR) oleh Rodhi et al. (2024) menunjukkan bahawa peptida kerap berinteraksi dengan α -amilase melalui residu prolina, leusina dan serin dan ia membentuk ikatan hidrogen, sentuhan hidrofobik atau interaksi titian garam dengan enzim. Residu ini dijangka hadir dalam peptida perencat α -amilase dalam pecahan < 3 kDa dalam kajian ini. Ini adalah rasional sebenar di sebalik penggunaan pendekatan manik magnetik bersalut enzim untuk 'memancing' peptida perencat α -amilase yang berpotensi daripada pecahan hidrolisat ETBP. Oleh itu, pecahan < 3 kDa telah dipilih untuk mengenal pasti peptida bioaktif seterusnya.

PENGENALPASTIAN PEPTIDA BIOAKTIF

Keputusan menunjukkan bahawa aktiviti α -amilase pegun adalah lebih rendah sedikit ($\text{OD} = 0.28 \pm 0.03$) berbanding enzim bebas ($\text{OD} = 0.40 \pm 0.05$). Pemerhatian ini membayangkan bahawa perubahan aktiviti pemangkin enzim mungkin dikaitkan dengan perubahan pengubahsuaian enzim yang kecil semasa proses imobilisasi (Dwevedi 2016; Li et al. 2021). Walau bagaimanapun, telah disimpulkan bahawa α -amilase telah berjaya mengekalkan 70% daripada aktivitinya.

Dalam pengesanan selanjutnya mengenai interaksi antara manik dan α -amilase serta antara α -amilase dan peptida, analisis SDS-PAGE telah dijalankan. Diperhatikan bahawa α -amilase pankreas menunjukkan beberapa jalur antara 10 hingga 55 kDa dalam lorong AI (Rajah 4). Maka, telah mengesahkan bahawa interaksi enzim dengan manik itu berjaya. Walau bagaimanapun, peptida tidak dapat dikesan dalam senario ini dan disebabkan oleh jujukan peptida yang pendek seperti yang dinyatakan sebelum ini, analisis spektrometri jisim tandem telah dijalankan

untuk mengenal pasti peptida dan jujukannya. Didapati bahawa empat peptida iaitu ME, LLHA, LLAH dan LLPL menunjukkan ulangan yang paling kerap dalam sampel. Maka, keempat-empat peptida dipilih untuk analisis seterusnya.

KAJIAN BIOINFORMATIK UNTUK PEPTIDA TERPILIH

Tiada aktiviti perencatan α -amilase dilaporkan untuk empat peptida yang terpilih. Maka, mengesahkan kebaruan mereka dalam aktiviti biologi.

RAMALAN PENGUMPULAN, KETOKSIKAN, HIDROFOBISITI DAN TITIK ISOELEKTRIK

Salah satu faktor yang mengehadkan penggunaan peptida dalam industri farmaseutikal dan bioteknologi ialah isu pengagregatan peptida. Menurut Nguyen, Sterpone dan Derreumaux (2020), faktor agregasi ini mempunyai kaitan secara meluas dengan lebih daripada 20 penyakit manusia, termasuk kencing manis jenis 2. Oleh itu, adalah penting untuk meramalkan pengumpulan peptida. Dalam penyelidikan ini, AGGRESCAN digunakan sebagai alat bioinformatik dalam mengira 'titik panas' pengagregatan dalam peptida.

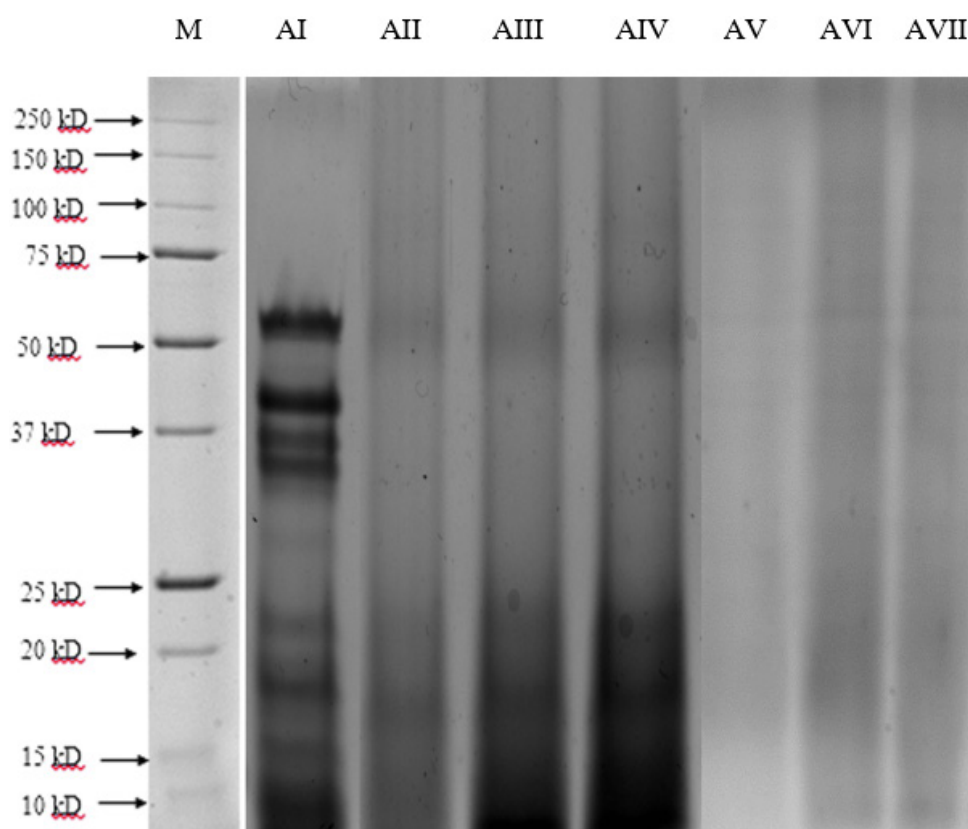
Seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 3, tiada 'titik panas' dikesan untuk semua peptida yang dipilih, dijangka bahawa peptida yang dipilih tidak berkemungkinan dalam pembentukan fibril amiloid dalam badan apabila peptida dimakan. Fibril amiloid biasanya terbentuk dalam bentuk serat tidak larut melalui himpunan protein larut (Rambaran & Serpell 2010). Pembentukan fibril amiloid ini boleh menyebabkan penyakit dan setiap penyakit dicirikan melalui pengagregatan jenis peptida dan protein tertentu (Rambaran & Serpell 2010). Salah satu contoh penyakit amiloid ialah kencing manis jenis 2. Oleh itu, adalah penting untuk memasukkan faktor ini dalam penyelidikan semasa ini. Selain itu, ramalan ketoksikan peptida merupakan salah satu kriteria penting dalam menggunakan peptida sebagai produk nutraseutikal. Dalam kajian ini, ToxinPred digunakan untuk meramalkan ketoksikan serta sifat fisiokimia lain peptida. Didapati bahawa semua peptida terpilih telah diramalkan sebagai tidak toksik. Maka, ini menunjukkan peptida-peptida tersebut selamat untuk aplikasi farmaseutikal (Jadual 3).

Selaras dengan sifat fisiokimia peptida terpilih, didapati bahawa LLPL mempunyai hidrofobisiti tertinggi dalam kalangan peptida terpilih. Hidrofobisiti adalah ukuran tambahan termodinamik bahan dalam menolak air dan dari segi peptida, ciri dan jujukan asid amino adalah pengaruh besar dalam parameter ini. Kajian terdahulu telah menunjukkan bahawa asid amino ciri hidrofobik, terutamanya Leu, dikaitkan dengan peningkatan hidrofobisiti peptida (Baumann & Zerbe 2024). Oleh itu, LLPL memberi nilai hidrofobisiti tertinggi diikuti oleh LLAH, LLHA dan terakhirnya ME. Selain itu, titik

JADUAL 2. Kandungan peptida dan aktiviti perencatan α -amilase bagi pecahan yang berbeza

Pecahan peptida	Kandungan peptida (mg/ mL)	Aktiviti perencatan α -amilase (%/100 μ g protein)
≥ 50 kDa	3.73 ± 0.46^c	17.29 ± 1.2^a
$30 \leq \text{MWCO} < 50$ kDa	2.13 ± 0.46^b	16.25 ± 2.02^a
$10 \leq \text{MWCO} < 30$ kDa	1.33 ± 0.46^a	50.26 ± 1.95^c
$3 \leq \text{MWCO} < 10$ kDa	3.29 ± 0.15^c	34.64 ± 7.00^b
< 3 kDa	0.80 ± 0.00^a	135.40 ± 11.96^d

Perbandingan dalam lajur dalam jadual dengan data yang ditulis sebagai min $\pm$ sisihan piawai (n= 3). Min dalam lajur yang sama tidak diikuti dengan huruf yang sama adalah berbeza secara signifikan pada tahap keertian $p < 0.05$ mengikut ujian Duncan



RAJAH 4. Corak elektroforesis enzim bebas (AI), enzim pegun (AII-AIV) dan peptida tercair (AV-AVII). M: penanda piawai. AI: α -amilase pankreas, AII-AIV: manik magnet SIMAG-AMINE dengan enzim pankreas, AV-AVII: peptida

JADUAL 3. Ketoksikan dan sifat fisiokimia bagi peptida yang dipilih

Peptida	Ramalan toksin	Pengesanan 'titik panas' pengumpulan	Ramalan hidrofobisiti	Ramalan titik isoelektrik	Berat molekul (Da)
ME	Tidak toksik	Tidak dikesan	-0.18	4.00	278.33
LLAH	Tidak toksik	Tidak dikesan	0.23	7.10	452.61
LLHA	Tidak toksik	Tidak dikesan	0.23	7.10	452.10
LLPL	Tidak toksik	Tidak dikesan	0.38	5.88	454.67

isoelektrik (pI) peptida terpilih diramalkan berada dalam julat pH 4-7.10. Nilai pI ini biasanya sepadan dengan ciri jujukan asid amino, contohnya, pI ME berada pada pH 4 disebabkan oleh kehadiran Glu (ciri berasid) dalam jujukan peptida.

KAJIAN HUBUNGAN AKTIVITI STRUKTUR (SAR)

Untuk memberi pemahaman yang lebih baik dalam mekanisme perencatan α -amilase, PepSite 2 digunakan dalam mengkaji interaksi antara enzim dan peptida. Dua model α -amilase (air liur manusia (HSA) dan pankreas manusia (HPA)) telah digunakan dalam kajian ini. HSA dan HPA boleh dinyatakan dalam dua isoform dalam tubuh manusia yang masing-masing dirembeskan daripada kelenjar air liur dan pankreas. Enzim ini mempunyai tiga domain, iaitu Domain A, Domain B dan Domain C, yang bertanggungjawab dalam laluan pemangkin (Rodhi et al. 2024). Setiap domain terlibat dalam interaksi dengan unit glukosa kanji dan bilangan sub-tapak untuk aktiviti pemangkin melalui mekanisme gelongsor dengan enzim cenderung untuk menggelongsor di sepanjang substrat tanpa berpisah (Rodhi et al. 2024).

Dari segi mekanisme, interaksi yang terlibat antara substrat dan enzim ialah ikatan hidrogen, daya van der Waals dan interaksi susunan rantai sisi aromatik. Didapati bahawa tapak penting dalam enzim yang berinteraksi dengan analog substrat ialah Trp58, Trp59, Arg61, Tyr62, His101, Pro163, Asp165, Asp197, Lys200, Glu233, Ile235, Asp236, Tyr258, His299, His305 dan Ala307 (Elodi, Mora & Krysteva 2005; Ishikawa et al. 2007). Di samping itu, Tyr58 dan Tyr59 telah diserlahkan sebagai tapak pengikat substrat yang besar, manakala His299 dan Asp300 terlibat dalam pembentukan perantaraan glikosil-enzim melalui ikatan hidrogen. Berdasarkan Jadual 4, kebanyakan peptida terpilih didapati mengikat dengan tapak pemangkin enzim iaitu His299, Asp300, Trp58 dan Trp59. Sebagai contoh, peptida LLAH, LLHA dan LLPL didapati berinteraksi dengan residu yang disebutkan di atas dalam semua model enzim. ME juga didapati mengikat kepada residu pemangkin aktif iaitu Tyr62, Glu233, Asp197, Trp59, His299 dan Asp300 pada HSA dan HPA. Oleh itu, pengikatan peptida yang dipilih akan menyekat enzim untuk berkonjugasi dengan substratnya. Maka, pembentukan kompleks kanji-enzim tidak dapat dibentuk, yang mengakibatkan pendorongan aktiviti perencatan. Selain itu, asid amino dalam peptida, seperti Leu, Pro, Ala dan Phe, yang berkemungkinan hadir dalam peptida perencat α -amilase telah dilaporkan (Yu et al. 2011). Residu serupa yang disebutkan di atas hadir dalam peptida terpilih ini dan dipercayai bahawa residu ini mungkin berinteraksi dengan residu enzim melalui interaksi hidrofobik serta ikatan hidrogen. Merujuk kepada Jadual 4, semua peptida yang dipilih telah ditunjukkan kesan ketara (nilai p PepSite2 < 0.25) dalam berinteraksi dengan enzim.

Oleh itu, adalah dicadangkan bahawa peptida mempunyai keupayaan dalam merencat α -amilase dan berpotensi untuk menjadi prekursor ubat anti-kencing manis.

PENGESAHAN AKTIVITI PERENCATAN BAGI PEPTIDA TERPILIH

Didapati bahawa ME memberikan nilai IC_{50} terendah (1.41 ± 0.00 mg/mL), yang dicalonkan sebagai peptida paling mujarab dalam merencat α -amilase, diikuti oleh LLAH (2.88 ± 0.01 mg/mL), LLPL (4.22 ± 0.01 mg/mL) dan terakhirnya LLHA (8.05 ± 0.07 mg/mL) (Jadual 5). Melalui analisis ini, adalah disahkan bahawa semua peptida terpilih dapat menunjukkan aktiviti perencatan terhadap α -amilase. Perbezaan yang diperhatikan dalam nilai IC_{50} antara peptida boleh dikaitkan dengan variasi panjang urutan, komposisi asid amino, kehidrofobikan dan cas apabila data Jadual 4 dan 5 dibandingkan. Contohnya, perencat amilase paling berkesan dalam kajian ini, ME, merupakan peptida terpendek (dipeptida) dengan berat molekul terendah (278.33 Da). Sifat ini mungkin meningkatkan kecekapan pengikatan dan kebolehaksesannya ke tapak aktif enzim. Komposisi ME termasuk asid glutamik (E), residu bercas negatif dan polar yang mungkin membentuk interaksi elektrostatik dengan residu bercas positif dalam amilase. ME yang menunjukkan skala kehidrofobikan = -0.18 juga lebih hidrofilik dan mempunyai titik isoelektrik lebih rendah, iaitu pI = 4.00, menjadikannya bercas negatif pada pH fisiologi. Sifat ini terus menyokong interaksi enzim yang berkesan, seperti mana yang dibincangkan oleh Li et al. (2024). Sebaliknya, tetrapeptida lebih panjang seperti LLAH, LLPL dan LLHA mengandungi kebanyakan residu hidrofobik bukan polar seperti leusina (L) dan alanina (A), mempunyai berat molekul lebih tinggi (~450 Da) dan menunjukkan aktiviti perencatan lebih lemah daripada ME. Ciri tersebut mungkin menyebabkan kelarutan peptida rendah, halangan sterik yang tinggi dan interaksi kurang berkenan dengan enzim. Sebagai bukti, Mora et al. (2020) telah mendapati bahawa peptida yang menunjukkan halangan sterik rendah adalah lebih berkesan dan cenderung untuk menjalankan fungsinya dengan menstabilkan konformasi enzim.

KESIMPULAN

Aktiviti perencatan α -amilase tertinggi didapati dalam ETBP yang dihasilkan dalam keadaan nisbah enzim kepada substrat 1:10 dan masa hidrolisis pada 2 jam. Pecahan hidrolisat protein kemudiannya dilakukan dan pecahan <3 kDa didapati mengandungi peptida yang sangat aktif. Pendekatan pengenalanpastian berbantuan enzim yang disepadukan dengan kaedah spektrometri jisim tandem telah digunakan untuk mengenal pasti peptida reaktif. Sebanyak empat peptida kebaharuan, iaitu ME, LLHA, LLAH dan LLPL telah dikenal pasti. Peptida ini juga

JADUAL 4. Tapak berinteraksi antara peptida yang dipilih dengan model α -amilase yang berbeza

Model enzim	Peptida	Nilai p	Asid amino dalam peptida yang berinteraksi dengan enzim	Tapak terikat enzim
α -amilase air liur manusia (HSA)	ME	0.03222	Met1, Glu2	His15, Gln41, Val42, Trp58, Tyr62, Asp96, Arg195, His299, Asp300, Arg 337
	LLAH	0.00773	Leu1, Leu1, Ala3, His4	Phe17, Glu18, Trp58, Trp59, Tyr62, His299, Asp300, Tyr342
	LLHA	0.008115	Leu1, Leu2, His3, Ala4	Phe17, Glu18, Trp58, Trp59, Tyr62, Asp197, Glu233, His299, Asp300, Tyr342
	LLPL	0.002099	Leu1, Leu2, Pro3, Leu4	Trp58, Trp59, Tyr62, His299, Asp300
α -amilase pankreas manusia (HPA)	ME	0.05967	Met1, Glu2	His15, Gln41, Trp58, Tyr62, Asp96, Arg195, Glu233, His299, Asp300, Arg337
	LLAH	0.02623	Leu1, Leu1, Ala3, His4	His15, Phe17, Trp58, Trp59, Tyr62, Asp96, Arg195, His299, Asp300, His305
	LLHA	0.04043	Leu1, Leu2, His3, Ala4	Trp58, Trp59, Asp300, His305
	LLPL	0.01306	Leu1, Leu2, Pro3, Leu4	Trp58, Trp59, Asp300, His305, Asp353, Val354, Asn355, Asp356, Trp357

JADUAL 5. Nilai IC_{50} aktiviti perencatan α -amilase bagi ME, LLAH, LLHA dan LLPL

Peptida	Kepekatan (mg/mL)*	% Perencatan	IC_{50} (mg/mL)
ME	0.5	25.73 ± 0.74^a	1.41 ± 0.00^a
	1	38.62 ± 1.48^b	
	1.5	50.73 ± 3.06^c	
	2	70.63 ± 1.19^d	
	3	88.87 ± 0.23^e	
LLAH	2	30.28 ± 1.75^a	2.88 ± 0.01^b
	3	52.81 ± 2.91^b	
	3.5	66.92 ± 2.24^c	
	4	72.12 ± 0.06^d	
	5	87.98 ± 1.41^e	
LLHA	6	29.30 ± 2.21^a	8.05 ± 0.07^d
	7	36.58 ± 3.19^b	
	8	42.45 ± 2.21^c	
	9	58.54 ± 0.65^d	
	10	78.34 ± 0.06^e	
LLPL	2	9.31 ± 1.25^a	4.22 ± 0.01^c
	3	24.94 ± 1.13^b	
	4	36.95 ± 2.30^c	
	5	66.19 ± 0.69^d	
	6	90.48 ± 2.68^e	

Perbandingan dalam lajur dalam jadual dengan data yang ditulis sebagai min $\pm$ sisihan piawai (n= 3). Min dalam lajur yang sama tidak diikuti dengan huruf yang sama adalah berbeza secara signifikan pada tahap keertian $p < 0.05$ mengikut ujian Duncan; *Kepekatan yang digunakan adalah berbeza-beza kerana peptida mempunyai julat aktiviti perencatan yang berbeza yang boleh dikesan

didapati selamat untuk dimakan, kerana sifatnya yang tidak toksik dan bukan agregat. Mekanisme perencatan peptida juga disahkan, iaitu peptida didapati mengikat dengan residu pemangkin aktif di tapak pemangkin enzim. Secara keseluruhannya, aliran kerja kajian ini didapati berjaya dalam mengenal pasti peptida perencatan α -amilase daripada benih *E. tapos* dan penemuan ini boleh menjadi gambaran yang baik untuk pembangunan penyelidikan penemuan ubat.

RUJUKAN

- Apostolidis, E., Kwon, Y.I. & Shetty, K. 2007. Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8(1): 46-54.
- Arshad, N. & Gan, C.Y. 2019. *Elateriospermum tapos* seed protein as a new potential therapeutic for diabetes, obesity and hypertension: Extraction and characterization of protein. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 42(1): 27-43.
- Ashaolu, T.J. & Suttikhana, I. 2023. Plant-based bioactive peptides: A review of their relevant production strategies, *in vivo* bioactivities, action mechanisms and bioaccessibility. *International Journal of Food Science and Technology* 58(5): 2228-2235.
- Baumann, C. & Zerbe, O. 2024. The role of leucine and isoleucine in tuning the hydropathy of class A GPCRs. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 92(1): 15-23.
- Choonhahirun, A. 2010. Proximate composition and functional properties of pra (*Elateriospermum tapos* Blume) seed flour. *African Journal of Biotechnology* 9(36): 5946-5949.
- Daliri, E.B.M., Oh, D.H. & Lee, B.H. 2017. Bioactive peptides. *Foods* 6(5): 32.
- Dwevedi, A. 2016. Basics of enzyme immobilization. In *Enzyme Immobilization*. Springer, Cham. hlm. 21-44.
- Elodi, P., Mora, S. & Krysteva, M. 2005. Investigation of the active center of porcine-pancreatic amylase. *European Journal of Biochemistry* 24(3): 577-582.
- Fan, H., Liu, H., Zhang, Y., Zhang, S., Liu, T. & Wang, D. 2022. Review on plant-derived bioactive peptides: Biological activities, mechanism of action and utilizations in food development. *Journal of Future Foods* 2(2): 143-159.
- Hoang, V.S. & Van Welzen, P.C. 2004. Revision of *Annesijoa*, *Elateriospermum* and the introduced species of *Hevea* in Malesia (Euphorbiaceae). *Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants* 49(2-3): 425-440.
- Ishikawa, K., Nakatani, H., Katsuya, Y. & Fukazawa, C. 2007. Kinetic and structural analysis of enzyme sliding on a substrate: Multiple attack in α -amylase. *Biochemistry* 46(3): 792-798.
- Lan, X., Liao, D., Wu, S., Wang, F., Sun, J. & Tong, Z. 2015. Rapid purification and characterization of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from lizard fish protein hydrolysates with magnetic affinity separation. *Food Chemistry* 182: 136-142.
- Li, M., Chen, M., Sun, Y., Shi, L., Guo, X., Chen, S., Chen, L., Xiong, G., Sun, W., Gao, R., Ke, L., Wang, L. & Wu, W. 2025. Novel computational approaches in the discovery and identification of bioactive peptides: A bioinformatics perspective. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 73(22): 13212-13228.
- Li, W., Yang, S., An, J., Wang, M., Li, H. & Liu, X. 2024. Statistical characterization of food-derived α -amylase inhibitory peptides: Computer simulation and partial least squares regression analysis. *Molecules* 29(2): 395.
- Li, Y.M., Yuan, J., Ren, H., Ji, C.Y., Tao, Y., Wu, Y., Chou, L.Y., Zhang, Y.B. & Cheng, L. 2021. Fine-tuning the micro-environment to optimize the catalytic activity of enzymes immobilized in multivariate metal-organic frameworks. *Journal of the American Chemical Society* 143(37): 15378-15390.
- Mora, L., González-Rogel, D., Heres, A. & Toldrá, F. 2020. Iberian dry-cured ham as a potential source of α -glucosidase-inhibitory peptides. *Journal of Functional Foods* 67: 103840.
- Naeem, M., Malik, M.I., Umar, T., Ashraf, S. & Ahmad, A. 2022. A comprehensive review about bioactive peptides: Sources to future perspective. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 28(6): 155.
- Ngoh, Y.Y. & Gan, C.Y. 2016. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and α -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). *Food Chemistry* 190: 331-337.
- Nguyen, P.H., Sterpone, F. & Derreumaux, P. 2020. Aggregation of disease-related peptides. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 170: 435-460.
- Nirmal, N., Khanashyam, A.C., Shah, K., Awasti, N., Sajith Babu, K., Ucak, İ., Afreen, M., Hassoun, A. & Tuanthong, A. 2024. Plant protein-derived peptides: Frontiers in sustainable food system and applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 8: 1292297.
- Patil, H. & Post, G. 2017. *Kjeldahl Method - Estimation of Protein in Food - Discover Food Tech*. <http://discoverfoodtech.com/protein-estimation-by-kjeldahl-method/> Diakses pada November 12, 2018.
- Rambaran, R.N. & Serpell, L.C. 2010. Amyloid fibrils. *Prion* 2(3): 112-117.
- Rodhi, A.M., Yap, P.G., Olalere, O.A. & Gan, C.Y. 2024. Unveiling α -amylase inhibition: A bioinformatics perspective on peptide properties and amino acid contributions. *Journal of Molecular Structure* 1305: 137768.

- Sarah, S.A., Faradalila, W.N., Salwani, M.S., Amin, I., Karsani, S.A. & Sazili, A.Q. 2016. LC-QTOF-MS identification of porcine-specific peptide in heat treated pork identifies candidate markers for meat species determination. *Food Chemistry* 199: 157-164.
- Shahbal, N., Jing, X., Bhandari, B., Dayananda, B. & Prakash, S. 2023. Effect of enzymatic hydrolysis on solubility and surface properties of pea, rice, hemp, and oat proteins: Implication on high protein concentrations. *Food Bioscience* 53: 102515.
- Silva, A.C.S. & Silveir, J.N. 2013. Correlation between the degree of hydrolysis and the peptide profile of whey protein concentrate hydrolysates: Effect of the enzyme type and reaction time. *American Journal of Food Technology* 8(1): 1-16.
- Su, Y., Chen, S., Liu, S., Wang, Y., Chen, X., Xu, M., Cai, S., Pan, N., Qiao, K., Chen, B., Yang, S. & Liu, Z. 2023. Affinity purification and molecular characterization of angiotensin-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides from *Takifugu flavidus*. *Marine Drugs* 21(10): 522.
- Sun, L., Liu, J., He, Z. & Du, R. 2024. Plant-derived as alternatives to animal-derived bioactive peptides: A review of the preparation, bioactivities, structure–activity relationships, and applications in chronic diseases. *Nutrients* 16(19): 3277.
- Tan, X., Zhang, S., Malde, A.K., Tan, X. & Gilbert, R.G. 2022. Effects of chickpea protein fractions on α -amylase activity in digestion. *Food Hydrocolloids* 133: 108005.
- Trabuco, L.G., Lise, S., Petsalaki, E. & Russell, R.B. 2012. PepSite: Prediction of peptide-binding sites from protein surfaces. *Nucleic Acids Research* 40: 423-427.
- Udenigwe, C.C. 2014. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. *Trends in Food Science and Technology* 36(2): 137-143.
- Waterborg, J.H. 2002. The Lowry method for protein quantitation. Dlm. *The Protein Protocols Handbook*, disunting oleh Walker, J.M. Humana Press: Springer Protocols Handbooks. hlm. 7-10.
- Yang, J., Huang, J., Zhu, Z. & Huang, M. 2020. Investigation of optimal conditions for production of antioxidant peptides from duck blood plasma: Response surface methodology. *Poultry Science* 99(12): 7159-7168.
- Yong, O.Y. & Salimon, J. 2006. Characteristics of *Elateriospermum tapos* seed oil as a new source of oilseed. *Industrial Crops and Products* 24(2): 146-151.
- Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Yu, Y., Liu, B., Liu, J. & Chen, F. 2011. Novel peptides derived from egg white protein inhibiting alpha-glucosidase. *Food Chemistry* 129(4): 1376-1382.
- Zhang, Y. & Romero, H.M. 2020. Exploring the structure-function relationship of Great Northern and navy bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: A study on the effect of enzymatic hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules* 162: 1516-1525.

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: cygan@usm.my