

## Pencirian Bakteria Asid Laktik dan Sebatian Aroma Ikan Pekasam (Characterisation of Lactic Acid Bacteria and Aromatic Compounds in Fermented Fish Pekasam)

WEI CHI TAN, SENG JOE LIM & WAN AIDA WAN MUSTAPHA\*

### ABSTRAK

Dalam kajian ini, bakteria asid laktik (LAB) serta sebatian aroma ikan pekasam daripada spesies yang berbeza ditentukan. Persampelan ikan pekasam iaitu tilapia, loma, lampam, sepat dan gelama diperoleh daripada pembekal Perusahaan Ikan Pekasam Kiah di Kuala Kangsar, Perak. Penentuan spesies LAB dijalankan melalui kaedah pencairan bersiri, pengkulturan LAB, ujian katalase, ujian pewarnaan spora serta ujian pengesanan Gram bakteria dan morfologi. Pengesahan spesies LAB dijalankan melalui pengekstrakan asid deoksiribonukleik (DNA), amplifikasi dengan tindak balas rantaian polimerasi (PCR), analisis elektroforesis gel dan penjujukan DNA. Hasil jujukan DNA yang diperoleh dibandingkan dengan jujukan dalam pangkalan data GenBank di NCBI menggunakan BLAST. Didapati *Lactobacillus brevis* KB290 DNA dan *Lactobacillus casei* W56 wujud dalam pekasam tilapia, *Lactobacillus plantarum* 16 dalam pekasam lampam, *Lactobacillus casei* BD-II kromosom dan *Lactobacillus plantarum* WCFS1 dalam pekasam sepat, *Corynebacterium vitaeuruminis* DSM 20294 dan *Streptococcus anginosus* C1051 dalam pekasam gelama. Manakala *Staphylococcus carnosus* subsp. *carnosus* TM300 kromosom adalah LAB dominan dalam pekasam loma. Sementara itu, sebatian aroma ditentukan melalui kaedah pengekstrakan cecair menggunakan pelarut metanol dan heksana. Pemprofilan sebatian aroma dijalankan dengan kromatografi gas-spektrometer jisim (GC-MS). Sebatian aroma dalam ekstrak metanol dan heksana daripada lima jenis ikan pekasam dibandingkan. Bilangan sebatian aroma yang diekstrak menggunakan metanol adalah lebih banyak berbanding dengan yang menggunakan heksana. Sebatian aroma yang paling banyak dikesan adalah daripada pekasam loma. Asid karboksilik merupakan sebatian yang paling dominan dalam ikan pekasam dan memberi bau hamis serta tengik.

Kata kunci: Bakteria asid laktik; ikan pekasam; sebatian aroma

### ABSTRACT

In this research, lactic acid bacteria (LAB) and aromatic compounds on different species of pekasam were determined. The sampling of pekasam which were tilapia, loma, lampam, sepat and gelama performed at Kiah Pekasam Enterprise at Kuala Kangsar, Perak. Several procedures were performed to determine the LAB, namely, serial dilution, pour plating, enumeration of LAB, catalase test, Gram-staining and determination of LAB morphology. Confirmation of LAB was carried out which were deoxyribonucleic acid (DNA) extraction, amplification of polymerization chain reaction (PCR), gel electrophoresis and DNA sequencing. The DNA sequence for each strain was matched to the available sequence from GenBank database via BLAST at NCBI. *Lactobacillus brevis* KB290 DNA and *Lactobacillus casei* W56 were found on pekasam tilapia, *Lactobacillus plantarum* 16 was on pekasam lampam, *Lactobacillus casei* BD-II chromosome and *Lactobacillus plantarum* WCFS1 were on pekasam sepat, *Corynebacterium vitaeuruminis* DSM 20294 and *Streptococcus anginosus* C1051 were found on pekasam gelama. *Staphylococcus carnosus* subsp. *carnosus* TM300 chromosome was the dominant LAB on pekasam loma. Liquid extraction was carried out to determine the aromatic compounds in pekasam, followed by profiling using gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS). Comparison of aromatic compounds between methanol and hexane extracts from five different species of pekasam was performed. Our findings indicated that the methanol extraction was more efficient compared to that of hexane, as the quantity of aromatic compounds in methanol extract was higher to those using hexane. The highest amount of aromatic compounds produced was from pekasam loma. Carboxylic acids were the most dominant compounds found on pekasam and it gave rancid and 'goaty' off-flavour.

Keywords: Aromatic compounds; asid lactic bacteria; fermented fish pekasam

### PENGENALAN

Protein adalah makronutrien yang penting untuk tumbesaran. Kekurangan pengambilan protein akan menyebabkan perkembangan terbantut. Lebih daripada 70% kanak-kanak adalah dalam keadaan malnutrisi dan sebanyak satu per empat daripada kanak-kanak

berusia lima tahun ke bawah mengalami pertumbuhan terbantut (Lee 2014). Salah satu sumber protein haiwan yang penting di negara-negara Asia Tenggara ialah ikan. Namun, harga ikan segar adalah tinggi dan bekalannya terhad. Dengan memproses ikan kepada pekasam, kualiti produk ikan dapat dikekalkan dan hayat simpanannya

dapat dipanjangkan. Kaedah pengawetan tersebut juga membantu dalam mengatasi masalah kesihatan dan kekurangan sumber protein di Asia Tenggara.

Pekasam merupakan produk fermentasi ikan yang amat disukai orang ramai di Malaysia. Pekasam biasanya diperbuat daripada ikan air tawar dicampur dengan beras panggang, garam, asam keping atau asam jawa dan gula merah. Ikan air tawar yang menjadi pilihan utama untuk penghasilan ikan pekasam termasuklah terubuk, loma, lampam jawa, mata merah, kepar, toman, sepat siam, tilapia dan belida (DOF 2013).

Salah satu kepentingan proses fermentasi adalah wujudnya bakteria asid laktik (LAB) yang memberi manfaat kepada kesihatan kita. LAB merupakan mikroorganisma yang tumbuh ketika proses fermentasi. LAB bersifat Gram-positif, katalase-negatif, mikroaerofilik, mudah membiak dan mampu tumbuh pada suhu dan pH yang rendah (Peterkin 1993). Sebanyak 10 genus LAB termasuklah *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* dan *Vagococcus* biasanya dijumpai dalam produk makanan fermentasi (Yousef & Carlstrom 2003). LAB menghasilkan asid organik seperti asid laktik dan asid asetik akibat fermentasi terhadap karbohidrat daripada beras panggang yang digunakan untuk penghasilan ikan pekasam. Ini menyebabkan penurunan pH dalam produk ikan dan secara langsungnya membantu dalam pengawetan produk ikan pekasam. LAB bertindak sebagai probiotik dan agen antimikrob. Selain daripada meningkatkan mutu dan kualiti ikan pekasam, ia juga memberi manfaat kepada kesihatan kita terutamanya kesihatan gastrousus (Naidu et al. 1999).

Di samping itu, LAB juga memainkan peranan penting dalam pembentukan sebatian aroma pada ikan pekasam. Enzim aminopeptidase yang terdapat pada LAB ini menukarkan peptida kepada asid amino yang kemudiannya menyumbang kepada pembentukan aroma dan perisa produk makanan (Christensen et al. 1999; Peralta et al. 1996; Smit et al. 2005). Selain daripada itu, proses pengoksidaan lipid, proteolisis oleh katepsin dan peptidase dan katabolisma karbohidrat juga menyumbang kepada penghasilan aroma pada ikan pekasam. Keseluruhan bau ikan pekasam bergantung kepada kepekatan, jenis dan kategori sesuatu sebatian aroma.

Penghasilan ikan pekasam bergantung kepada kemahiran dan pengalaman membuat pekasam. Rasa dan aroma ikan pekasam yang dihasilkan adalah berbeza bergantung kepada jangka masa, jenis rempah dan ikan yang digunakan untuk proses fermentasi. Tiada sebarang sistem kawalan kualiti (SOP) yang digunakan oleh industri penghasilan ikan pekasam sama ada industri sederhana ataupun kecil. Kesannya, kualiti dan mutu pekasam yang dihasilkan tidak seragam dan konsisten. Ini telah menyekat pemasaran dan penjualan produk ikan pekasam serta mempengaruhi pilihan pengguna. Selain itu, kajian saintifik juga kurang dijalankan ke atas ikan pekasam. Oleh itu, dijangkakan hasil keputusan kajian ini boleh memberi maklumat saintifik yang berguna mengenai produk ikan

pekasam yang semakin mendapat perhatian pengguna. Kajian ini dijalankan untuk menentukan bakteria asid laktik dan sebatian aroma secara kualitatif pada ikan pekasam yang berbeza spesies.

## BAHAN DAN KAEDAH

### BAHAN

Ikan pekasam komersial diperoleh daripada pembekal Perusahaan Ikan Pekasam Kiah di Kuala Kangsar, Perak. Sampel ikan pekasam yang berbeza spesies telah dibekalkan iaitu ikan tilapia (*Oreochromis mosaambicu*), ikan loma (*Thynnichthys thynnoides*), ikan lampam (*Puntius schwanefeldii*), ikan sepat (*Trichogaster pectoralis*) dan ikan gelama (*Sciaeria* sp.). Persampelan dilakukan pada masa pemprosesan pekasam yang sama untuk setiap spesies ikan. Kit Wizard Penulenan Genom DNA yang digunakan untuk proses pengekstrakan DNA diperoleh daripada Promega Corporation (Wisconsin, Amerika Syarikat).

### KAEDAH

#### PENENTUAN DAN PENGENALPASTIAN SPESIES BAKTERIA ASID LAKTIK

Sebanyak 25.0 g ikan pekasam dilarutkan dalam 225 mL larutan *Maximum Recovery Diluent* (MRD) dan dikulturkan pada agar *de Man, Rogosa, Sharpe* (MRS) melalui kaedah plat tuang. Piring-piring yang mengandungi kultur LAB diinkubasi pada suhu 30°C selama 72 jam. Koloni yang tumbuh pada agar MRS dipindahkan ke dalam larutan kaldu tripton soya dengan menggunakan gelung dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C sebelum ujian katalase, ujian pewarnaan spora, pengesanan Gram bakteria dan penentuan morfologi dijalankan.

#### UJIAN KATALASE, UJIAN PEWARNAAN SPORA, PENGESANAN GRAM BAKTERIA DAN PENENTUAN MORFOLOGI

Dalam ujian katalase, satu titisan hidrogen peroksida diletakkan pada gelas kepingan mikroskop. Koloni mikroorganisma dipindah dan dicampur dengan hidrogen peroksida dengan menggunakan gelung yang steril. Penghasilan gas buih diperhatikan sebagai keputusan positif.

Tujuan ujian pewarnaan Gram dijalankan adalah untuk mengenal pasti keupayaan mikroorganisma mengekalkan bahan pewarna selepas menggunakan bahan penyahwarna seperti etanol. Organisma Gram positif mengekalkan warna pewarna manakala organisma Gram negatif dinyahwarnakan. Kaedah yang digunakan dalam kajian ini adalah merujuk kepada kajian dalam Roberts dan Greenwood (2003). Koloni mikroorganisma diletakkan pada air suling di atas gelas kepingan mikroskop dengan menggunakan gelung yang steril.

Selaput pada gelas kepingan mikroskop dikeringkan dan dipanaskan pada nyala Bunsen sebanyak dua kali. Kemudian, selaput tersebut dibiarkan sejuk kepada suhu biasa. Gelas kepingan mikroskop diletakkan pada rak pewarnaan, dibasuh dengan pewarna ungu hablur dan dibiarkan selama 30 s sebelum dicuci dengan air paip. Selepas itu, gelas kepingan mikroskop dibasuh dengan menggunakan larutan Lugol's iodine dan dibiarkan selama 30 s sebelum dicuci dengan air paip. Alkohol ditambahkan pada gelas kepingan mikroskop tersebut dengan tujuan untuk menyahwarna selaput dan seterusnya dibasuh dengan air paip. Seterusnya, gelas kepingan mikroskop dibasuh dengan larutan safranin dan dibiarkan selama 1 min sebelum dicuci menggunakan air paip. Selaput pada gelas kepingan mikroskop dibiarkan kering. Satu titisan minyak benaman diletakkan pada selaput dan pengesanan mikroorganisma dijalankan dengan menggunakan mikroskop  $\times 100$  pembesaran. Mikroorganisma yang berwarna ungu ialah Gram positif manakala yang berwarna merah jambu ialah Gram negatif. Morfologi mikroorganisma melalui pemerhatian pembesaran mikroskop dicatatkan.

#### PENGESAHAN SPESIES BAKTERIA ASID LAKTIK

Pengekstrakan DNA dijalankan dengan menggunakan kaedah Kit Wizard Penulenan Genom DNA. Campuran tindak balas rantai polimerasi (PCR) disediakan seperti yang ditunjukkan pada Jadual 1. Sebanyak 1.0  $\mu\text{L}$  air bebas nukleus (NFW) digunakan sebagai kawalan negatif DNA manakala 1.0  $\mu\text{L}$  templat DNA dijadikan sebagai kawalan positif. Semua reagen disimpan di dalam ais.

Proses amplifikasi 16S rDNA dijalankan dengan menggunakan *Eppendorf thermal-cycler (Master Cycle Gradient Model 22331, New York, Amerika Syarikat)*. Suhu program bagi penyahaslian pemula ialah 95°C selama 3 min, diikuti dengan 40 kitaran penyahaslian pada suhu 95°C selama 30 s. Kemudian, penyepuhlindungan dijalankan selama 55 s pada suhu 55.0°C, pempolimeran pada suhu 72°C selama seminit dan pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 10 min. Analisis elektroforesis gel (GE) dijalankan dengan menggunakan *Wealtec Corp (Model GES, Nevada, Amerika Syarikat)*. Sebanyak 1.0 g serbuk gel agaros dicampurkan dengan 100 mL larutan penimbal TAE (Tris-Acetate-EDTA) (1 $\times$  larutan penimbal TAE: 40 mM Tris-OH, 20 mM asid asetik dan 1 mM EDTA, pH7.6) untuk menjadikannya 1.0% (w/v) gel agaros.

Larutan agaros diwarnakan dengan pewarna *Florosafe (1st Base, Singapore)*. Sebanyak 5.0 amplicon, 2.5  $\mu\text{L}$  tangga DNA, 5.0  $\mu\text{L}$  kawalan negatif (NFW) dan 5.0  $\mu\text{L}$  kawalan positif (templat DNA) diisi ke dalam lubang pada gel masing-masing dengan menggunakan pipet. Analisis dijalankan dengan menggunakan elektroforesis gel agaros pada 100 V selama 45 min. Proses penvisualan jalur DNA dijalankan dengan UV transilluminator. Produk PCR dihantar bersama dengan primer (27-f dan 1492-r) dan imej GE ke Olipro Biotechnology Sdn. Bhd. (Selangor, Malaysia) untuk proses penjujukan.

#### PENENTUAN SEBATIAN AROMA IKAN PEKASAM

Penentuan sebatian aroma ikan pekasam dilakukan dengan kaedah pengekstrakan cecair menggunakan heksana dan metanol dan seterusnya dianalisis menggunakan kromatografi gas-spektrometer jisim (GC-MS). Sebanyak 10.0 g sampel ikan pekasam dicampurkan dengan 20.0 mL heksana ke dalam tiub pengempar dan divortekskan sehingga larutan menjadi keruh. Kemudian, diemparkan selama lima min pada kadar kelajuan 2000 rpm untuk memisahkan supernatan dengan sampel pekasam. Sebanyak 1.0 mL supernatan dipipet daripada tiub pengempar ke dalam vial kaca. Prosedur yang sama diulangi menggunakan pelarut metanol.

#### PEMROFILAN SEBATIAN AROMA SECARA KUALITATIF

Analisis spektrometer jisim bagi sebatian aroma secara kualitatif dijalankan dengan menggunakan alat kromatografi gas Bruker 436 GC, yang dilengkapi dengan spektrometer jisim Bruker Scion SQ (GC-MS) dari Fremont, California, USA. Alat GC-MS ini dilengkapi dengan penyuntik-auto CombiPAL Auto-Sampler AOC-5000 (Zwingen, Switzerland). Alat GC-MS ini dikawal dengan menggunakan perisian Bruker MS Workstation versi 8.0.1.205, manakala program relau dikawal menggunakan perisian GC Portal versi 4.0.5.27268. Kolum polar Stabilwax (Restek, Pennsylvania, Amerika Syarikat) yang bersaiz 30 m  $\times$  0.25 mm i.d., ketebalan filem 0.25  $\mu\text{m}$  dan gas helium digunakan sebagai fasa bergerak. Kadar aliran sebanyak 500 m/s digunakan. Suhu relau diprogramkan bermula pada 40°C selama 3 min dan seterusnya meningkat kepada 200°C pada kadar 3°C/min. Suhu penyuntik yang digunakan ialah 250°C. Parameter analisis GC-MS adalah mengikut kaedah dalam kajian Giri et al. (2010) dengan sedikit pengubahsuaian.

JADUAL 1. Reagen yang diperlukan untuk campuran PCR

Reagen	Isi padu
PCR <i>Master Mix</i> (DreamTaq)	25.0 $\mu\text{L}$
<i>nucleas free water</i> (NFW)	22.0 $\mu\text{L}$
Templat DNA	1.0 $\mu\text{L}$
Primer 27-f (5'-AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3')	1.0 $\mu\text{L}$
Primer 1492-r (5'-GTT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')	1.0 $\mu\text{L}$
Jumlah	50.0 $\mu\text{L}$

## HASIL DAN PERBINCANGAN

UJIAN KATALASE, UJIAN PEWARNAAN SPORA,  
PENGESANAN GRAM BAKTERIA DAN  
PENENTUAN MORFOLOGI

Selepas dieram selama 72 jam pada suhu 30°C, kultur yang tumbuh pada agar MRS telah dikaji. Kawalan positif *Lactobacillus plantarum* digunakan dalam kajian ini. Pengesanan LAB dilakukan dengan membezakan kultur mengikut saiz, bentuk dan warna koloni. Jadual 2 menunjukkan ciri morfologi koloni bagi setiap sampel ikan pekasam. Kesemua kultur pencilan bersifat katalase-negatif dan Gram-positif (berwarna ungu) apabila diuji dengan hidrogen peroksida dan ujian pewarnaan. Kebanyakan kultur pencilan adalah berbentuk rod dan

berwarna ungu kecuali kultur Lom-1, Lom-2, Lom-3 dan Ge-2 yang berbentuk kokus. Keempat-empat kultur yang berbentuk kokus ini bermungkinan besar ialah genus *Lactococcus* sp., *Streptococcus* sp. atau *Pediococcus* sp.

## PENGESAHAN BAKTERIA ASID LAKTIK

Didapati bahawa kultur pencilan daripada pekasam tilapia, lampam dan sepat adalah genus *Lactobacillus* sp. Menurut Jadual 3, spesies *Lactobacillus brevis* dan *Lactobacillus casei* didapati dalam pekasam tilapia manakala spesies *Lactobacillus plantarum* dalam pekasam lampam. Strain LAB daripada pekasam sepat adalah spesies *Lactobacillus casei* dan *Lactobacillus plantarum*. Penggunaan beras panggang dalam pembuatan pekasam bukan sahaja boleh

JADUAL 2. Ciri-ciri morfologi koloni yang dipencilkan daripada sampel ikan pekasam

Kultur Pencilan	Morfologi Koloni	Morfologi Sel
Ti-1	Bentuk bulat, cembung, berwarna krim, bersaiz besar	Bentuk rod pendek, berpasangan, rantai, berwarna ungu
Ti-2	Bentuk bulat dengan sedikit serpihan, cembung kecil, berwarna krim	Bentuk rod panjang, rantai, berwarna ungu
Ti-3	Bentuk bulat, cembung, berwarna krim, bersaiz kecil	Bentuk rod pendek, berpasangan, rantai, berwarna ungu
La-1	Bentuk bulat, cembung, berwarna krim, bersaiz besar	Bentuk rod panjang, berpasangan, rantai, berwarna ungu
La-2	Bentuk bulat dengan sedikit serpihan, cembung, berwarna krim	Bentuk rod panjang, berpasangan, rantai, berwarna ungu
Lom-1	Bentuk bulat, cembung, berwarna krim, bersaiz besar	Bentuk kokus, berpasangan, tetrad, berwarna ungu
Lom-2	Bentuk bulat, cembung, berwarna krim, bersaiz kecil	Bentuk kokus, berpasangan, tetrad, berwarna ungu
Se-1	Bentuk bulat, cembung, berwarna krim, bersaiz besar	Bentuk rod pendek, berpasangan, rantai, berwarna ungu
Se-2	Bentuk bulat dengan sedikit serpihan, cembung, berwarna krim, bersaiz kecil	Bentuk rod panjang, berpasangan, rantai, berwarna ungu
Se-3	Bentuk bulat, cembung, berwarna krim, bersaiz kecil	Bentuk rod pendek, berpasangan, rantai, berwarna ungu
Ge-1	Bentuk bulat, cembung, berwarna krim, bersaiz besar	Bentuk rod dengan sedikit serpihan, tunggal, kelompok, berwarna ungu
Ge-2	Bentuk bulat, cembung, berwarna krim, bersaiz kecil	Bentuk kokus, tetrad, kelompok, berwarna ungu
Ge-3	Bentuk bulat dengan serpihan, cembung kecil, berwarna krim	Bentuk rod panjang, rantai, tunggal, berwarna ungu
Ge-4	Bentuk bulat dengan sedikit serpihan, cembung kecil, berwarna krim	Bentuk rod panjang, rantai, tunggal, berwarna ungu
PC (Kawalan positif)	Bentuk bulat, cembung, berwarna krim	Bentuk rod panjang, berpasangan, kelompok, berwarna ungu

Ti: kultur pencilan daripada sampel ikan pekasam Tilapia.

La: kultur pencilan daripada sampel ikan pekasam Lampam.

Lom: kultur pencilan daripada sampel ikan pekasam Loma.

Se: kultur pencilan daripada sampel ikan pekasam Sepat.

Ge: kultur pencilan daripada sampel ikan pekasam Gelama.

PC: kultur pencilan daripada sampel *Lactobacillus Plantarum* (Kawalan positif)

menutupi bau hanyir ikan dan menyumbang kepada warna produk pekasam malah juga dapat membekalkan sumber karbohidrat kepada pertumbuhan *Lactobacilli* (Lee et al. 1993). Kajian oleh Rohmah et al. (2012) menunjukkan *L. casei* dan *L. paracasei* yang didapati dalam ikan fermentasi di Malaysia mempunyai fungsi anti-mikrob terhadap *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* dan *Escherichia coli*. Kualiti pekasam terutamanya daripada segi keselamatan dapat ditingkatkan dengan adanya bakteria asid laktik terutamanya *Lactobacilli*.

Strain bakteria daripada pekasam gelama juga merupakan genus LAB, iaitu *Corynebacterium vitaeruminis* dan *Streptococcus anginosus*. *Streptococcus anginosus* biasanya didapati dalam kerongkong dan kolon (Pomwised 2007) namun mengikut kajian lepas oleh Anon (1994) didapati bahawa spesies ini juga terhasil dalam produk fermentasi ikan. *Corynebacterium vitaeruminis* adalah LAB yang muncul pada rumen lembu (Whitman et al. 2012) dan kurang didapati dalam produk makanan fermentasi. Pencemaran bersilang mungkin berlaku semasa proses penghasilan pekasam dan persampelan untuk analisis. Pekasam loma didapati mempunyai *Staphylococcus carnosus* subsp. *Carnosus*. Keputusan positif palsu ini disebabkan oleh *Staphylococcus carnosus* adalah Gram-positif dan seperti LAB menyebabkan kesilapan ketika pengenalpastian spesies LAB dijalankan. Walaupun *Staphylococcus carnosus* tidak dikategori sebagai genus LAB, namun ia juga dijumpai dalam produk makanan fermentasi. *Staphylococcus carnosus* merupakan bakteria Gram-positif yang hanya diiktiraf sebagai GRAS (*generally regarded as safe*) gred makanan dalam kalangan famili *Staphylococci* (Zhang et al. 2013). Spesies ini dengan

campuran *Lactobacilli* dan *Pediococci* digunakan sebagai kultur pemula dalam pembuatan sosej terfermentasi (Vos et al. 2009). Secara keseluruhannya, didapati bahawa sumber ikan yang berbeza mempunyai bakteria LAB yang berbeza.

#### PENENTUAN SEBATIAN AROMA IKAN PEKASAM

Dalam kajian ini, hanya spektrum jisim sebatian aroma dengan 60-100% Indeks Keserupaan (SI) digunakan untuk pengenalpastian sebatian aroma yang terhasil dalam kelima-lima jenis ikan pekasam. Ikan pekasam tilapia yang diekstrak menggunakan heksana menghasilkan 1-etil butil hidroperoksida (84.03% SI), lampam menghasilkan asid oktanoik dan 1-etilbutil hidroperoksida (masing-masing 98.11% SI dan 83.20% SI), loma menghasilkan asid oktanoik, asid 4-metil-pentanoik dan asid butanoik (masing-masing 98.16% SI, 94.62% SI dan 80.75% SI) dan sepat membentuk asid 4-metil-pentanoik, iaitu sebanyak 87.80% SI. Manakala pekasam gelama tidak menghasilkan sebatian aroma yang kebarangkaliannya 80% SI atau lebih daripada 80% SI. Bagi kaedah pengekstrakan menggunakan metanol, pekasam tilapia membentuk 2-pirrolidion dan asid propanoik (masing-masing 83.58% SI dan 81.85% SI), lampam menghasilkan 2-piperidinon, 2-pirrolidinon dan asid propanoik (masing-masing 90.93% SI, 86.43% SI dan 81.78% SI), sepat dan gelama menghasilkan 2-piperidinon (masing-masing 89.35% SI dan 89.90% SI), asid propanoik (masing-masing 84.28% SI dan 81.26% SI) dan 2-pirrolidinon (masing-masing 83.05% SI dan 82.98% SI). Sebatian aroma (80-100% SI) yang terhasil dalam pekasam loma adalah paling banyak, iaitu etil hidrogen suksinat (96.19% SI), asid 4-metil-pentanoik (94.48% SI), asid monometil

JADUAL 3. Ringkasan keputusan analisis penjujukan separa rDNA berdasarkan pangkalan data BLAST dan keterangannya

Spesies Pekasam	Kod sampel	Jenis LAB	Keterangan
Tilapia	Ti-1, Ti-3	<i>Lactobacillus brevis</i> KB290 DNA	Dikategorikan sebagai strain LAB
	Ti-2	<i>Lactobacillus casei</i> W56	Dikategorikan sebagai strain LAB
Lampam	La-1, La-2	<i>Lactobacillus plantarum</i> 16	Dikategorikan sebagai strain LAB
Loma	Lom-1, Lom-2	<i>Staphylococcus carnosus</i> subsp. <i>Carnosus</i> TM300 kromosom	Tidak dikategorikan sebagai strain LAB namun spesies ini adalah <i>Staphylococcus</i> sp. yang hanya diiktiraf sebagai GRAS gred makanan (Zhang et al. 2013)
Sepat	Se-1	<i>Lactobacillus casei</i> BD-II kromosom	Dikategorikan sebagai strain LAB
	Se-2	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	Dikategorikan sebagai strain LAB
Gelama	Ge-1	<i>Corynebacterium vitaeruminis</i> DSM 20294	Dikategorikan sebagai strain LAB namun kurang didapati dalam produk makanan fermentasi dan biasanya dikesan pada rumen lembu (Whitman et al. 2012). Dipercayai bahawa pencemaran bersilang berlaku
	Ge-2	<i>Streptococcus anginosus</i> C1051	Dikategorikan sebagai strain LAB

ester butanadioik (92.69% SI), 2-piperidinon (87.92% SI), 2-pirrolidinon (86.78% SI) dan asid propanoik (83.91% SI). Keputusan nilai Indeks Keserupaan bagi sebatian aroma yang terhasil ditunjukkan dalam Jadual 4 dan 5.

Penggunaan pelarut yang berbeza, iaitu heksana dan metanol dalam pengekstrakan sebatian aroma ikan pekasam telah dibandingkan untuk mengenalpasti kecekapannya. Merujuk kepada Rajah 1, bilangan sebatian aroma meruap terhasil dengan menggunakan pelarut metanol adalah lebih banyak berbanding dengan yang menggunakan pelarut heksana. Namun, pekasam tilapia memperoleh lebih banyak sebatian aroma dengan pelarut heksana (lapan sebatian) berbanding dengan penggunaan pelarut metanol (lima sebatian). Ini disebabkan oleh kegagalan pepadanan spektra atau tidak mempunyai spektra yang sama antara sebatian tidak diketahui dengan sebatian rujukan dalam pekasam yang menggunakan kaedah pengekstrakan dengan metanol.

Metanol yang digunakan dalam pengekstrakan sebatian aroma ikan pekasam ialah pelarut polar, dengan struktur kimianya mempunyai satu kumpulan metil ( $-CH_3$ ) dan satu kumpulan hidroksil ( $-OH$ ). Biasanya metanol digunakan untuk melarut sebatian polar seperti asid lemak dan alkohol (Kotz et al. 2011). Ikatan hidrogen yang terbentuk antara kumpulan  $-OH$  berpolar positif pada metanol dengan kumpulan berpolar negatif pada molekul polar yang lain membolehkan sebatian aroma meruap pada ikan pekasam diekstrak secara berkesan dalam kajian ini.

Heksana yang hanya mempunyai kumpulan metil ( $-CH_3$ ) ini bersifat tidak polar dan hanya mempunyai interaksi yang lemah dengan molekul polar (Richards & Dover 1980). Secara umumnya, sebatian tidak polar hanya larut dalam pelarut tidak polar dan daya ikatannya yang terhasil ialah daya van der Waals. Namun, beberapa kajian melaporkan bahawa sebatian polar boleh larut dalam pelarut tidak polar. Contohnya, isopropil alkohol yang polar larut dalam heksana. Ini disebabkan oleh polariti negatif pada isopropil alkohol yang tertarik kepada polar positif pada heksana dan pensolvatan berlaku. Interaksi daya dwikutub permanen-dipolar aruhan terhasil dan menjadikan heksana polar sementara (Gillespie 1994). Walau bagaimanapun, interaksi daya ini adalah lebih lemah berbanding dengan interaksi ikatan hidrogen pada metanol. Ini menunjukkan pengekstrakan dengan heksana adalah kurang efisien dan berkesan berbanding dengan yang menggunakan metanol kerana hanya sedikit sebatian polar diekstrak dengan heksana.

Secara keseluruhannya didapati sebanyak tiga kumpulan sebatian terhasil, iaitu alkaloid, sebatian peroksida dan asid karboksilik pada pekasam yang menggunakan pelarut heksana manakala bagi yang menggunakan metanol menghasilkan tiga kumpulan sebatian yang lain, iaitu alkaloid, ester dan asid karboksilik. Sebatian peroksida (1-etil butil hidroperoksida dan 1-metil pentil hidroperoksida) tidak didapati pada pekasam yang diekstrak menggunakan pelarut metanol. Selain itu, ester

hanya didapati dalam pekasam loma yang menggunakan pelarut metanol kerana ester merupakan sebatian yang berpolar lemah berbanding dengan sebatian polar lain dan hanya boleh membentuk daya ikatan yang lemah dengan heksana. Oleh itu, Indeks Keserupaan bagi ester dengan heksana adalah rendah atau tidak dapat dikesan dalam kajian ini.

Dalam kajian ini, sebatian aroma yang paling banyak terhasil pada kelima-lima jenis pekasam ialah asid karboksilik. Pekasam loma menghasilkan paling banyak asid karboksilik berbanding dengan jenis pekasam yang lain. Antara asid karboksilik yang paling banyak terhasil ialah asid butanoik, asid pentanoik, asid tetradekanoik dan asid oktadekanoik. Didapati juga asid bercabang seperti 4-metil asid pentanoik dan asid (z,z,z)-9,12,15-oktadekanoik dalam pekasam loma dan sepat. Menurut Montel et al. (1998), asid meruap terbentuk melalui proses lipolisis atau metabolisme asid amino, iaitu pendeaminan valina. Metabolisme lipid yang dijalankan oleh mikroorganisma juga menyumbang kepada pembentukan aroma pada produk makanan fermentasi terutamanya asid lemak. Asid lemak mengalami pengoksidaan melalui mekanisme radikal bebas menghasilkan aldehid dan aldehid bertukar kepada asid karboksilik melalui pengoksidaan berlanjutan (Nielsen 2010). Asid karboksilik juga terhasil daripada yis melalui fermentasi gula, iaitu fermentasi glikolisis atau alkoholik. Beras panggang yang digunakan untuk pembuatan ikan pekasam telah menjadi sumber karbohidrat kepada bakteria asid laktik untuk proses fermentasi (Hui & Evranuz 2012). Ini menunjukkan bahawa asid lemak etil ester, iaitu asid butanadioik monometil ester yang wujud pada pekasam loma terhasil daripada fermentasi gula oleh LAB. Selain itu, asid karboksilik juga boleh dihasilkan melalui pengoksidaan alkohol primer dan aldehid.

Ciri-ciri aroma bagi sebatian yang dikesan dalam sampel pekasam ditunjukkan dalam Jadual 6. Kebanyakan asid karboksilik yang didapati dalam sampel pekasam berbau hamis dan tengik iaitu asid n-dekanoik dan asid oktanoik. Kedua-dua jenis sebatian ini menyumbang kepada bau busuk yang tidak menyenangkan pada pekasam kerana nilai ambangnya yang rendah (Mehta et al. 2012). Indol memberi aroma flora seperti bau jasmin (Gribble 2010) tetapi ia memberi bau najis jika kepekannya tinggi. Menurut kepada Riley (2005), bau hanyir dan tengik dibebaskan apabila enzim lipoksigenase pada kulit dan insang ikan bertindak balas pada sebatian aroma ikan dan hidroperoksida terbentuk. Oleh itu, dibuktikan bahawa 1-etil butil hidroperoksida dan 1-metil pentil hidroperoksida menyumbang kepada bau hanyir ikan pada kelima-lima jenis pekasam. Secara keseluruhannya, didapati jenis ikan yang berbeza mempunyai bakteria LAB yang berbeza, menyumbang kepada penghasilan sebatian meruap yang berbeza semasa fermentasi. Oleh itu, pekasam daripada jenis ikan yang berbeza mempunyai rasa dan aroma yang berbeza.

JADUAL 4. Pengkelasan sebatian aroma pada kelima-lima jenis ikan pekasam yang diekstrak menggunakan heksana dan nilai indeks keserupaan

Klasifikasi Sebatian	Tilapia	Lampam	Loma	Sepat	Gelama
Alkaloid	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indol (72.19% SI)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indol (64.79% SI)</li> </ul>	nd	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indol (67.31% SI)</li> </ul>	nd
Organik peroksida	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidroperoksida, 1-etil butil (84.03% SI)</li> <li>• Hidroperoksida, 1-metil pentil (60.31% SI)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidroperoksida, 1-etil butil (83.20% SI)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidroperoksida, 1-etil butil (77.08% SI)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidroperoksida, 1-etil butil (67.07% SI)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidroperoksida, 1-etil butil (62.78% SI)</li> </ul>
Asid karboksilik	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asid pentadekanoik (73.39% SI)</li> <li>• Asid tetradekanoik (68.11% SI)</li> <li>• Asid butanoik (65.78% SI)</li> <li>• Asid oktadekanoik (63.00% SI)</li> <li>• Asid</li> <li>• n-Heksadekanoik (62.53% SI)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asid oktanoik (98.11% SI)</li> <li>• Asid pentadekanoik (71.06% SI)</li> <li>• Asid butanoik (67.47% SI)</li> <li>• Asid tetradekanoik (66.46% SI)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asid oktanoik (98.16% SI)</li> <li>• Asid pentanoik, 4-metil- (94.62% SI)</li> <li>• Asid butanoik (80.75% SI)</li> <li>• Asid tridekanoik (70.27% SI)</li> <li>• Asid tetradekanoik (69.14% SI)</li> <li>• Asid 9,12,15-oktadekatrienoik, (z,z,z)- (64.66% SI)</li> <li>• Asid oktadekanoik (61.41% SI)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asid pentadekanoik, 4-metil- (87.80% SI)</li> <li>• Asid pentadekanoik (71.55% SI)</li> <li>• Asid tetradekanoik (68.13% SI)</li> <li>• Asid butanoik (61.32% SI)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asid tetradekanoik (71.82% SI)</li> <li>• Asid oktadekanoik (67.10% SI)</li> </ul>

nd: tidak dapat dikesan

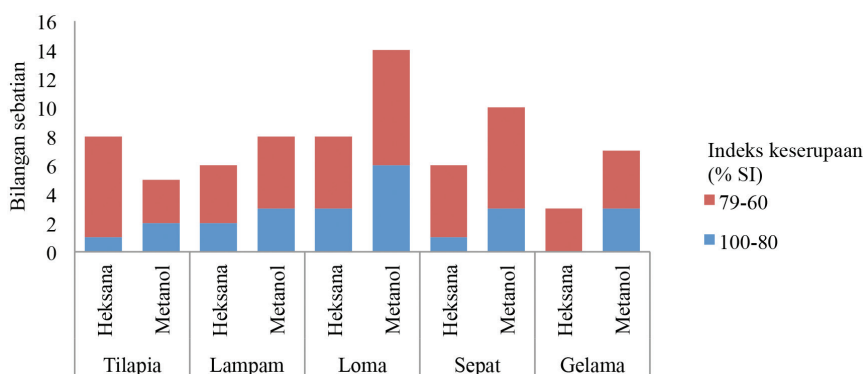
% SI: Indeks Keserupaan

JADUAL 5. Pengelompokan sebatian aroma pada kelima-lima jenis ikan pekasam yang diekstrak menggunakan metanol dan nilai indeks keserupaannya

Klasifikasi Sebatian	Tilapia	Lampam	Loma	Sepat	Gelama
Alkaloid	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2-Piperidinon (83.58% SI)</li> <li>• 2-Pirrolidinon (86.43% SI)</li> <li>• Indol (65.04% SI)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2-Piperidinon (90.93% SI)</li> <li>• 2-Pirrolidinon (86.78% SI)</li> <li>• Indol (65.04% SI)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2-Piperidinon (87.92% SI)</li> <li>• 2-Pirrolidinon (86.78% SI)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2-Piperidinon (89.35% SI)</li> <li>• 2-Pirrolidinon (83.06% SI)</li> <li>• Indol (66.05% SI)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2-Piperidinon (89.90% SI)</li> <li>• 2-Pirrolidinon (82.98% SI)</li> </ul>
Asid karboksilik	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asid pentadekanoik (77.03% SI)</li> <li>• Asid tetradekanoik (70.44% SI)</li> <li>• Asid oktadekanoik (62.18% SI)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asid propanoik (81.78% SI)</li> <li>• Asid pentadekanoik (73.44% SI)</li> <li>• Asid butanoik (70.97% SI)</li> <li>• Asid tetradekanoik (67.31% SI)</li> <li>• Asid n-Heksadekanoik (65.07% SI)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asid pentanoik, 4-metil- (94.48% SI)</li> <li>• Asid butanedioik, ester monometil (92.69% SI)</li> <li>• Asid propanoik (83.91% SI)</li> <li>• Asid tetradekanoik (72.03% SI)</li> <li>• Asid tridekanoik (71.86% SI)</li> <li>• Asid butanoik (69.12% SI)</li> <li>• Asid n-Heksadekanoik (64.30% SI)</li> <li>• Asid 9,12,15-oktadekanoik, (z,z,z)- (63.62% SI)</li> <li>• Asid pentadekanoik (63.34% SI)</li> <li>• Asid aminosiano asetik (62.53% SI)</li> <li>• Asid oktadekanoik (61.24% SI)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asid propanoik (84.28% SI)</li> <li>• Asid undekanoik (75.67% SI)</li> <li>• Asid tetradekanoik (72.67% SI)</li> <li>• Asid n-Heksadekanoik (66.26% SI)</li> <li>• Asid butanoik (65.74% SI)</li> <li>• Asid tridekanoik (63.49% SI)</li> <li>• Asid oktadekanoik (62.98% SI)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asid propanoik (81.26% SI)</li> <li>• Asid butanoik (69.15% SI)</li> <li>• Asid tetradekanoik (66.30% SI)</li> <li>• Asid n-Heksadekanoik (66.12% SI)</li> <li>• Asid oktadekanoik (63.26% SI)</li> </ul>
Ester	nd	nd	Etil hidrogen suksinat (96.19% SI)	nd	nd

nd: tidak dapat dikesan  
% SI: Indeks Keserupaa





RAJAH 1. Bilangan sebatian bagi kelima-lima jenis ikan pekasam yang menggunakan kaedah pengekstrakan heksana dan metanol

JADUAL 6. Ciri-ciri aroma sebatian yang didapati dalam kelima-lima jenis pekasam

Kategori sebatian	Huraian bau
Alkaloid	Jasmin (flora) (Gribble 2010) → Bau amina ringan (Lewis 2007)
Asid karboksilik	Bau cuka (Mehta et al. 2012) Tengik, kemasaman, bau keju dan mentega (Guch & Wayman 2008) Tengik, kemasaman, bau keju dan mentega (Guch & Wayman 2008) Bau hamis (Mehta et al. 2012) → Tengik, bau hamis (Mehta et al. 2012)
Ester	Bau buah, wain (Furia & Bellance 1975) nd Bau buah (Mehta et al. 2012)
Sebatian peroksida	→ Hanyir (Riley 2005)

#### KESIMPULAN

Bakteria Asid Laktik (LAB) yang didapati pada ikan pekasam tilapia, lampam dan sepat ialah genus *Lactobacillus* sp. yang berbentuk rod, Gram-positif dan katalase-negatif. Pekasam gelama mempunyai genus *Corynebacterium* sp. dan *Streptococcus* sp. manakala *Staphylococcus* sp. didapati dalam pekasam loma. Bilangan sebatian aroma yang diekstrak daripada ikan pekasam menggunakan metanol adalah lebih banyak berbanding dengan yang menggunakan heksana. Kumpulan sebatian aroma yang diekstrak menggunakan metanol adalah alkaloid, asid karboksilik dan ester. Pekasam loma menghasilkan paling banyak sebatian aroma berbanding dengan spesies ikan pekasam lain. Asid karboksilik merupakan sebatian meruap yang paling dominan dalam pekasam dan memberi

bau hamis dan tengik. Oleh itu, rasa dan aroma pekasam dipengaruhi oleh jenis ikan yang digunakan.

#### PENGHARGAAN

Setinggi-tinggi penghargaan kepada projek penyelidikan bernombor geran ETP-2013-075, Perusahaan Ikan Pekasam Kiah, Kuala Kangsar, Perak yang membekalkan sampel dan Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia yang menyediakan kemudahan penyelidikan.

#### RUJUKAN

Anon. 1994. *Proceedings of First Symposium on Fish and Fisheries of Pakistan*. Lahore, Pakistan: Department of Zoology, Government College.

- Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pedersen, J.A. & Steele, J.L. 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76(1-4): 217-246.
- DOF. 2013. Fishery Entrepreneur. *Department of Fisheries Malaysia*. <http://www.dof.gov.my/en/fishery-entrepreneur>.
- Lee, D.E.R. 2014. Children's protein consumption in Southeast Asia: Consideration of quality as well as quantity of children's protein consumption in Southeast Asia. *Wharton Research Scholars*. University of Pennsylvania Scholarly Commons.
- Furia, T.E. & Bellance, N. 1975. *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*. Vol. 2. Cleveland: The Chemical Rubber Co. hlm. 149.
- Gillespie, A.M.J. 1994. *Manual of Spectrofluorometric and Spectrophotometric Derivative Experiments*. New York: CRC Press. hlm. 26-28.
- Giri, A., Osako, K. & Ohshima, T. 2010. Identification and characterisation of headspace volatiles of fish Miso, a Japanese fish meat based fermented paste, with special emphasis on effect of fish species and meat washing. *Food Chemistry* 120(2): 621-631.
- Gribble, G.W. 2010. *Heterocyclic Scaffolds II: Reactions and Applications of Indoles*. Vol. 2. Heidelberg, Germany: Springer Science & Business Media. hlm. 42-44.
- Guch, I. & Wayman, K. 2008. *The Complete Idiot's Guide to Organic Chemistry*. New York: Penguin Group. hlm. 210.
- Hui, Y. & Evranuz, E.O. 2012. *Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology*. Boca Raton: CRC Press. hlm. 26-31.
- Kotz, J., Treichel, P. & Townsend, J. 2011. *Chemistry and Chemical Reactivity*. United States: Cengage Learning. hlm. 461-462.
- Lee, C.H., Steinkraus, K.H. & Alan Reilly, P.J. 1993. *Fish Fermentation Technology*. Seoul: United Nations University Press. hlm. 95-102.
- Lewis, R.J. 2007. *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*. New York: John Wiley & Sons Inc. hlm. 842.
- Mehta, B.M., Kamal-Eldin, A. & Iwanski, R.Z. 2012. *Fermentation: Effects on Food Properties*. Boca Raton: CRC Press. hlm. 67.
- Montel, M.C., Masson, F. & Talon, R. 1998. Bacteria role in flavour development. *Meat Science* 49: 111-123.
- Naidu, A.S., Bidlack, W.R. & Clemens, R.A. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 39(1): 13-126.
- Nielsen, S.S. 2010. *Food Analysis*. New York: Springer Science & Business Media.
- Peralta, R., Shimoda, M. & Osajima, Y. 1996. Further identification of volatile compounds in fish sauce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 3606-3610.
- Peterkin, P.I. 1993. Book Review of *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 3rd ed., edited by Vanderzant, C. & Splittstoesser, D.F. In *Trends in Food Science & Technology* 4(6): 199.
- Pomwised, R. 2007. *Studies of Peptide Mimicry of the Group B Streptococcus Type III Capsular Polysaccharide Antigen*. Montana: Montana State University. hlm. 2.
- Richards, E.G. & Dover, S.D. 1980. *An Introduction to the Physical Properties of Large Molecules in Solution*. New York: Cambridge University Press.
- Riley, A.P. 2005. *Food Policy, Control, and Research*. New York: Nova Publisher. hlm.54.
- Roberts, D. & Greenwood, M. 2003. *Practical Food Microbiology*. Massachusetts: Blackwell Publishing. hlm.3.
- Rohmah, A.S., Risa, N. & Puji, A. 2012. Characterisation lactic acid bacteria genus *Leuconostoc* from Allele Pekasam. *Journal of Chemistry* 1(1): 14-20.
- Smit, G., Smit, B.A. & Engels, W.J.M. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology* 29: 591-610.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H. & Whitman, W. 2009. The firmicutes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Athens, USA: Springer Science & Business Media. hlm. 399.
- Whitman, W., Goodfellow, M., Kampfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Ludwig, W., Suzuki, K-i & Parte, A. 2012. The actinobacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Athens, USA: Springer Science & Business Media. hlm. 288.
- Yousef, A.E. & Carlstrom, C. 2003. *Food Microbiology: A Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley & Sons. hlm. 223-225.
- Zhang, T.C., Ouyang, P., Kaplan, S. & Skarnes, B. 2013. *Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012)*. London: Springer Science & Business Media. hlm. 1700-1701.

Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan  
Fakulti Sains dan Teknologi  
Universiti Kebangsaan Malaysia  
43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan  
Malaysia

\*Pengarang untuk surat-menyurat; email: wanaidawm@ukm.edu.my

Diserahkan: 4 September 2015

Diterima: 16 June 2016