



**UJI *IN SILICO* POTENSI PROTEOLITIK ENZIM PAPAIN
DAN ENZIM ZINGIBAIN TERHADAP PROTEIN
PEMBENTUK KATARAK KONGENITAL
DAN SENILIS**

SKRIPSI

oleh

**Gangsar Lintas Damai
NIM 172010101066**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2021**



**UJI *IN SILICO* POTENSI PROTEOLITIK ENZIM PAPAIN
DAN ENZIM ZINGIBAIN TERHADAP PROTEIN
PEMBENTUK KATARAK KONGENITAL
DAN SENILIS**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu
syarat untuk menyelesaikan Studi Pendidikan Dokter (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

oleh

**Gangsar Lintas Damai
NIM 172010101066**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2021**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Orang tua saya, Ibu Alfianah dan Bapak Agus Kurnia atas bimbingan, doa yang tidak pernah berhenti, nasihat, dan cinta kasih;
2. Adik-adik saya, Nuansa Putih Islami dan Sinar Sang Semesta atas inspirasi yang telah diberikan;
3. Keluarga besar Bani Abdul Mukti dan Bani Mahfud Zein atas nasihat, dorongan, dan doa;
4. Semua guru yang telah mendidik saya dengan sabar dan penuh ketulusan sejak usia dini hingga sekarang;
5. Semua teman yang telah memberikan bantuan, semangat, motivasi, dan inspirasi untuk saya;
6. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember

MOTTO

“... Dan barangsiapa yang bertawakkal kepada Allah niscaya Allah akan mencukupkan (keperluan)nya. Sesungguhnya Allah melaksanakan urusan yang (dikehendaki)Nya. Sesungguhnya Allah telah mengadakan ketentuan bagi tiap-tiap sesuatu.

(terjemahan Surat At-Talaq ayat 3)



¹ Departemen Agama Republik Indonesia. 2011. Al-Qur'an dan Terjemahannya. Semarang: CV Asy-Syifa'.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama: Gangsar Lintas Damai

NIM : 172010101066

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Uji *In Silico* Potensi Proteolitik Enzim Papain dan Enzim Zingibain Terhadap Protein Pembentuk Katarak Kongenital dan Senilis” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 16 Februari 2021

Yang menyatakan,



Gangsar Lintas Damai
NIM 162010101046

SKRIPSI

**UJI *IN SILICO* POTENSI PROTEOLITIK ENZIM PAPAIN
DAN ENZIM ZINGIBAIN TERHADAP PROTEIN
PEMBENTUK KATARAK KONGENITAL
DAN SENILIS**

oleh:

Gangsar Lintas Damai

172010101066

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. dr.Nugraha Wahyu Cahyana, Sp.M

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Ayu Munawaroh Aziz M. Biomed.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Uji *In Silico* Potensi Proteolitik Enzim Papain dan Enzim Zingibain terhadap Protein Pembentuk Katarak Kongenital dan Senilis” karya Gangsar Lintas Damai telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Selasa, 16 Februari 2021

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,



Dr. dr.Dina Helianti, M.Kes
NIP 19741104 200003 1 001

Anggota I,



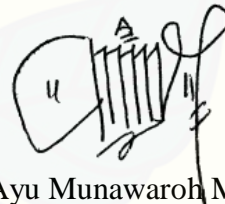
dr.Zahrah Febianti M.Biomed
NIP 19880202 201404 2 001

Anggota II,



Dr. dr.Nugraha Wahyu Cahyana, Sp.M
NIP 19630714 199903 1 001

Anggota III,



dr. Ayu Munawaroh M. Biomed
NIP. 19890313 201404 2 002

Mengesahkan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember,

dr. Supangat, M.Kes.,Ph.D.,Sp.BA
NIP 19730424 199903 1 002

RINGKASAN

Uji *In Silico* Potensi Proteolitik Enzim Papain dan Enzim Zingibain terhadap Protein Pembentuk Katarak Kongenital dan Senilis; Gangsar Lintas Damai; 172010101066; 2020; 72 halaman; Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Katarak kongenital adalah kekeruhan lensa mata yang ditemukan sejak lahir baik bersifat unilateral maupun bilateral. Angka kejadian bergantung pada perkembangan sosial ekonomi suatu daerah, pada negara industri terdapat 1 hingga 6 kasus per 10.000 kelahiran hidup, dan 5 hingga 15 kasus per 10.000 di wilayah termiskin dunia. Katarak senilis adalah kekeruhan lensa mata yang disebabkan proses degenerasi dan ditemukan setelah usia 50 tahun. Katarak senilis adalah katarak yang paling sering ditemukan. Diperkirakan, dari seluruh kasus katarak, 90% nya adalah katarak senilis. Saat ini, operasi pengangkatan lensa mata keruh dan penggantian dengan lensa mata intraokular sintesis merupakan satu-satunya pengobatan katarak yang tersedia. Namun, operasi katarak yang ada membutuhkan luka insisi yang relatif besar dan tidak bebas dari kejadian komplikasi.

Penelitian ini menggunakan uji *in silico molecular docking* untuk mengetahui nilai *binding energy* dan model interaksi pengikatan antara enzim papain dan zingibain terhadap protein pembentuk katarak yaitu protein P23T *crystalline* γ D dan protein β -*amyloid*. Penelitian dilakukan selama bulan Januari 2021 dengan menggunakan situs cluspro.bu.edu. Analisis data hasil *docking* didasarkan dengan nilai *binding energy*. Molekul dengan nilai *binding energy* terendah menunjukkan interaksi yang bersifat stabil dan berpotensi menjadi enzim proteolitik protein pembentuk katarak.

Hasil *docking* antara enzim papain dengan protein P23T *crystalline* γ D menunjukkan 30 model interaksi pengikatan dengan model interaksi pengikatan 1 memiliki nilai *binding energy* terendah sebesar -730.4. Hasil *docking* antara enzim papain dengan protein *B-amyloid* menunjukkan 18 model interaksi pengikatan dengan model interaksi pengikatan 1 memiliki nilai *binding energy* terendah sebesar -697.2. Hasil *docking* antara enzim zingibain dengan protein P23T *crystalline* γ D menunjukkan 30 model interaksi pengikatan dengan model interaksi pengikatan 2 memiliki nilai *binding energy* terendah sebesar -890.5. Hasil *docking* antara enzim zingibain dengan protein *B-amyloid* menunjukkan 11 model interaksi pengikatan dengan model interaksi pengikatan 0 memiliki nilai *binding energy* terendah sebesar -873.5.

Diperoleh kesimpulan bahwa enzim zingibain yang berasal dari tanaman *Zingiber officinale* memiliki kemampuan membentuk ikatan yang lebih stabil terhadap protein P23T *crystalline* γ D dan protein β -*amyloid* dibandingkan dengan enzim papain yang berasal dari tanaman *Carica papaya*.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji In Silico Potensi Proteolitik Enzim Papain dan Enzim Zingibain terhadap Protein Pembentuk Katarak Kongenital dan Senilis”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan Pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. dr. Supangat, M.Kes., Ph.D, Sp.BA selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. Dr. dr.Nugraha Wahyu Cahyana, Sp.M selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr.Ayu Munawaroh Aziz M. Biomed. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan ilmu, arahan dan kemudahan selama proses bimbingan skripsi;
3. Dr. dr. Dina Helianti, M.Kes. selaku Dosen Penguji Utama dan dr.Zahrah Febianti M.Biomed. selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan bimbingan dan kemudahan selama penulisan skripsi;
4. dr. Zahrah Febianti M.Biomed selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah menaruh perhatian dan memberikan dorongan selama menjalani pendidikan di Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
5. Ibu Alfianah dan Bapak Agus Kurnia yang telah memberikan bimbingan, doa yang tidak pernah berhenti, nasihat, dan cinta kasih;
6. Adik-adik saya, Nuansa Putih Islami dan Sinar Sang Semesta yang selalu memberi inspirasi;
7. Keluarga besar Bani Abdul Mukti dan Bani Mahfud Zein yang selalu memberi nasihat, dorongan, dan doa;
8. Sahabat kontrakan berkah Nur Aziz Adi Pratama, Eqiel Navadz Akthar Alami, Bagus Wahyu Mulyono, Mohammad Haekal Faraby, dan Abd. Latif.

9. Sahabat petualang Alda Dwi Rahayu, Avie baldana biizzyk, Dita Rahmania, Firman Pratama Andraputra, Laras Ayu Putri Asyahrie, Marwah pradani ridlo, Thifal Antira puspita, Windayati, dan Elok Tiara P.
10. Rekan-rekan sejawat Vagus, mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Jember angkatan 2017;
11. Mas Udin, mbak Affa, mbak Nidya, mbak Bella, dan mbak Madha yang telah bersedia berbagi ilmu dalam pengerjaan skripsi;
12. Octavia Firstyanasari Amira dan Muhammad habiburrohman yang telah banyak membantu dalam kegiatan *molecular docking*
13. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu.
Penulis menerima kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Februari 2021

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN.....	viii
PRAKATA	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 <i>In silico</i> dan Bioinformatika	5
2.2 <i>Molecular docking</i>	7
2.3 <i>Protein data bank</i>.....	8
2.4 ClusPro.....	9
2.5 Enzim Papain.....	9
2.5.1 Struktur Kimia Enzim Papain.....	10
2.5.2 Isolasi Enzim Papain.....	11
2.5.3 Purifikasi Enzim Papain.....	12
2.6 Enzim Zingibain	15
2.6.1 Struktur Kimia Enzim Zingibain	16

2.6.2 Ekstraksi Enzim Zingibain	17
2.6.3 Purifikasi Enzim Zingibain	17
2.7 Anatomi dan Fisiologi Mata	18
2.8 Protein Crsytalline	20
2.9 Gangguan Mata Akibat Perubahan Protein Crystalline	22
2.9.1 Katarak Kongenital	22
2.9.2 Katarak Senilis.....	25
2.10 Kerangka Konsep Penelitian.....	29
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	31
3.1 Waktu.....	31
3.2 Bahan	31
3.3 Instrumentasi	31
3.4 Definisi Operasional Variabel dan Skala Pengukuran.	31
3.4.1 Variabel Bebas.....	31
3.4.2 Variabel Terikat	31
3.4.3 Variabel Kontrol	32
3.5 Metode	32
3.6 Analisis Data	33
3.7 Alur Penelitian	33
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	34
4.1 Hasil Penelitian	34
4.2 Pembahasan	41
4.2.1 Interaksi Enzim Papain Terhadap Protein P23T <i>crystalline</i> γ D	42
4.2.2 Interaksi Enzim Papain Terhadap Protein β - <i>amyloid</i> .	42
4.2.3 Interaksi Enzim zingibain Terhadap Protein P23T <i>crystalline</i> γ D.....	42
4.2.4 Interaksi Enzim zingibain Terhadap Protein β - <i>amyloid</i>	43
4.2.5 Perbandingan Interaksi Enzim Papain dan Enzim zingibain Terhadap Target <i>Docking</i>	43

4.2.6 Perbandingan Hasil <i>Nilai Binding energy</i> Enzim Papain dengan Penelitian Sebelumnya.	43
4.2.7 Enzim-enzim Lain yang Berpotensi sebagai Proteolitik terhadap Protein P23T <i>crystalline</i> γ D dan Protein β - <i>amyloid</i>	44
4.2.8 Keterbatasan Penelitian	45
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	46
5.1 Kesimpulan	46
5.2 Saran	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN	55

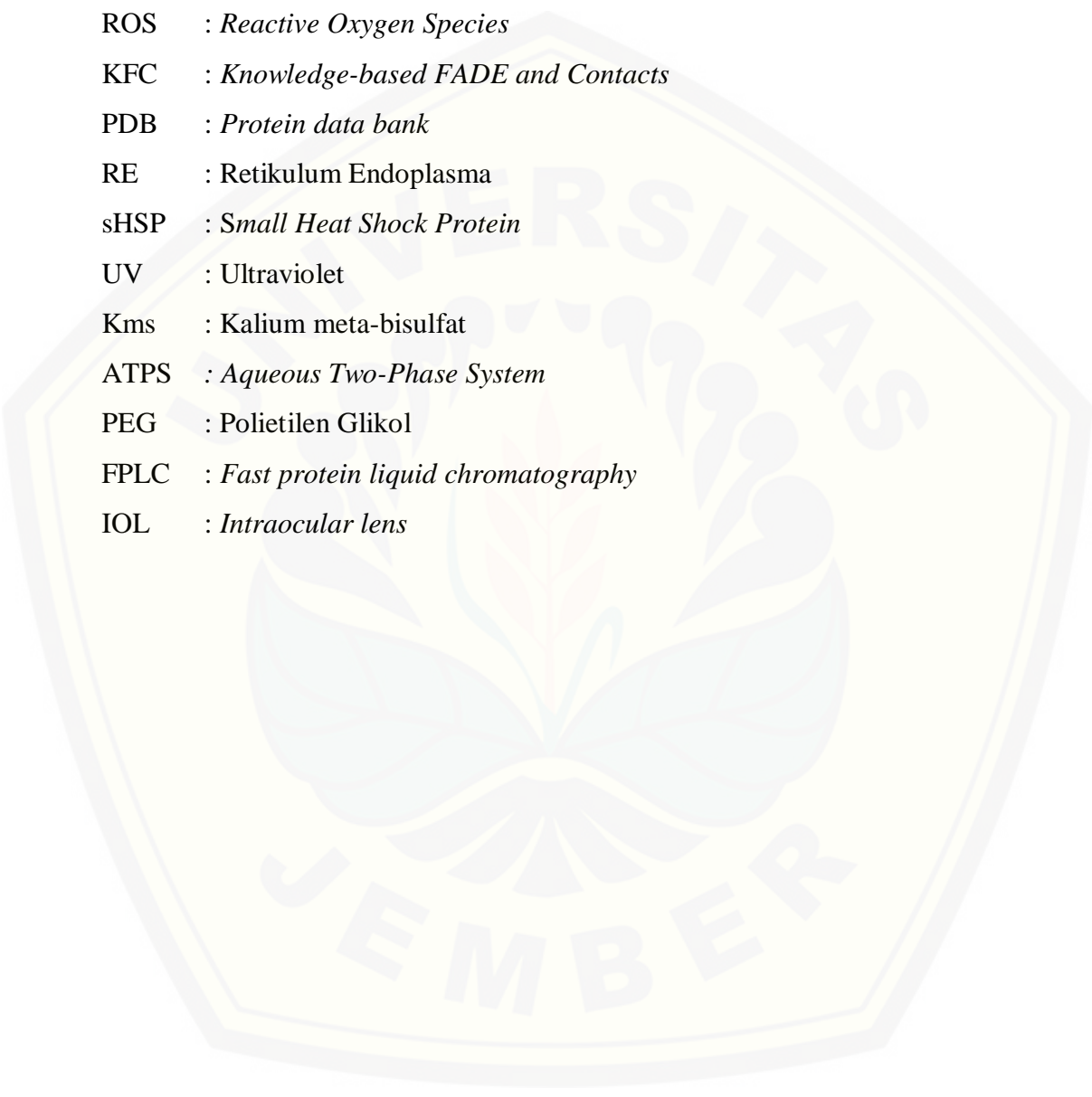
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Ilustrasi docking antara molekul kecil (ligan) dengan reseptor.....	8
2.2 Struktur papain pada resolusi 1,65 angstroms	10
2.3 Struktur zingibain pada resolusi 2,1 angstroms	16
2.4 Anatomi lensa mata bagian anterior dan posterior	19
2.5 Anatomi lensa mata berdasarkan lapisan	19
2.6 Proses terbentuknya agregasi protein penyusun katarak pada lensa mata mata.....	28
2.7 Kerangka konsep penelitian.....	29
3.1 Alur penelitian	33
4.1 Model interaksi pengikatan 1 enzim papain terhadap protein P23T <i>crystalline</i> γ D.....	39
4.2 Model interaksi pengikatan 1 enzim papain terhadap protein <i>B-amyloid</i>	39
4.3 Model interaksi pengikatan 2 enzim zingibain terhadap protein P23T <i>crystalline</i> γ D.....	40
4.4 Model interaksi pengikatan 0 enzim zingibain terhadap protein <i>B-amyloid</i>	40

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Protein <i>crystalline</i> utama yang terletak pada lensa mata manusia....	22
4.1 Nilai <i>binding energy</i> enzim papain terhadap protein P23T <i>crystalline</i> γ D 21	34
4.2 Nilai <i>binding energy</i> enzim papain terhadap protein <i>B-amyloid</i>	35
4.3 Nilai <i>binding energy</i> enzim zingibain terhadap protein P23T <i>crystalline</i> γ D.....	36
4.4 Nilai <i>binding energy</i> enzim zingibain terhadap protein <i>B-amyloid</i>	37
4.5 Perbandingan Nilai <i>binding energy</i> setiap enzim terhadap target <i>Docking</i>	38

DAFTAR SINGKATAN



A β	: <i>β-amyloid</i>
APP	: <i>Amyloid-β Precursor Protein</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
KFC	: <i>Knowledge-based FADE and Contacts</i>
PDB	: <i>Protein data bank</i>
RE	: <i>Retikulum Endoplasma</i>
sHSP	: <i>Small Heat Shock Protein</i>
UV	: <i>Ultraviolet</i>
Kms	: <i>Kalium meta-bisulfat</i>
ATPS	: <i>Aqueous Two-Phase System</i>
PEG	: <i>Polietilen Glikol</i>
FPLC	: <i>Fast protein liquid chromatography</i>
IOL	: <i>Intraocular lens</i>

BAB 1. PENDAHULUAN

1. 1 Latar Belakang

Lensa mata adalah struktur bikonveks transparan yang dilingkupi oleh kapsul, terletak tepat di belakang iris dan di depan badan vitreous. Secara histologis lensa mata tersusun dari tiga struktur, yaitu kapsul, epitel subkapsular anterior, dan substansi lensa mata (korteks dan nukleus) (Chakrabarti, 2017; Astari, 2018). Lensa mata memiliki fungsi untuk memancarkan dan memfokuskan cahaya ke retina. Lensa mata mengandung konsentrasi protein tertinggi di tubuh manusia untuk memfasilitasi fungsi tersebut. Sebanyak 60% dari total massa lensa mata terdiri dari protein. Protein *Crystalline* lensa mata merupakan komponen utama yang menyusun sekitar 90% protein lensa mata yang larut dalam air, bersama dengan komponen sitoskeletal, termasuk aktin, miosin, vimentin, α -aktinin, dan mikrotubulus (Hejtmancik dkk., 2015).

Famili α - dan $\beta\gamma$ -*crystalline* adalah protein *crystalline* utama pada lensa mata (Wistow, 2012). α -*Crystalline* berfungsi mengenali fitur konformasi protein dan memisahkan *conformer* protein yang mengalami *misfolded/unfolded* satu sama lain (Clark dkk., 2012; Laganowsky, 2010). Peran $\beta\gamma$ -*crystalline* tidak begitu jelas (Slingsby dan Wistow, 2014). Diduga $\beta\gamma$ -*crystalline* berperan dalam mempertahankan kadar air lensa mata tetap rendah, sesuai dengan kondisi lensa mata yang memiliki konsentrasi protein tinggi (Chen dkk., 2014).

Perubahan struktural pada protein *crystalline* lensa mata akibat proses degenerasi ataupun mutasi materi genetik dapat menyebabkan gangguan lensa mata seperti katarak kongenital dan katarak senilis. Katarak kongenital adalah kekeruhan lensa mata yang ditemukan sejak lahir (AAO, 2019). Penelitian pada tingkat genetik menunjukkan setidaknya 15 mutasi berbeda pada gen *crystalline* terlibat dalam pembentukan katarak dan memiliki beragam fenotip (Moore, 2004). Mutan P23T protein *crystalline* gamma lensa memiliki berat molekul yang semakin meningkat dan cenderung beragregasi sehingga berkaitan dengan terbentuknya katarak kongenital (Pande dkk., 2003).

Katarak senilis adalah kekeruhan lensa mata yang disebabkan proses degenerasi dan ditemukan setelah usia 50 tahun (Ilyas dan Yulianti, 2014). Proses agregasi protein pembentuk katarak terkait dengan jalur pembentukan struktur amiloid. Seiring bertambahnya usia terjadi peningkatan aktivitas β -secretase (Fukumoto dkk., 2004). β - dan γ -secretase adalah enzim yang mengkatalis *Amyloid- β Precursor Protein* (APP) menjadi struktur β -amyloid ($A\beta$) (Strooper dan Annaert, 2000). β -amyloid ($A\beta$) memiliki kaitan kuat dengan stres oksidatif (Takagane dkk., 2015). Radikal bebas, termasuk beberapa *Reactive Oxygen Species* (ROS) seperti SO_2 , H_2O_2 , dan SOH dapat menyebabkan kerusakan struktural lensa *crystalline* dan berkontribusi pada pembentukan katarak (Ho dkk., 2010). Berkurangnya α -Crystalline seiring bertambahnya usia menyebabkan $\beta\gamma$ -Crystalline yang rusak (mengalami *misfolding* atau *unfolding*) menjadi agregat yang menyebabkan kekeruhan mata (Moreau dan King, 2012).

Katarak kongenital dan senilis yang tidak ditangani dapat menyebabkan gangguan pengelihatian hingga kebutaan. Saat ini, operasi pengangkatan lensa mata keruh dan penggantian dengan lensa mata intraokular sintetis merupakan satu-satunya pengobatan katarak yang tersedia (Sreelakshmi dan Abraham, 2016). Namun, operasi katarak memerlukan biaya yang cukup besar dan kurangnya fasilitas terutama pada negara-negara berkembang dunia. Operasi katarak juga tidak bebas dari kejadian komplikasi (Cahyana dkk., 2020). Diperlukan upaya lain untuk mencegah dan mengobati gangguan lensa mata lebih lanjut. Seperti penggunaan bahan alam yang memiliki potensi proteolitik antara lain pepaya dan jahe.

Pepaya (*Carica papaya L*) merupakan salah satu buah yang telah dikenal luas di Indonesia. Pepaya banyak dimanfaatkan sebagai pelunak daging (Anggraini dkk., 2020). Enzim papain adalah enzim protease yang diisolasi dari lateks pepaya. Enzim papain menunjukkan efektivitas proteolitik yang luas terhadap protein, rantai pendek peptida, ester asam amino dan amida dan juga diterapkan secara luas di bidang makanan dan obat-obatan (Amri dan Mamboya, 2012).

Jahe (*Zingiber officinale*) berasal dari Asia Pasifik yang tersebar dari India sampai Cina. Sumatra Utara, Bengkulu, Jawa Barat, Jawa Tengah dan Jawa Timur merupakan pusat jahe di Indonesia (Prima dkk., 2017). Studi sebelumnya menunjukkan bahwa protease jahe atau enzim zingibain menunjukkan aktivitas proteolitik tinggi (Nafi dkk., 2013).

Diperlukan penelitian untuk menilai potensi suatu bahan aktif dalam menimbulkan efek obat yang diinginkan. Salah satu metode penelitian yang murah dan cepat untuk membuktikan hal tersebut adalah dengan metode *in silico*. *In silico* dapat memprediksi efek biologis dari suatu bahan aktif melalui teknologi komputerisasi dengan tujuan untuk menemukan obat baru (Chikhale dkk., 2020). *Molecular docking* adalah salah satu metode *in silico* yang dapat memprediksi kemampuan suatu bahan aktif (ligan) membentuk ikatan dengan protein target (seperti reseptor) agar membentuk kompleks yang stabil dan menilai kekuatan aktivasi atau inhibisi ikatan tersebut (Wadood dkk., 2011). Interaksi ini didasarkan pada *binding energy* atau energi pengikatan, semakin kecil nilai *binding energy*, maka ikatan akan semakin mudah terbentuk (Laily dan Khoiri, 2016). Aplikasi atau *software* yang dapat dipakai untuk menjalankan *molecular docking* adalah Cluspro (Kozakov dkk., 2017).

Enzim protease yang berasal dari tanaman papaya (enzim papain) maupun jahe (enzim zingibain) memiliki efek proteolitik yang berpotensi melisiskan protein *Crystalline P23T γ D* dan protein *β -amyloid (A β)* sehingga dapat menjadi alternatif penanganan dari katarak. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa penggunaan protease dari tanaman seperti enzim papain dapat menurunkan terjadinya opasitas vitreous mata (Takeuchi dkk., 2020). Namun, belum ada penelitian tentang enzim papain dan zingibain terkait efek proteolitik pada protein *Crystalline P23T γ D* dan protein *β -amyloid*.

Berdasarkan penjelasan di atas perlu dilakukan penelitian yang diawali dengan uji *in silico* berupa *molecular docking* dengan menggunakan perangkat lunak ClusPro sehingga dapat mengetahui potensi proteolitik enzim papain dan zingibain terhadap protein *Crystalline P23T γ D* dan protein *β -amyloid (A β)* pembentuk katarak kongenital dan senilis.

1. 2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah yang akan dibahas pada penelitian ini yaitu:

1. Bagaimana nilai *binding energy* antara enzim papain dan enzim zingibain terhadap protein *Crystalline P23T γ D* melalui uji *in silico* ?
2. Bagaimana nilai *binding energy* antara enzim papain dan enzim zingibain terhadap protein *β -amyloid (A β)* melalui uji *in silico* ?
3. Bagaimana perbandingan nilai *binding energy* antara enzim papain dan enzim zingibain terhadap protein *Crystalline P23T γ D* melalui uji *in silico* ?
4. Bagaimana Perbandingan nilai *binding energy* antara enzim papain dan enzim zingibain terhadap protein *β -amyloid (A β)* melalui uji *in silico* ?

1. 3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. Mengetahui nilai *binding energy* antara enzim papain dan enzim zingibain terhadap terhadap protein *Crystalline P23T γ D* melalui uji *in silico*.
2. Mengetahui nilai *binding energy* antara enzim papain dan enzim zingibain terhadap terhadap protein *β -amyloid (A β)* melalui uji *in silico*.
3. Mengetahui perbandingan nilai *binding energy* antara enzim papain dan enzim zingibain terhadap protein *Crystalline P23T γ D* melalui uji *in silico*.
4. Mengetahui perbandingan nilai *binding energy* antara enzim papain dan enzim zingibain terhadap protein *β -amyloid (A β)* melalui uji *in silico*.

1. 4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Bagi Peneliti

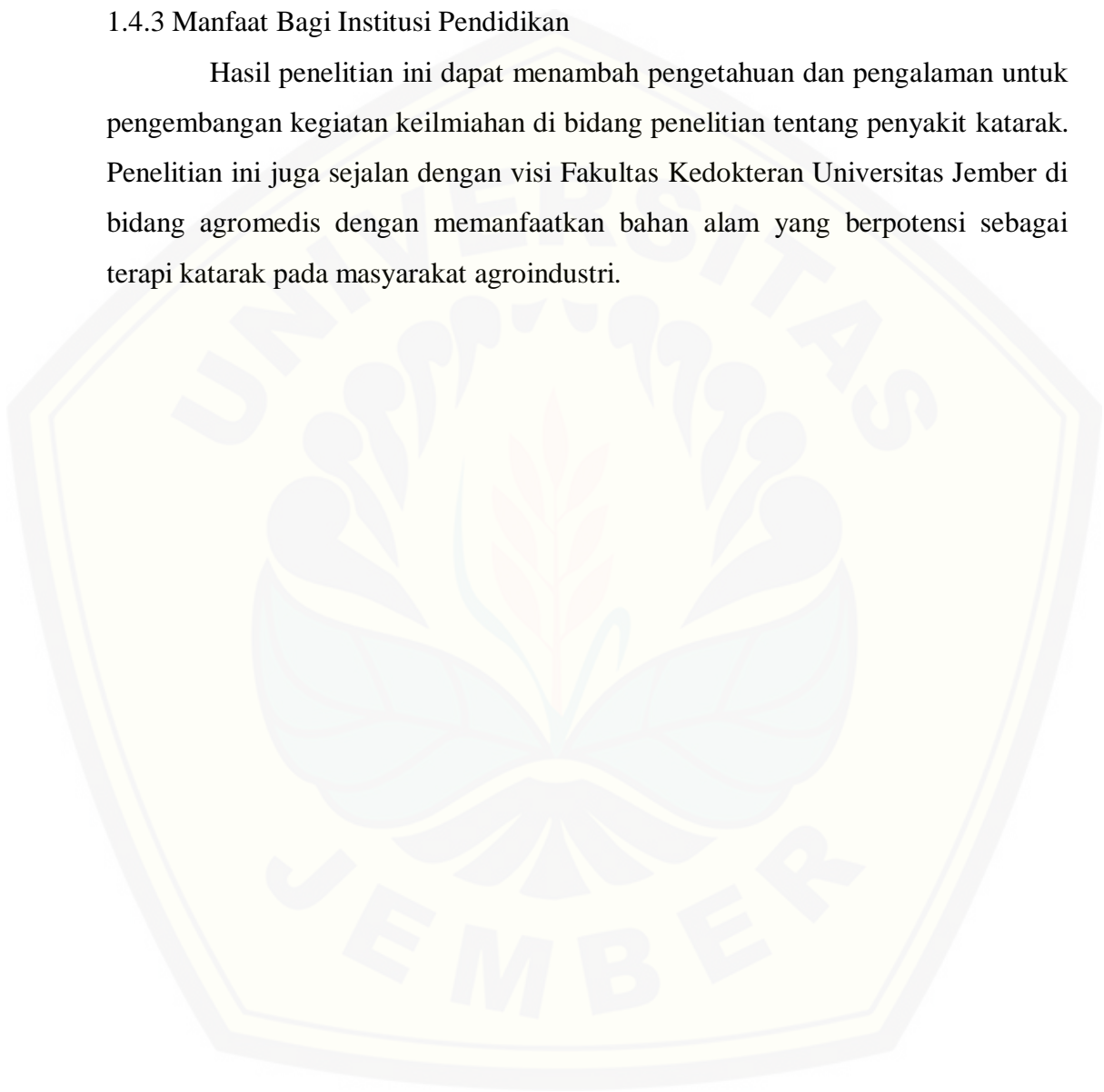
Peneliti dapat mengetahui model interaksi pengikatan dan *binding energy* antara enzim papain dan enzim enzim zingibain sebagai proteolitik terhadap protein *Crystalline P23T γ D* dan protein *β -amyloid (A β)*. Sehingga dapat mengetahui potensi enzim papain dan enzim zingibain sebagai tatalaksana katarak secara *in silico*.

1.4.2 Manfaat Bagi Penelitian Lain

Peneliti lain dapat menggunakan hasil penelitian ini sebagai acuan untuk melakukan penelitian pengobatan katarak lebih lanjut.

1.4.3 Manfaat Bagi Institusi Pendidikan

Hasil penelitian ini dapat menambah pengetahuan dan pengalaman untuk pengembangan kegiatan keilmiahan di bidang penelitian tentang penyakit katarak. Penelitian ini juga sejalan dengan visi Fakultas Kedokteran Universitas Jember di bidang agromedis dengan memanfaatkan bahan alam yang berpotensi sebagai terapi katarak pada masyarakat agroindustri.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *In silico* dan Bioinformatika

Istilah *in silico* berasal dari logam penyusun chip komputer yang terbuat dari silica (Si) (Noori dan Spanagel, 2013). *In silico* dapat diartikan sebagai cara untuk mengupayakan pendekatan terhadap suatu kondisi nyata ke dalam simulasi yang dijalankan melalui komputer dengan menggunakan *software* atau aplikasi tertentu (Suharna, 2012). Bioinformatika adalah ilmu multidisiplin yang memanfaatkan teknik komputasi untuk memecahkan masalah keilmuan berbagai bidang seperti kimia, biologi, kedokteran, farmasi, dengan menggunakan metode statistika dan matematika. Paulien Hogeweg dikenal sebagai tokoh yang memunculkan istilah bioinformatika pada tahun 1970. Perkembangan bioinformatika dimulai hanya pada informasi sekuens DNA dan kini berkembang secara signifikan dengan adanya rumpun ilmu terkait dengan bioinformatika, seperti medikal komputasi, biofisika, dan kimia komputasi.

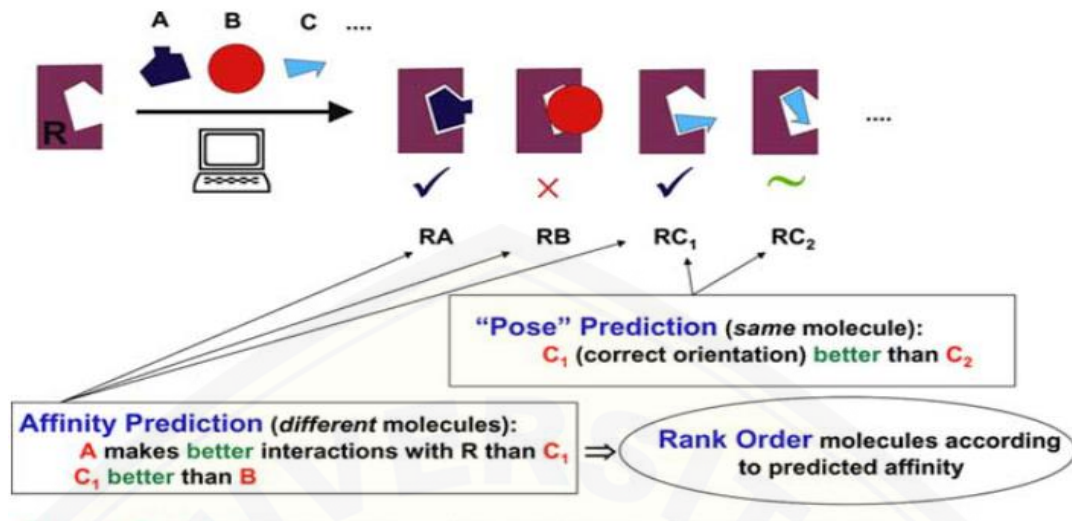
Salah satu bentuk aplikasi bioinformatika adalah untuk mendesain kandidat molekul obat (*drug design*). *Drug design* dilakukan untuk mengetahui aktivitas kimia suatu kandidat molekul obat melalui metode komputasi. Bioinformatika berperan membantu memudahkan menghitung karakter molekul yang kompleks dengan algoritma tertentu melalui bahasa pemrograman untuk menentukan desain molekul obat. Bioinformatika memiliki keunggulan dibanding penelitian dengan skala laboratorium, seperti kemampuan untuk menentukan asam – asam amino terkait dengan reaksi enzimatik (Syahputra dkk., 2014), mengamati kondisi *foldings* dan *unfolding* dari suatu protein/enzim (Sawitri dkk., 2014), dan mengamati panjang ikatan kimia maupun jenis ikatan kimia yang berperan dalam reaksi pada *drug design* (Arwansyah dkk., 2014). Oleh karena itu, kemampuan bioinformatika untuk desain molekul obat mampu menekan biaya dan mengurangi waktu yang dibutuhkan dalam penemuan kandidat molekul obat.

Cara yang umumnya dipakai untuk *drug design* berdasarkan pendekatan bioinformatika adalah simulasi *docking*. Cara ini digunakan untuk membantu proses *virtual screening* demi mencari kandidat molekul obat (ligan) berdasar

nilai interaksi antara ligan dan reseptor. Parameter interaksi yang dapat digunakan adalah ikatan diantara reseptor dan ligan, konformasi bentuk ligan saat berinteraksi dengan reseptor, dan evaluasi afinitas ligan dengan reseptor ditinjau dari energi bebas Gibbs (ΔG). Simulasi *docking* bisa dipakai untuk menilai interaksi antara kandidat molekul obat terhadap reseptor sel. Kandidat molekul obat yang terpilih melalui simulasi *docking* dilanjutkan melalui uji coba di laboratorium (Rao dan Srinivas, 2011).

2.2 Molecular docking

Molecular docking adalah prosedur komputasi yang bertujuan untuk memprediksi orientasi terbaik ligan ke target makromolekulernya (reseptor), keduanya terikat satu sama lain untuk membentuk kompleks yang stabil. Bhagavan (2002) menjelaskan bahwa Interaksi substrat-enzim dapat diterapkan pada hubungan ligan-reseptor. Ligan dapat berasosiasi/menjenuhkan atau berdisosiasi dengan reseptor. Hal ini sesuai dengan dengan interaksi substrat-enzim. Substrat berasosiasi/menjenuhkan tempat pengikatan dan akan dimodifikasi pada lokasi katalitik enzim (Blanco dan Gustavo, 2017). Ada beberapa perangkat lunak yang dapat digunakan untuk melakukan *docking*. Meskipun setiap program beroperasi dengan cara yang sedikit berbeda, beberapa fitur umum ada pada semua program yang melibatkan ligan dan reseptor, *sampling*, dan *scoring*. *Sampling* memerlukan konformasi dan lokasi orientasi ligan dalam batasan pengikatan situs reseptor. *Scoring* dapat digunakan untuk memilih konformasi ligan terbaik, orientasi, dan pose, serta mengklasifikasikan konfirmasi tersebut dalam urutan peringkat. *Docking* yang sukses harus memprediksi secara akurat salah satu atau dua dari struktur ligan (prediksi pose) dan kecenderungan membentuk ikatan (prediksi afinitas). Salah satu batasan paling signifikan dalam *docking* adalah hal itu biasanya dilakukan sambil menjaga permukaan protein tetap kaku, yang mencegah pertimbangan efek kecocokan yang diinduksi dalam situs pengikatan (Pérez, 2014).



(R) Reseptor; (A,B,C) Ligan

Gambar 2.1 Ilustrasi *docking* antara molekul kecil (ligan) dengan reseptor (Sumber: Kroemer, 2007)

Analisis *docking* bertujuan untuk mengidentifikasi interaksi antara protein ligan dan reseptor. Interaksi ini didasarkan pada *binding energy* atau energi yang dibutuhkan untuk membentuk suatu ikatan (Mohammedali, 2015). Energi negatif menunjukkan selama proses pembentukan ikatan tidak diperlukan energi dari lingkungan melainkan ikatanlah yang melepaskan energi ke lingkungan. Oleh karena itu, semakin kecil atau negatif *binding energy* maka afinitas ligan dan protein semakin baik atau ikatan yang dibentuk semakin stabil/kuat (Asthana, 2014; Mehraban, 2015). Hasil analisis penambatan disajikan dalam kumpulan model interaksi. Model interaksi yang memiliki *binding energy* paling rendah adalah yang akan digunakan (Laily dan Khoiri, 2016; Afriza dkk., 2018).

2.3 Protein Data Bank

Protein data bank (PDB) adalah arsip global tunggal dari data struktur tiga dimensi (3D) yang ditentukan secara eksperimental dari makromolekul biologis. Sejak 2003, PDB telah dikelola oleh *Worldwide Protein data bank* (wwPDB; wwpdb.org), sebuah konsorsium internasional yang secara kolaboratif mengawasi deposisi, validasi, biokurasi, dan penyebaran akses terbuka data

struktur makromolekuler 3D. Arsip Inti PDB menampung koordinat atom 3D lebih dari 144.000 model struktural protein, DNA / RNA, serta struktur kompleks dengan logam dan molekul kecil serta data eksperimental dan metadata terkait. Struktur dan data / metadata eksperimental juga disimpan di Arsip Inti PDB menggunakan format data master PDBx / mmCIF wwPDB yang dapat diperluas, yang akan terus berkembang karena data / metadata dari teknik eksperimental baru dan metode penentuan struktur digabungkan oleh wwPDB (wwPDB Consortium, 2019). Untuk mengakses PDB dapat dengan membuka alamat <http://www.rcsb.org/>

2.4 ClusPro

Server ClusPro (<https://cluspro.org>) adalah alat yang banyak digunakan untuk *docking* protein-protein. Server ini menyediakan halaman beranda yang sederhana, hanya membutuhkan dua file dalam format *Protein data bank* (PDB). Pengguna cukup mengunggah dua struktur protein, atau masukkan kode PDB dari struktur masing-masing protein, ClusPro secara otomatis akan mengunduh dari server PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>). Namun, ClusPro juga menawarkan sejumlah opsi lanjutan untuk memodifikasi pencarian; ini termasuk penghilangan daerah protein tidak terstruktur, penerapan daya tarik atau tolakan, akuntansi untuk batasan jarak berpasangan, konstruksi homo-multimer, pertimbangan data hamburan sinar-X sudut kecil, dan lokasi situs pengikatan. Enam fungsi energi yang berbeda dapat digunakan, tergantung pada jenis proteinnya. *Docking* dengan setiap set parameter energi menghasilkan sepuluh model yang ditentukan oleh pusat cluster dari struktur *docking* energi rendah. Protokol ini menjelaskan penggunaan berbagai opsi, pembuatan file penahan tambahan, pemilihan parameter energi, dan analisis hasil. Meskipun server banyak digunakan, proses umumnya selesai dalam <4 jam (Kozakov dkk., 2017).

2.5 Enzim Papain

Papain adalah sistein enzim protease endolitik tumbuhan yang diisolasi dari lateks pepaya (*Carica pepaya L.*). Papain diperoleh dengan memotong kulit

pepaya mentah lateks yang mengalir dari sayatan kemudian dikumpulkan dan dikeringkan. Semakin hijau buahnya, papain bersifat lebih aktif. Enzim papain tergolong dalam superfamili papain, sebagai enzim proteolitik, papain sangat penting dalam banyak proses biologis vital di semua organisme hidup. Papain menunjukkan aktivitas proteolitik ekstensif terhadap protein, peptida rantai pendek, ester asam amino dan tautan amida dan diterapkan secara luas di bidang makanan dan obat-obatan. Papain secara istimewa memotong ikatan peptida melibatkan asam amino dasar, terutama arginin, lisin dan residu setelah fenilalanin (Amri dan Mamboya, 2012).

2.5.1 Struktur Kimia Enzim Papain

Papain merupakan polipeptida non-glikosilasi rantai tunggal dari 212 asam amino (23.429 Da) mengandung tiga disulfide obligasi. Proteinnya relatif basa, dengan pH 8,75. Struktur resolusi 2,8 Å awal telah disempurnakan hingga 1,65 Å. Sejumlah struktur juga tersedia untuk kompleks papain dengan ligan dan inhibitor. Itu rantai polipeptida terlipat membentuk protein globular dengan dua domain berinteraksi yang membatasi celah di permukaan enzim tempat substrat dapat mengikat. Bentuk aktif papain terdiri dari pasangan ion tiolat-imidazolium yang dibentuk oleh residu situs aktif Cys25 dan His159 (Di 1, 2013). Papain dapat diakses dengan kode 9PAP pada PDB.



Gambar 2.2 Struktur papain pada resolusi 1,65 angstroms (Sumber: Kamphuis dkk., 1984)

2.5.2 Isolasi Enzim Papain

Islam (2013) menjelaskan cara untuk mengisolasi enzim papain melalui beberapa langkah seperti mengumpulkan dan mengekstraksi latex hingga pembersihan dan pengayakan.

1. Pengumpulan dan Ekstraksi Lateks

Buah pepaya mentah dan matang yang masih berwarna hijau dikumpulkan di pagi hari dan kemudian dilanjutkan dengan memotong kulitnya dan mengambil getah putih susu. Penyiapan buah dimulai saat pagi dan selesai menjelang sore hari (yaitu selama periode kelembaban tinggi). Pada kelembaban rendah, aliran lateks rendah. Sayatan dibuat menggunakan silet *stainless* baja atau pisau tajam dari kayu. Pisau tidak boleh menonjol lebih dari sekitar 2 mm karena pada potongan yang lebih dalam dari 2 mm resiko jus dan pati dari bubur buah bercampur dengan lateks akan menurunkan kualitas. Buah harus disadap dengan interval tertentu sekitar 4-7 hari dan untuk penyiapan pertama biasanya cukup membuat satu potong. Lateks dikumpulkan dalam baja tahan karat nampan sementara lateks yang membeku di permukaan buah dibuang dan dikumpulkan di nampan. Penggunaan tutup yang pas dan menyimpan kotak di tempat teduh sangat penting karena mengurangi reaksi yang menyebabkan hilangnya aktivitas enzim. Lateks yang diekstraksi juga diperoleh dengan beberapa sayatan longitudinal menggunakan bilah baja tanpa karat pada bagian buah yang masih mentah menggunakan protokol Nitsawang (2006). Lateks ini dapat dibiarkan mengalir ke bawah buah dan menetes dalam wadah plastik. Sebelum disimpan pada suhu -20°C ditambahkan NaOH 0,3 M untuk menghindari oksidasi. Lateks bekas lainnya dapat diperoleh dari Kulit buah mentah, yang dikupas dan dihancurkan dalam *food processor* hingga diperoleh pasta yang lembab. NaOH 0,3 M harus ditambahkan ke pasta ini sebelum disimpan pada -20°C.

2. Pembersihan dan Pengayakan

Setelah pengumpulan getah dilewatkan melalui saringan mesh untuk menghilangkan kotoran kemudian getah pepaya dicampur Kalium meta-bisulfat (Kms). Disaring untuk menghilangkan bahan asing kemudian dicampur dengan

zeokarbikasi aktif tukar resin. Campuran tersebut kemudian disentrifus untuk memisahkan resin dari lateks cair dan disimpan dalam *cold storage* .

2.5.3 Purifikasi Enzim Papain

Enzim papain dari getah pepaya dimurnikan secara rutin dan metode ini melibatkan ekstraksi lateks, penghilangan bahan yang tidak larut dalam ekstrak pada pH 9.0, diikuti pengendapan amonium sulfat dengan tiga rekristalisasi. Protein yang dihasilkan mengandung tiga komponen, papain aktif, papain non-aktif, dan papain non-aktif yang dapat diaktifkan. Pada papain aktif, gugus tiol berkurang sepenuhnya. Jenis papain non-aktif yang dapat diaktifkan bisa diubah menjadi papain aktif melalui reaksi pada gugus tiol. Klein dan Kirsch menyajikan bukti meyakinkan yang menunjukkan bahwa dalam papain aktif, gugus tiol berada dalam hubungan disulfida dengan asam amino sistein. Papain mentah dimurnikan dengan larut dalam air dan mengendap dengan alkohol (Islam , 2013).

Islam (2013) menjelaskan cara untuk melakukan purifikasi enzim papain dengan berbagai metode seperti prosedur dua langkah untuk pemurnian papain dari ekstrak lateks pepaya, *Aqueous Two-Phase System* (ATPS), Sephadex G-75 metode lainnya.

1. Prosedur Dua Langkah untuk Pemurnian Papain dari Ekstrak Lateks Pepaya

Untuk pemurnian papain dari ekstrak getah pepaya prosedur ini melibatkan pengendapan ekstrak getah pepaya dengan natrium klorida diikuti dengan kromatografi afinitas endapan terlarut kembali. Satu prosedur menggunakan kromatografi afinitas pada kolom yang terdiri dari inhibitor Gly-Gly-Tyr (Bzl) -Arg yang secara kovalen terkait dengan Sepharose. Prosedur lain memanfaatkan adanya gugus tiol reaktif dalam papain aktif dan tidak adanya kelompok tiol di papain non-aktif-yang dapat diaktifkan. Dalam metode ini papain aktif dipisahkan dari papain tidak aktif pada kolom Sepharose yang mengandung gugus p-aminofenol- merkuri terkait secara kovalen. Kedua metode tersebut menghasilkan papain aktif mengandung satu gugus tiol per molekul protein.

2. Pemurnian Papain dengan *Aqueous Two-Phase System* (ATPS).

Papain dimurnikan dengan *Aqueous Two-Phase System*. Studi mereka menunjukkan bahwa papain yang dipisahkan itu tetap terkontaminasi chymopapain. Pada tahun 2006, Nitsawang melaporkan penggunaan sistem polietilen glikol (PEG) - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ untuk memurnikan papain dari getah pepaya segar yang dikumpulkan dari buah pepaya secara langsung. Mingliang di 2010 pertama mempersiapkan *Aqueous Two-Phase System* untuk pemurnian Papain. ATPS disiapkan dalam tabung ukur dengan 4 g larutan enzim ditambah berbagai jumlah PEG (4000 atau 6000), larutan garam (40% b/b fosfat atau 40% b/b $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) dan air deionisasi untuk mencapai berat total 10 g. Larutan fosfat disiapkan dengan menggunakan K_2HPO_4 dan NaH_2PO_4 , karena mereka menunjukkan kelarutan yang lebih besar dibanding garam monobasa dan dibasa masing-masing. Garam monobasik dan dibasa larutan dicampur untuk mencapai nilai pH tertentu. Untuk memastikan pemisahan fase yang lengkap, sistem disentrifugasi 10.0006 g selama 15 menit pada suhu masing-masing. Volume fasa diukur, dan kemudian diambil alikuot dari fasa tersebut untuk menentukan konsentrasi dan aktivitas protein. Kehadiran papain diverifikasi oleh Protein Dasar Native-PAGE dan FPLC. Kemudian dilakukan analisis kemurnian dan kemurnian papain dievaluasi dengan pertukaran ion kromatografi pada FPLC (*Fast protein liquid chromatography*). Semua sampel fase PEG teratas diencerkan menjadi 1 mg/mL untuk FPLC dan pemisahan kromatografi dilakukan dengan menggunakan gradien. Detektor UV-900 dipasang pada 280 nm untuk mengukur residu aromatik protein. Puncak elusi papain dikonfirmasi oleh papain standar (Mingliang, 2010). Partisi *Aqueous Two-Phase* membantu prosedur pemulihan enzim papain.

3. Metode Sephadex G-75

Menurut Rubens Monti dan Carmelita, getah pepaya langsung digunakan untuk pemurnian papain dalam keadaan asli atau disimpan pada -8°C terlindung di bawah atmosfer nitrogen setelah ekstraksi. Untuk persiapan ekstrak, Ethylene asam di-amina-tetra-asetat (EDTA), pH 7,0, ditambahkan ke lateks segar dengan konsentrasi akhir 1 mM dan persiapan disimpan di bawah nitrogen selama 1 jam pada suhu kamar dengan pengocokan konstan. Suspensi kemudian disentrifugasi

pada 12.000 x g selama 30 menit pada suhu kamar dalam sentrifus Sorvall RC-2B dengan rotor SS-34. Protein diukur dengan absorbansi pada 280 nm. Penentuan berat molekul papain diperoleh dengan metode menggunakan Sephadex G-75, papain murni menunjukkan massa molekul induk 21 kDa dan papain klasik 21,3kDa ketika G-75 Sephadex digunakan.

4. Pemurnian Papain dari Getah Segar Carica Pepaya

Awalnya pemurnian dan isolasi papain dilakukan dalam keadaan kristal asli dari lateks yang masih segar atau baru. Metode ini kemudian dimodifikasi menggunakan lateks kering yang tersedia secara komersial dan telah menjadi metode klasik untuk persiapan papain selama bertahun-tahun, dengan beberapa modifikasi. Menurut Brocklehurst ekstrak air dari Getah pepaya terdapat kandungan proteinase sistein yang dapat dipisahkan dengan kromatografi pertukaran ion, dan bentuk aktifnya juga dapat diperoleh dengan kromatografi kovalen menggunakan pertukaran tiol-disulfida.

5. Metode Pengeringan

Cara pengeringan merupakan faktor utama yang menentukan kualitas akhir papain. Selanjutnya adalah lateks menyebar dalam nampan dan pengeringan membutuhkan waktu sekitar 4 jam pada suhu 55 °. Kemudian lateks digores dari baki. Kemudian dicampur dengan Kms dan digiling di SS hammer mills atau *roller and mills* untuk mendapatkan bubuk halus. Pengeringan dilanjutkan sampai produk lepas dalam bentuk serpihan yang memiliki struktur berpori.

Pengeringan dengan sinar matahari memberikan kualitas produk yang paling rendah karena ada banyak kehilangan aktivitas enzim dan papain mudah berubah menjadi coklat. Namun, di banyak negara pengeringan dengan sinar matahari masih menjadi teknik pengolahan papain yang paling umum. Lateks cukup disebarkan di atas nampan dan dibiarkan di bawah sinar matahari hingga kering. Aktivitas dan kualitas papain mentah yang dijemur ditingkatkan dengan menggunakan pengawet. Pengawet meningkatkan penampilan, warna, bau, dan aktivitas enzim sehubungan dengan sampel kontrol. Perlakuan dengan natrium meta-bisulfit 0,1% (W/V) memberikan hasil terbaik, asam benzoat meningkat 0,1%. Penampilan dan warna papain mentah kering matahari lebih baik dari

Sodium Benzoate tetapi Sodium Benzoate memberi lebih baik peningkatan aktivitas.

Pengeringan oven bisa dibuat dengan konstruksi sederhana. Di Sri Lanka mereka umumnya menggunakan kompor sederhana (tingginya sekitar satu meter) terbuat dari lumpur atau batu bata tanah liat. Waktu pengeringan bervariasi tetapi panduan perkiraan adalah 4-5 jam pada suhu sekitar 35-40°C. Pengeringan selesai jika lateks sudah rapuh dan tidak lengket. Kualitas produk yang lebih baik adalah diperoleh jika lateks diayak sebelum dikeringkan. Produk kering harus disimpan dalam wadah kedap udara dan kedap cahaya dan disimpan di tempat yang sejuk. Wadah logam harus dilapisi dengan plastik.

Pengeringan semprot tidak mungkin dilakukan dalam skala kecil. Papain semprot kering memiliki aktivitas enzim yang lebih tinggi dibandingkan papain lainnya dan benar-benar larut dalam air. Perawatan yang sangat hati-hati saat menangani bentuk papain ini karena dapat menyebabkan alergi dan emfisema jika terhirup. Untuk alasan ini papain kering semprot sering dikemas dalam lapisan gelatin. Kemudian proteolitiknya aktivitas diuji di laboratorium.

Oven konvensional (Mommert), oven vakum (Cole-Parmer 5053-20) dan lyophilizator (*Freezone 6 plus Labconco*) digunakan untuk mengeringkan lateks yang diperoleh dan untuk menetapkan efek suhu pada aktivitas enzim kasar

2.6 Enzim Zingibain

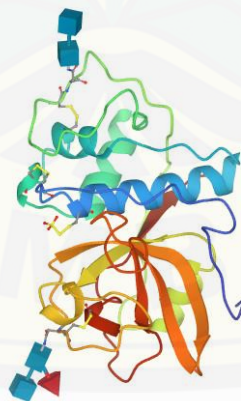
Jahe, yang dikenal secara botani sebagai *Zingiber officinale*, berasal dari Asia Selatan tetapi telah menyebar ke banyak wilayah lain di dunia. Dahulu kala, jahe digunakan sebagai obat di India, Cina dan Eropa. Saat ini, jahe adalah salah satu yang terpenting dan rempah-rempah yang banyak digunakan di dunia. Jahe juga digunakan di bidang farmasi karena keberadaan zat fenolik gingerol dan shogaol di rimpang yang dilaporkan memiliki anti kanker dan aktivitas antioksidan (Ghasemzadeh dkk., 2010).

Protease jahe atau zingibain, yang pertama kali dilaporkan sebagai sumber protease baru pada tahun 1973, menunjukkan aktivitas proteolitik yang luar biasa. Zingibain adalah pelunak daging yang sangat aktif melawan kolagen

dan protein jaringan ikat lainnya. Aktivitas pembekuan susu yang baik juga dikaitkan dengan zingibain sehingga digunakan dalam persiapan dadih susu jahe di Cina selatan (Nafi dkk., 2014). Zingibain dapat diakses dengan kode 1CQD pada PDB.

2.6.1 Struktur Kimia Enzim Zingibain

Sebuah protease sistein dari rimpang jahe (GP-II) membelah peptida dan protein dengan prolin pada posisi P (2). Kekhususan yang tidak biasa untuk prolin membuat GP-II menjadi alat yang menarik untuk pengurutan protein dan identifikasi domain terlipat stabil dalam protein. Enzimnya adalah glikoprotein asam amino 221 yang memiliki dua rantai oligosakarida terkait-N (8% terglisosilasi menurut berat) di Asn99 dan Asn156. Ketersediaan urutan rantai glikosil ini memberikan kesempatan untuk mengamati struktur dan pengaruhnya terhadap konformasi protein. Struktur tiga dimensi GP-II telah ditentukan dengan kristalografi sinar-X hingga resolusi 2,1 Å (faktor-R keseluruhan = 0,214, R bebas = 0,248). Struktur keseluruhan GP-II mirip dengan homolog protease papain, aktinidin, dan glikil endopeptidase homolog, melipat menjadi dua domain berbeda dengan ukuran kira-kira sama yang terbagi oleh suatu celah (Choi dkk., 1999).



Gambar 2.3 Struktur zingibain pada resolusi 2,1 angstroms (Sumber: Choi dkk., 1999)

2.6.2 Ekstraksi Enzim Zingibain

Qiao (2009) menjelaskan cara mengekstraksi zingibain dari rimpang jahe. Rimpang jahe dibersihkan dan diekstrak sarinya, kemudian sarinya disimpan dalam suhu rendah dan disentrifugasi pada 4800 putaran/menit selama 20 menit untuk menghilangkan pati. Kemudian disaring untuk menghilangkan beberapa kontaminan besar. Filtrat dicampur dengan aseton yang telah didinginkan sebelumnya di lemari es (1:1), kemudian endapan dikumpulkan setelah disentrifugasi pada 30000 putaran/menit selama 10 menit. Sedimen dilarutkan dalam *buffer* asam fosfat dan disentrifugasi kembali. Kali ini, supernatan dikumpulkan dan dicampur dengan amonium sulfat saturasi 30%. Larutan diletakkan pada suhu rendah selama 24 jam, kemudian disentrifugasi dan disaring. Supernatan dikumpulkan kembali dan dicampur dengan amonium sulfat sampai saturasi 60%, dan ditempatkan lagi pada suhu rendah selama 24 jam, dan disentrifugasi untuk mendapatkan sedimen. Kemudian dilarutkan dengan *buffer* asam fosfat (pH = 6), dan didialisis dalam kantong dialisis. Akhirnya, bubuk protease jahe mentah diperoleh setelah pengeringan beku.

2.6.3 Purifikasi Enzim Zingibain

1. DEAE-52 Sepharose assay

Berdasarkan hasil uji primer, protease jahe mentah dilarutkan dalam *buffer* Tris-HCl (pH 7,5) dengan konsentrasi 30 mg/mL, kemudian diserap pada kolom DEAE-52 yang dicuci terlebih dahulu dengan Tris-HCl *buffer* (pH 7,5) dengan natrium klorida (0,1mol/L) untuk menyingkirkan protein yang tidak digabungkan. Kemudian, *buffer* elusi konsentrasi gradien dimulai dengan kecepatan awal 1mL/menit dengan 0,2-0,5mol/L natrium klorida dan *buffer* Tris-HCl (pH 7,5). Kemudian optimasi konsentrasi dan volume pencucian ditentukan dengan mengukur nilai OD protein pada pencucian, dan optimasi kecepatan pencucian juga dapat ditentukan dengan membandingkan kurva protein pada pencucian dengan kondisi optimasi yang disebutkan di atas. Efisiensi pemurnian DEAE-52 diukur dengan menguji aktivitas enzim dalam pencucian. Kromatografi pertukaran ion selulosa memurnikan protease jahe melalui perbedaan ion antar

senyawa, dan melalui sifat hidrofilik selulosa, ia memiliki sedikit kecenderungan untuk mengubah sifat protein yang sangat penting bagi enzim.

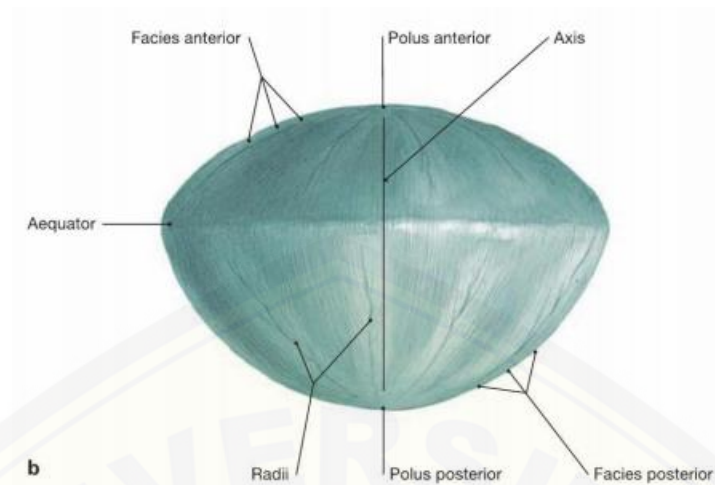
2. Pengujian SP-Sephadex 50

Enzim yang dimurnikan melalui DEAE-52 dimasukkan ke dalam kantong untuk didialisis untuk membuang ion dan memadatkannya. Kemudian diencerkan menjadi 20 mg/mL dengan *buffer* fosfat (pH 6.0, dengan 0,1 mol/L natrium klorida), kemudian dimurnikan dengan SP-Sephadex. Kolom kromatografi gel Sephadex memurnikan protease jahe dari perbedaan berat molekul komponen, yang dapat menghilangkan kontaminan dengan berat molekul berbeda.

2.7 Anatomi dan Fisiologi Mata

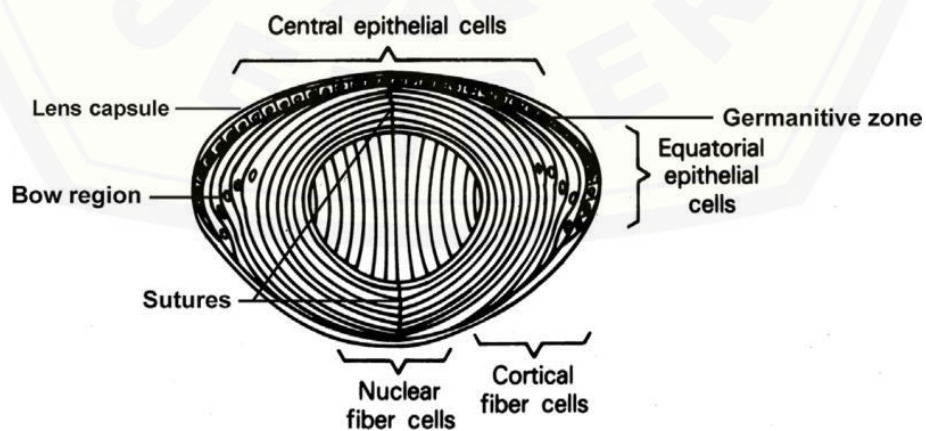
Lensa mata adalah struktur transparan, berbentuk bikonveks, dan avaskuler yang berfungsi sebagai akomodasi mata. Lensa mata terletak di belakang iris dan di depan corpus vitreum, ditopang oleh zonula zinn yang menggantungkan lensa mata di seluruh ekuatornya pada badan siliar. Lensa mata terdiri dari kapsul elastis, epitel, korteks, dan nukleus (Astari, 2018).

Sifat lensa mata yang elastis memegang peranan penting dalam akomodasi, sedangkan sifat jernih dan transparan lensa mata diperlukan sebagai media pengelihatan. Seiring bertambahnya usia, lensa mata akan bertambah berat, tebal, dan menurun daya akomodasinya. Hal ini mengakibatkan terjadinya kompresi dan pengerasan nukleus lensa mata (*nucleus sclerosis*) karena terbentuknya serat kortikal yang memusat. Perubahan kimia dan pemecahan protein lensa mata (crystalline), menyebabkan terbentuknya protein dengan berat molekul yang besar. Agregasi protein tersebut menyebabkan fluktuasi indeks bias lokal lensa mata sehingga menyebabkan lensa mata menjadi keruh. Keadaan lensa mata yang keruh ini disebut katarak (Budiono, 2013).



Gambar 2.4 Anatomi lensa mata bagian anterior dan posterior (Paulsen. F, 2010).

Lensa mata okuler bertanggung jawab untuk memfokuskan cahaya ke retina, dan transparansi sangat penting untuk ketajaman visual. Lensa mata anterior dilapisi dengan satu lapisan sel epitel, menutupi korteks lensa mata dan nukleus, yang keduanya terdiri dari sel serat memanjang. Sel epitel mempertahankan aktivitas metabolisme dan menjalani mitosis untuk menghasilkan sel anak yang bermigrasi ke ekuator lensa mata di mana mereka mulai berdiferensiasi menjadi sel serat (Augusteyn, 2010). Sel-sel yang berdiferensiasi memanjang untuk menghasilkan struktur yang panjang, tipis, seperti pita yang membentuk lapisan lensa mata seperti bawang. Selama waktu ini terjadi perubahan intraseluler yang besar, termasuk ekspresi protein kristal larut yang sangat tinggi diikuti oleh degradasi organel (Augusteyn, 2010).



Gambar 2.5 Anatomi lensa mata berdasarkan lapisan (Sumber: Hejtmancik dkk., 2015)

Bagian tengah lensa mata, yang dikenal sebagai nukleus, mengandung sel-sel serat yang terdiferensiasi secara terminal. Lapisan luar sel serat, yang dikenal sebagai korteks lensa mata, mengelilingi nukleus dan mempertahankan beberapa tingkat perputaran protein dan aktivitas metabolisme. Perkembangan dan struktur lensa mata sedemikian rupa sehingga mengandung beberapa sel dan protein tertua di seluruh tubuh yang harus mempertahankan struktur molekul dan organisasinya selama seumur hidup. Untuk melakukan fungsi penglihatan, lensa mata harus tetap transparan terhadap cahaya dan banyak mekanisme telah dikembangkan untuk mengurangi atau menghilangkan struktur abnormal yang dapat menghamburkan cahaya dari jaringan. Lensa mata tidak memiliki sirkulasi arteri atau vena. Sel serat diatur untuk memadatkan membran dan mengurangi ruang antar sel. Degradasi organel terkoordinasi dimulai selama pematangan sel serat untuk menghilangkan inti, mitokondria, RE, ribosom, dan organel lain, yang mengurangi hamburan cahaya. Ekspresi protein *crystalline* sangat diatur selama diferensiasi, menghasilkan *crystalline* yang mengisi 90% protein dalam lensa mata yang matang. Pengemasan berurutan jarak pendek dari kristal pada konsentrasi 250-400 mg/mL memberikan kontribusi pada transparansi larutan pekat dan campuran polidispersi kristal menghindari kristalisasi (Moreau dan King, 2012).

2.8 Protein *Crystalline*

Crystalline adalah istilah fungsional yang berasal dari deskripsi protein terlarut yang sangat melimpah dari lensa mata vertebrata 'kristal' (jernih). *Crystalline* mengisi sel serat lensa mata yang sangat memanjang dan berdiferensiasi di ujung serta harus bertahan tanpa pergantian sepanjang hidup dengan tetap menjaga transparansi dan organisasi molekuler yang diperlukan untuk sifat bias lensa mata. Dengan demikian, pelengkap kristal di lensa mata sangat sensitif terhadap tekanan evolusi dan telah menunjukkan adaptasi yang luar biasa dalam garis keturunan vertebrata yang berbeda (Wistow, 2012). Ada tiga kelas yang teridentifikasi, *crystalline* α -, β - dan γ , yang bertanggung jawab atas sebagian besar kandungan protein lensa mata manusia. Ketiga kelas ini ditentukan

terutama oleh ukuran oligomer yang mereka bentuk, dari multimer α - *crystalline* yang sangat besar (pada urutan 500 kDa), *crystalline* β berukuran dimer hingga oktamer (sekitar 45 hingga 180 kDa) hingga γ - monomer *crystalline* (20 kDa)(3). Setelah data sekuens diperoleh, menjadi jelas bahwa β -*crystalline* multimerik dan γ -*crystalline* monomerik sebenarnya adalah bagian dari superfamili $\beta\gamma$ -*crystalline* yang sama (Wistow, 2012).

1. α -Crystalline

α -*crystalline* termasuk dalam superfamili *small heat-shock protein* (sHSP). Fungsi utama α -*crystalline* adalah berkontribusi pada transparansi dan daya bias lensa mata. fungsi dari sHSP memiliki implikasi yang jelas untuk peran dalam mencegah agregasi protein yang salah lipatan dengan manfaat yang jelas bagi transparansi lensa mata (Clark dkk., 2012). Mereka mungkin juga memiliki interaksi penting dengan komponen seluler lainnya, termasuk sitoskeleton, yang sangat penting dalam sel serat lensa mata yang sangat memanjang. Protein ini memiliki dua subunit yaitu αA - and αB -*Crystalline* (Wistow, 2012).

2. β -Crystalline

Monomer β -*Crystalline* awalnya berasosiasi menjadi homo- dan heterodimer sekitar 50 kDa, yang selanjutnya saling berkaitan menjadi kompleks 150–200 kDa, terutama *crystalline* yang terletak pada lensa mata. Struktur *crystalline* dari dimer $\beta B2$ -*crystalline* menunjukkan *linker* yang menghubungkan domain. Domain amino dan karboksil yang terpisah jauh dari satu domain. Pasangan polipeptida β - *crystalline* mengalami “pertukaran domain”. (Hejtmancik dkk., 2015)

3. γ -Crystallin

γ -*crystalline* yang sangat simetris dan sangat stabil memiliki massa molekul sekitar 21 kDa. Protein ini diekspresikan secara spesifik dalam serat lensa mata dan dengan demikian merupakan *crystalline* utama di dalam inti lensa mata, yang berkontribusi terhadap konsentrasi protein tertinggi dan bagian paling keras dari lensa mata. γ -*crystalline* diadaptasi untuk pengemasan molekul dengan densitas tinggi.

γ -*crystalline* berlimpah di hampir semua mamalia termasuk manusia tetapi tidak pada burung dan reptil, yang menggunakan protein lain sebagai lensa mata inti utama mereka. (Hejtmancik dkk., 2015)

Tabel 2.1 Protein *crystalline* utama yang terletak pada lensa mata manusia

Protein	Ukuran (Da)	Gen	Lokasi Kromosom
αA	19909	CRYAA	21q22.3
αB	20159	CRYAB	11q23.1
$\beta A1$	23191	CRYBA1	17q11.2
$\beta A2c$	21964	CRYBA2	2q35
$\beta A3$	25150	<u>CRYBA1d</u>	17q11.2
$\beta A4$	22243	CRYBA4	22q12.1
$\beta B1$	27892	CRYBB1	22q12.1
$\beta B2$	23249	CRYBB2	22q11.23
$\beta B3$	24230	CRYBB3	22q11.23
γC	20747	CRYGC	2q33.3
γD	20607	CRYGD	2q33.3
γS	20875	CRYGS	3q27.3

(Sumber : Moreau dan King, 2012)

2.9 Gangguan Mata Akibat Perubahan Protein *Crystalline*

Perubahan pada protein *crystalline* lensa mata dapat menyebabkan berbagai gangguan seperti katarak kongenital dan katarak senilis.

2.9.1 Katarak Kongenital

Katarak kongenital adalah kekeruhan lensa mata yang ditemukan sejak lahir baik bersifat unilateral ataupun bilateral (AAO, 2019). Katarak kongenital

adalah penyebab utama kebutaan yang dapat disembuhkan saat masa kecil. Angka kejadian bergantung pada perkembangan sosial ekonomi suatu daerah, pada negara industri terdapat 1 hingga 6 kasus per 10.000 kelahiran hidup, dan 5 hingga 15 kasus per 10.000 di wilayah termiskin dunia. Katarak kongenital terlihat saat lahir atau selama dekade pertama kehidupan. Terdapat sekitar 20.000 hingga 40.000 kasus baru katarak kongenital bilateral didiagnosis setiap tahun. Di Brasil, katarak kongenital menyumbang 12,8% dari kasus kebutaan di masa kanak-kanak (Santana dan Wasimo, 2011).

Santana dan Wasimo (2011) menjelaskan bahwa katarak kongenital dapat disebabkan oleh berbagai penyebab, antara lain gangguan metabolisme (galaktosemia), infeksi selama embriogenesis (5), cacat gen, dan kelainan kromosom (9). Katarak mungkin merupakan anomali terisolasi, terlihat pada hubungan dengan kelainan perkembangan mata lainnya, atau bagian dari sindrom multisistem, seperti sindrom Down, Wilson penyakit, dan distrofi miotonik (10).

Penelitian pada tingkat genetik menunjukkan setidaknya 15 mutasi berbeda pada gen *crystalline* terlibat dalam pembentukan katarak dan memiliki beragam fenotipe (Moore, 2004). Belum diketahui proporsi mutasi genetik yang diturunkan dibanding keseluruhan mutasi gen *crystalline*. Hal ini disebabkan sedikit penelitian penapisan sistematis dari semua gen *crystalline* pada populasi pasien yang besar. Sebuah penelitian melaporkan telah menggunakan analisis keterkaitan dan penapisan gen kandidat untuk menyelidiki patologi molekuler dari katarak yang diturunkan pada 38 keluarga di Australia selatan. Hasil penelitian menunjukkan hanya dua mutasi, yaitu mutasi *missense* (P23T) di CRYGD dan mutasi situs CRYBA1 / A3 yang teridentifikasi dalam 38 silsilah keluarga (Burdon dkk., 2003). Mutan P23T protein *crystalline* gamma lensa berkaitan dengan katarak kongenital. Analisis biofisik protein mutan ini telah mengungkapkan kelarutan yang berkurang secara dramatis dibandingkan dengan protein normal karena berat molekul yang semakin meningkat dan cenderung beragregasi (Pande dkk., 2003).

Katarak kongenital dapat diklasifikasikan menurut morfologinya yaitu katarak polar anterior, katarak subkapsular posterior, katarak posterior lentikonus

katarak sektoral, katarak lamelar, katarak nuklear, katarak vakuola perifer, dan Persistent fetal vasculature (PFV). Katarak nuklear dan polar anterior relatif stabil tetapi dapat berkembang menjadi progresif (Rajavi dan Sabbaghi, 2016).

Saat ini, delapan mutasi pada gen CRYAA telah ditemukan. Mutasi pertama (R116C) telah dikaitkan dengan katarak kongenital, mikrokornea, dan mikrofalmia. Pada mutasi ini arginin digantikan oleh sistein di posisi 116. Pergantian ini menghasilkan oligomerisasi abnormal dari α - dan β -crystalline mengakibatkan kekeruhan lensa mata (29-30). Mutasi kedua menunjukkan terjadi substitusi treonin dengan kodon *stop prematur* (W9X) (Santana dan Wasimo, 2011).

Red reflex examination bertujuan untuk penapisan katarak kongenital pada bayi baru lahir. Katarak dengan diameter minimal 3 mm dapat mengakibatkan masalah penglihatan yang signifikan. Diagnosis katarak kongenital dapat dilakukan dengan pemeriksaan oftalmologi meliputi pemeriksaan segmen anterior dan posterior, pemeriksaan fungsi penglihatan, dan pemeriksaan penunjang (Pandey dkk., 2016)

Pemeriksaan fungsi penglihatan digunakan untuk mengetahui tajam penglihatan anak sehingga dapat menilai kemungkinan terjadinya katarak. Anak usia lebih dari 2 bulan memiliki penilaian klinis mengenai standar perilaku fiksasi serta kemampuan fiksasi juga dapat memberikan tanda gangguan visual yang signifikan karena katarak. Pada anak usai 2-3 bulan, katarak kongenital yang signifikan secara visual dapat menyebabkan masalah perkembangan penglihatan. Pada usia kurang dari 2-3 bulan timbulnya kekeruhan mata dapat menimbulkan kemungkinan terkena ambliopia. Katarak kongenital unilateral berhubungan dengan terjadinya strabismus dan katarak kongenital bilateral berhubungan dengan terjadinya nistagmus. Pemeriksaan lanjutan pada segmen posterior diterapkan untuk mengetahui kemungkinan kelainan retina, diskus optikus dan makula. Apabila lensa mata terlalu keruh untuk dapat menilai kondisi segmen posterior dan panjang bola mata maka dapat dilakukan pemeriksaan ultrasonografi (Pandey dkk., 2016).

Penanganan katarak kongenital dapat diklasifikasikan menjadi terapi non bedah dan terapi bedah. Pilihan Terapi non bedah untuk katarak kongenital dapat berupa observasi dan dilatasi pupil. Pengamatan atau observasi dapat diterapkan pada penderita katarak kongenital yang ukuran diameternya kurang dari 3 mm atau berlokasi perisentral, sedangkan penanganan dengan dilatasi pupil menggunakan sikloplegik dapat diterapkan pada penderita katarak kongenital bilateral parsial atau pada batas ambliopia hingga dapat menjalani operasi katarak dengan pemberian intraocular lens (IOL) yaitu saat pertumbuhan bola mata telah stabil atau telah mencapai usia 2- 3 tahun (Lim dkk., 2017). Terapi bedah dapat diterapkan pada kasus katarak yang secara signifikan memengaruhi kondisi visual yaitu saat katarak memiliki diameter lebih dari 3 mm. Terapi bedah dilakukan baik tanpa pemasangan IOL maupun dengan disertai pemasangan IOL. pengangkatan katarak pada anak dengan usia yang lebih muda ditujukan untuk mencegah kemungkinan ambliopia deprivatif. Pertimbangan lain juga di dasarkan pada faktor perkembangan visual. Perkembangan akan optimal jika pengangkatan dilakukan sebelum usia anak mencapai 6 minggu (kasus katarak unilateral) dan sebelum anak mencapai usia 10 minggu (kasus katarak bilateral). Pemasangan IOL dapat diperhitungkan pada anak dengan usia minimal 1-2 tahun. Pemasangan IOL pada usia kurang dari 1-2 tahun belum dapat direkomendasikan dengan mempertimbangkan tingkat komplikasi tinggi, proliferasi materi lensa mata, reaksi inflamasi dan perubahan refraksi yang cepat terkait penambahan panjang bola mata (Ambroz dkk., 2018).

2.9.2 Katarak Senilis

Katarak senilis adalah kekeruhan lensa mata yang disebabkan proses degenerasi dan ditemukan setelah usia 50 tahun (Ilyas dan Yulianti, 2014). Katarak senilis adalah katarak yang paling sering ditemukan. Diperkirakan, dari seluruh kasus katarak, 90% nya adalah katarak senilis. Usia 50 tahun dan lebih merupakan adalah kelompok usia yang sering ditemukan gangguan penglihatan dan kebutaan. Data menunjukkan sekitra 65% dari penderita gangguan penglihatan dan 82% kasus kebutaan terjadi pada orang dengan usia 50 tahun dan

lebih, walaupun jumlah kelompok usia ini tidak lebih dari 20% populasi dunia (Kemenkes, 2014).

Penyebab dari katarak senil sampai sekarang masih belum diketahui secara pasti. Namun, kemungkinan berhubungan dengan konsep penuaan (Ilyas dan Yulianti, 2017). Hal tersebut diantaranya :

1. A Cross Link

Hal ini terjadi di akibat pengikatan bersilang asam nukleat dan molekul protein sehingga dapat mengganggu berbagai fungsi.

2. Radikal Bebas

Radikal bebas terbentuk Apabila terjadi reaksi intermediet reaktif kuat radikal bebas ini dapat mengakibatkan degenerasi.

3. Imunologi

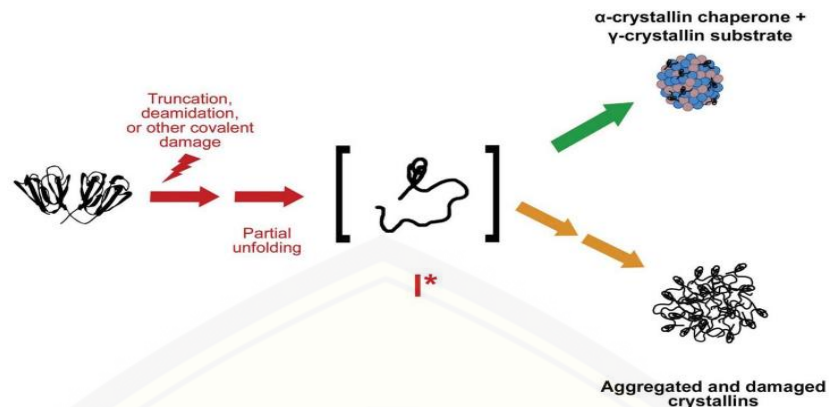
Akibat bertambahnya usia maka cacat imunologik juga bertambah yang akhirnya mengakibatkan kerusakan pada sel

Transparansi lensa mata tergantung pada pemeliharaan struktur tersier asli dan kelarutan protein kristal lensa mata. Katarak, penyebab utama kebutaan di seluruh dunia, disebabkan oleh agregasi protein dalam lingkungan lensa mata yang dilindungi. Seiring bertambahnya usia, kerusakan protein kovalen terakumulasi melalui jalur yang diduga mencakup radiasi UV, oksidasi, dan deamidasi. Eksperimen menunjukkan bahwa destabilisasi protein yang dihasilkan mengarah pada zat antara yang sebagian tidak terlipat, rawan agregasi dan pembentukan agregat protein yang dapat menghamburkan cahaya dan tidak larut dalam air. Agregat ini dapat terakumulasi dalam jumlah yang massif di lensa mata (Moreau dan King, 2012).

Protein α - dan β -crystalline adalah protein terlarut utama dari lensa mata. α -crystalline adalah kompleks protein polidispersi yang terdiri dari subunit αA dan αB , adalah anggota dari keluarga protein *small heat shock protein* (sHSP). Protein ini secara efisien mengikat protein yang rusak atau tidak terlipat sebagian, mengasingkannya untuk mencegah agregasi protein yang meluas (Laganowsky dkk., 2010). Analisis proteomik protein lensa mata telah mengidentifikasi beberapa modifikasi kovalen yang berhubungan dengan proses kerusakan,

termasuk deamidasi, oksidasi, dan glikasi (Hains dan Truscott, 2008). Deamidasi adalah salah satu kerusakan yang paling umum pada protein *crystalline*, hal ini menyebabkan muatan negatif pada protein dengan mengubah residu glutamin menjadi glutamat. Asparagine juga rentan terhadap deamidasi, dan kedua residu dimodifikasi dalam agregat katarak (Hains dan Truscott, 2010).

Proses agregasi protein pembentuk katarak terkait dengan jalur pembentukan struktur amiloid. Protein *crystalline* γ D- dan γ C pada lensa mata manusia akan membentuk struktur amiloid setelah inkubasi pada pH 3 (Wang dkk., 2010). Situs C-td terbukti penting untuk proses nukleasi dan pemanjangan struktur fibril amiloid. Proses agregasi protein pembentuk katarak terkait dengan jalur pembentukan struktur amiloid. Seiring bertambahnya usia terjadi peningkatan aktivitas β -secretase (Fukumoto dkk., 2004). β - dan γ -secretase adalah enzim yang mengkatalis *Amyloid- β Precursor Protein* (APP) menjadi struktur β -amyloid ($A\beta$) (Strooper dan Annaert, 2000). β -amyloid ($A\beta$) memiliki kaitan kuat dengan stres oksidatif (Takagane dkk., 2015). Radikal bebas, termasuk beberapa *Reactive Oxygen Species* (ROS) seperti SO_2 , H_2O_2 , dan SOH dapat menyebabkan kerusakan struktural lensa *crystalline* dan berkontribusi pada pembentukan katarak (Ho dkk., 2010). Berkurangnya α -Crystalline seiring bertambahnya usia menyebabkan $\beta\gamma$ -Crystalline yang rusak (mengalami *misfolding* atau *unfolding*) terus bertambah dan menjadi agregat yang menyebabkan kekeruhan mata (Moreau dan King, 2012). α -Crystallin, protein yang merupakan sistem penunjang utama dari sel serat lensa mata dewasa, mengenali fitur konformasi protein dan memisahkan *conformer* protein yang mengalami *misfolded/unfolded* satu sama lain. Jika populasi α -crystalline terbatas, maka lensa mata akan dipenuhi $\beta\gamma$ -Crystalline yang rusak dan tidak terlipat dengan benar, protein ini juga berkontribusi pada agregat yang tumbuh dan akhirnya menyebabkan kekeruhan mata.



Gambar 2.6 Proses terbentuknya agregasi protein penyusun katarak pada lensa mata

(Sumber: Moreau dan King, 2012)

Nizami dan Gulani (2020) menjelaskan bahwa katarak dapat dievaluasi dengan berbagai cara. Mengetahui keluhan utama pasien, yaitu penurunan penglihatan, riwayat pemeriksaan mata sebelumnya menjadi faktor penting dalam melakukan evaluasi. Pemeriksaan oftalmologi juga merupakan pilihan evaluasi kondisi katarak. Pemeriksaan oftalmologi dapat berupa pemeriksaan ketajaman visual menggunakan grafik Snellen, pemeriksaan refraktori, tes penutup, dan pemeriksaan *slit-lamp*.

Tata laksana definitif untuk katarak yaitu tindakan bedah. Masih belum ada tata laksana medikamentosa untuk katarak. Ada beberapa penelitian dengan penggunaan vitamin C dan E dapat memperlambat pertumbuhan katarak. Namun, hal tersebut belum efektif. Berikut adalah jenis pembedahan yang dapat dilakukan (Budiono, 2013) :

1. Ekstraksi Katarak Intrakapsuler (EKIK)

Teknik ini dilakukan dengan mengangkat seluruh lensa mata termasuk kapsul lensa mata. EKIK dipilih dalam penanganan kasus sublukasi lensa mata, eksfoliasi lensa mata, dan lensa mata yang sangat padat. EKIK tidak boleh dilakukan pada anak-anak dan dewasa muda. Teknik ini sudah ditinggalkan karena memiliki beberapa kekurangan seperti penyembuhan luka yang lama dan merupakan penyulit penyakit lain seperti ablasio retina dan astigmatisma.

2. Ekstraksi Katarak Ekstrakapsular

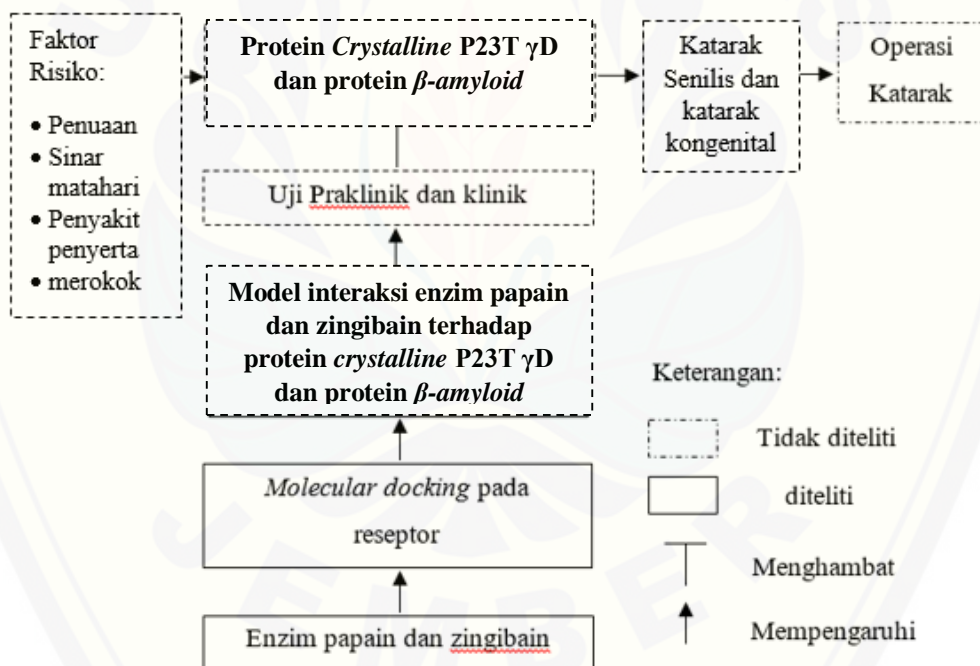
Pada operasi ini nukleus dan korteks lensa mata dibuang dengan cara merobek kapsul lensa mata anterior. Pembedahan ini meninggalkan kantong

kapsul untuk menanamkan lensa mata intraokuler. EKEK lebih aman dibanding EKIK karena irisan luka yang lebih kecil sehingga kemungkinan astigmatisma lebih kecil dan luka dapat sembuh lebih cepat.

3. Fakoemulsifikasi

Teknik ini menggunakan alat ultrasonik untuk menghancurkan nukleus dan korteks lensa mata lalu mengaspirasi pecahannya melalui sayatan yang sangat kecil. Fakoemulsifikasi memiliki kelebihan diantaranya luka dapat sembuh lebih cepat dan tidak menginduksi astigmatisma setelah pembedahan. Teknik ini merupakan pilihan utama pada negara maju.

2.10 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 2.7 Kerangka konsep penelitian

Katarak kongenital adalah kekeruhan lensa mata yang ditemukan sejak lahir disebabkan oleh mutasi pada gen pembentuk *crystalline*. Protein P23T *crystalline* gamma lensa adalah mutan yang memiliki peningkatan berat molekul dan cenderung beragregasi sehingga berkaitan dengan terbentuknya katarak

kongenital. β -amyloid ($A\beta$) adalah protein yang memiliki kaitan kuat dengan stres oksidatif (Takagane dkk., 2015). Radikal bebas, termasuk beberapa *Reactive Oxygen Species* (ROS) seperti SO_2 , H_2O_2 , dan SOH dapat menyebabkan kerusakan struktural lensa *crystalline* dan berkontribusi pada pembentukan katarak senilis. Saat ini terapi yang dapat dilakukan terhadap penderita katarak adalah tindakan operasi. Enzim papain dan zingibain merupakan protease yang berasal dari tanaman dan sering dimanfaatkan untuk pelunak daging. Kedua enzim tersebut di uji coba melalui *molecular docking* untuk mengetahui prediksi interaksi dengan protein *crystalline* P23T γ D dan protein β -amyloid yang dinilai dari model interaksi berdasarkan afinitas ikatan. Hasil yang didapat bisa dilanjutkan dalam penelitian praklinik baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Hasil dari penelitian praklinik dapat dilanjutkan pada tingkatan penelitian klinik. Melalui alur tersebut dapat dinilai kemampuan enzim papain dan zingibain untuk menjadi protease terhadap protein *crystalline* P23T γ D dan *protein* β -amyloid penyebab katarak kongenital dan katarak senilis.

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu

Penelitian dilakukan selama bulan Januari 2021.

3.2 Bahan

Situs <https://www.rcsb.org/> untuk mendapatkan struktur enzim papain, enzim zingibain, protein *Crystalline* P23T γ D, dan protein β -*amyloid*. Perangkat lunak *molecular docking* ClusPro untuk memprediksi ikatan antara protein target dan ligan (dapat diakses melalui <https://cluspro.bu.edu/>).

3.3 Instrumentasi

Laptop HP 14-BS741TU Intel® Core™ i3-6006U CPU @2.00 GHz (4CPUSs), RAM 4096 MB, 64-bit *operating system*, dan sistem operasi Windows 10 *Home Single Language*.

3.4 Definisi Operasional Variabel dan Skala Pengukurannya

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini yaitu :

1. Struktur enzim papain yang diperoleh dari <https://www.rcsb.org/> dengan kode 9PAP
2. Struktur enzim zingibain yang diperoleh dari <https://www.rcsb.org/> dengan kode 1CQD.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu :

1. *Binding energy*

Binding energy adalah energi yang dibutuhkan untuk membentuk suatu ikatan (Mohammedali, 2015). Semakin kecil atau negatif *binding energy* maka afinitas ligan dan protein semakin baik atau ikatan yang dibentuk semakin stabil/kuat (Asthana, 2014; Mehraban, 2015). Nilai *binding energy* antara enzim

papain dan zingibain terhadap protein P23T *crystalline* γ D dan protein β -amyloid di dapat dari *website* Cluspro dan model interaksi yang memiliki *binding energy* paling rendah adalah yang akan digunakan.

2. Model Interaksi Pengikatan

Model Interaksi Pengikatan adalah gambar struktur tiga dimensi interaksi antara enzim papain dan zingibain terhadap protein P23T *crystalline* γ D dan protein β -amyloid yang di dapat dari *website* <https://cluspro.bu.edu/>

3.4.3 Variabel kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah struktur protein yang dapat diunduh di <https://www.rcsb.org/> dan terdiri dari :

1. P23T *crystalline* γ D terkait katarak kongenital dengan kode 2KFB
2. β -amyloid terkait katarak senilis dengan kode 2BP4

3.5 Metode

Adapun metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu :

1. Senyawa aktif enzim papain, zingibain, protein P23T *crystalline* γ D, dan protein β -amyloid diperoleh melalui kajian pustaka (jurnal ilmiah dan artikel).
2. Pencarian data protein menggunakan NCBI (*National Centre of Biotechnology Information*) (www.ncbi.nlm.nih.gov/) dengan kata kunci yang sesuai.
3. Pendataan identitas atau kode protein enzim papain dan zingibain dan protein *crystalline* melalui PDB (*Protein Data Bank*) dengan mencari pada kolom pencarian situs <http://www.rcsb.org/>.
4. Membuka situs Cluspro dengan alamat <http://cluspro.bu.edu/home.php>.
5. Memasukkan kode PDB enzim papain dan zingibain pada kolom *receptor*.
6. Memasukkan kode PDB protein P23T *crystalline* γ D dan protein β -amyloid pada kolom *ligand*.
7. Mengisi persetujuan bahwa tidak akan menggunakan Cluspro untuk tujuan komersial.
8. Mengklik tombol *dock* pada Cluspro untuk memulai proses *docking*.

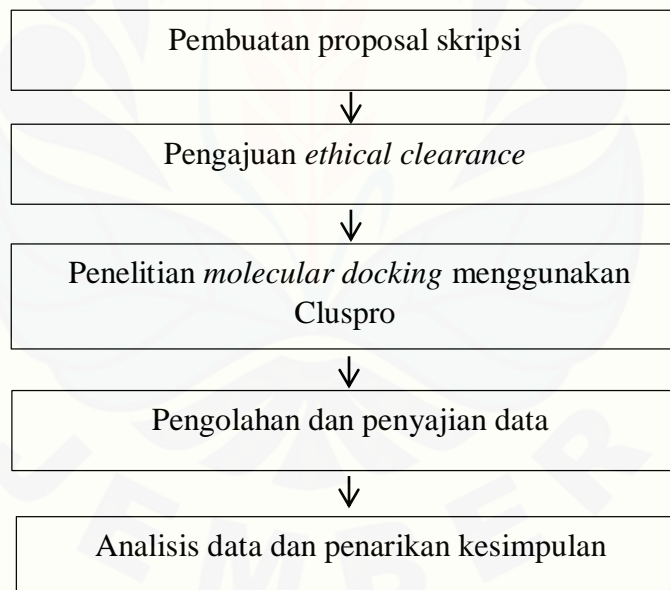
9. Menunggu proses *docking* selama kurang lebih 4 jam.
10. Melihat model interaksi hasil *docking* pada menu *result*.
11. Meninjau nilai *binding energy* pada menu *view model score*.
12. Menganalisis nilai *binding energy* dan model interaksi pengikatan.

3.6 Analisis Data

Dilakukan analisis data hasil *docking* dari aplikasi Cluspro berdasarkan nilai *binding energy*. Molekul dengan nilai *binding energy* terendah menunjukkan interaksi yang bersifat stabil. Oleh karena itu, model interaksi yang memiliki *binding energy* paling rendah adalah yang akan digunakan.

3.7 Alur Penelitian

Alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1 berikut.



Gambar 3.1 Alur penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Diperoleh kesimpulan bahwa enzim papain memiliki nilai *binding energy* terendah sebesar -730.4 pada model interaksi pengikatan 1 ketika berinteraksi dengan protein P23T *crystalline* γ D sedangkan enzim zingibain memiliki nilai *binding energy* terendah sebesar -890.5 pada model interaksi pengikatan 2 ketika berinteraksi dengan protein P23T *crystalline* γ D.

Enzim papain memiliki nilai *binding energy* terendah sebesar - 697.2 pada model interaksi pengikatan 1 ketika berinteraksi dengan protein *B-amyloid* sedangkan enzim zingibain memiliki nilai *binding energy* terendah sebesar -873.5 pada model interaksi pengikatan 0 ketika berinteraksi dengan protein *B-amyloid*.

Enzim zingibain yang berasal dari tanaman *Zingiber officinale* memiliki kemampuan membentuk ikatan yang lebih stabil terhadap protein P23T *crystalline* γ D dan protein β -*amyloid* dibandingkan dengan enzim papain yang berasal dari tanaman *Carica papaya*.

Dengan demikian enzim zingibain potensial untuk dikembangkan sebagai proteolitik yang berguna sebagai terapi berbagai gangguan lensa mata seperti katarak senilis dan kongenital.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut baik secara *in vivo* maupun *in vitro* untuk memastikan kemampuan proteolitik enzim zingibain berinteraksi terhadap protein P23T *crystalline* γ D dan protein β -*amyloid*. Selain itu, perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan enzim proteolitik yang berasal dari tanaman lain untuk mengetahui perbandingan potensi proteolitik tiap enzimnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Afriza D., dkk. 2018 J. Phys.: Conf. Ser. 1073 032001.
- Ambroz S.C., M.T. Harms, J.V.M Hanson, dkk. 2018. Outcome of Pediatric Cataract Surgeries in a Tertiary Center in Switzerland. *Hindawi Journal of Ophthalmology*.
- American Academy of Ophthalmology (AAO). 2019. *Section 6: Pediatric Ophthalmology And Strabismus : Basic And Clinical Science Course*. San Fransisco: American Academy of Ophtalmology.
- Amri E., dan F. Mamboya. 2012. Papain A Plant Enzyme of Biological Importance. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 8(2) : 99-104
- Anggraini D., E. Susanti, N. Saputra. 2020. Efektivitas Krim Papain Kasar Getah Buah Pepaya (*Carica Papaya . L*) yang Diolah dengan Metode Freeze Drying terhadap Penyembuhan Penebalan Kulit (*Callus*). 6(1):1–6.
- Arwansyah, L., T. Ambarsari, Sumaryada. 2014. Simulasi Docking Senyawa Kurkumin dan Analognya Sebagai Inhibitor Reseptor Androgen pada Kanker Prostat. *Current Biochemistry*. Vol 1 (1) : 14-24, ISSN : 2355-7877,
- Astari, P. 2018. Katarak: Klasifikasi, Tata laksana, dan Komplikasi Operasi. *CDK*. 45(10): 748-753.
- Asthana, Somya. (2014). Re: Are there any differences between *binding energy* and *binding energy*?. Retrieved from: <https://www.researchgate.net/post/Are-there-any-differences-between-binding-energy-and-binding-affinity/5433caa5cf57d7b1738b46ae/citation/download>.
- Augusteyn, RC. 2010. *Exp Eye Res*. 90(6):643-54.
- Bashour, M. 2018. Congenital Cataract. <https://emedicine.medscape.com/article/1210837-overview>. [diakses pada 20 Oktober 2020].
- Benfenati, Emilio & Gini, Giuseppina & Hoffmann, Sebastian & Luttk, Robert. (2010). Comparing In Vivo , In Vitro and In Silico Methods and Integrated Strategies for Chemical Assessment: Problems and Prospects. *Alternatives to laboratory animals* : ATLA. 38.

- Bhagavan, N. V. (2002). Enzymes I: General Properties, Kinetics, and Inhibition. *Medical Biochemistry*, 85–108.
- Blanco, A., & Blanco, G. (2017). Enzymes. *Medical Biochemistry*, 153–175.
- Budiono, S. 2013. *Buku Ajar Ilmu Kesehatan Mata*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Cahyana, N. W., 2020. Effect of Isolate Catechin GMB4 in Expression of GRP78 and Tunel Assay in Rat Cataract Model. *Journal of Global Pharma Technology*, Vol. 12 No. 2
- Chakrabarti A. 2017. Posterior capsular rent: Genesis and management. *Posterior Capsul Rent Genes Manag.* 1–279.
- Chen Y, H. Zhao, P. Schuck, dkk. 2014. Solution properties of γ -crystallins: compact structure and low frictional ratio are conserved properties of diverse γ -crystallins. *Protein Sci.* 23(1):76-87.
- Chikhale, Hemant & Nerkar, Amit. 2020. Review on In-silico techniques An approach to Drug discovery.
- Choi K.H., R.A. Laursen, K.N. Allen. 1999. The 2.1 Å structure of a cysteine protease with proline specificity from ginger rhizome, *Zingiber officinale*. *Biochemistry.* 38(36):11624-33.
- Clark A.R., N.H. Lubsen, C. Slingsby., 2012. *Int J Biochem Cell Biol.* 44(10):1687-97.
- Departemen Kesehatan RI. 2005. *Pharmaceutical Care Untuk Penyakit Diabetes Mellitus*. Dep Kes RI. Jakarta. 16. 24: 36-46.
- Ferguson, A. R., & Stanley, R. (2003). KIWIFRUIT. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 3425–3431. doi:10.1016/b0-12-227055-x/00665-9
- Fukumoto H, Rosene DL, Moss MB, Raju S, Hyman BT, Irizarry MC. Beta-secretase activity increases with aging in human, monkey, and mouse brain. *Am J Pathol.* 2004 Feb;164(2):719-25.
- Ghasemzadeh, A., H.Z. Jaafar, A. Rahmat. 2010. Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber. officinale* Roscoe). *Molecules.* 12:4324–4333.
- Hains P.G., dan R.J. Truscott. 2010. Age-dependent deamidation of lifelong proteins in the human lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51:3107–3114.

- Hamidi, M. N. A. dan A. Royadi. 2017. Faktor-faktor yang berhubungan dengan terjadinya katarak senilis pada pasien di poli mata RSUD Bangkinang. *Jurnal Ners Universitas Pahlawan Tuanku Tambusai*. 1(1): 125-138.
- Harper, R.A., dan J.P. Shock. 2010. *Lensa mata*. In: *Whitcher, J.P. &Eva, P.R. (eds.), Vaughan & Asbury Oftalmologi Umum*. Edisi 17. Jakarta: EGC.
- Hart, H. alih bahasa, Suminar Setiati Achmadi; editor, Amalia Safitri. 2003. *Kimia Organik: Suatu Kuliah Singkat*. Jakarta: Erlangga.
- Hejtmancik, J. F., dan A. Shiels A. 2015. Overview of the Lens. *Progress in molecular biology and translational science*. 134:119–127.
- Ho MC, Peng YJ, Chen SJ, Chiou SH. Senile cataracts and oxidative stress. *J Clin Gerontol Geriatr*. 2010;1(1):17–21.
- Ilyas S., dan S.R. Yulianti. 2014 *Ilmu Penyakit Mata*. Edisi 5. Jakarta: balai penerbit FKUI
- Ilyas, S. 2015. *Ilmu Penyakit Mata*. Ed ke-5. Jakarta: balai penerbit FKUI
- Ilyas, S. H. dan S. R. Yulianti. 2017. *Ilmu Penyakit Mata*. Edisi Kelima. Jakarta: balai penerbit FKUI.
- Islam, Rafiad. 2013. Isolation, purification and modification of papain enzyme to ascertain industrially Valuable nature. *International Journal of Bio-Technology and Research*. 3: 11-22.
- Jong-Anurakkun N. 2007. A-Glucosidase Inhibitors from Devil Tree (*Alstonia scholaris*). *Food Chemistry* 103: 1319-1323.
- K P Burdon M G Wirth D A Mackey I M Russell-Eggitt J E Craig J E Elder J L Dickinson M M Sale. *British Journal of Ophthalmology* 2003; 88 79-83 Published Online First: 23 Dec 2003. doi: 10.1136/bjo.88.1.79
- Kamphuis, I.G., K.H. Kalk, M.B. Swarte., dkk. 1984. *J Mol Biol*. 179: 233-256
- Kastritis, P. L., & Bonvin, A. M. J. J. (2012). On the *binding energy* of macromolecular interactions: daring to ask why proteins interact. *Journal of The Royal Society Interface*, 10(79), 20120835–20120835.
- Kaur, J., Kukreja, S., Kaur, A., Malhotra, N., & Kaur, R. 2012. The oxidative stress in cataract patients. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 6(10), 1629–1632.

- Kementrian Kesehatan RI (Kemenkes). 2014. *Situasi Gangguan Penglihatan dan Kebutaan*. Jakarta: Pusdatin Kemenkes RI.
- Khanna RC, A. Foster., S. Krishnaiah, dkk. 2013. Visual outcomes of bilateral congenital and developmental cataracts in young children in south India and causes of poor outcome. *Indian J Ophthalmol*. 61: 65-70.
- Kozakov, D., D. R. Hall, B. Xia, K.A. Porter, dan D. Padhorny. 2017. The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature protocols*, 12(2), 255–278.
- Kroemer R.T. 2007. Structure-Based Drug design: Docking and Scoring. *Current Protein and Peptide Science* . 8(4): 312-328.
- Laganowsky A, J.L Benesch, M. Landau, L. Ding , M.R. Sawaya, dan D. Cascio. 2010. *Protein Sci*. 19(5):1031-43.
- Laily A.N., dan A.N. Khoiri. 2016. Identifikasi senyawa antidiabetes secara *in silico* pada *carica pubescens*. *el-Hayah*. 5(4):135.
- Liener IE, Friedenson B (1970). "Ficin". *Methods Enzymol*. 19: 261–273
- Lim M.E., E.G. Buckley, S.G. Prakalapakorn, dan L.H. Mikkelsen, dkk. 2017. Update on congenital cataract surgery management. *Curr Opin Ophthalmol*. 28: 87 – 92
- Lou M.F. 2000. Thiol regulation in the lens. *J Ocul Pharmacol Ther*. 16(2):137-48.
- Messina-Baas, O., dan S.A. Cuevas-Covarrubias, 2017. Inherited Congenital Cataract: A Guide to Suspect the Genetic Etiology in the Cataract Genesis. *Molecular syndromology*, 8(2): 58–78.
- Mingliang L. 2010. *Enzyme and Microbial Technology*.
- Mohammedali, Bakr. (2015). Re: Can anyone explain what is the relationship between *binding energy* and stability in docking?. Retrieved from: <https://www.researchgate.net/post/Can-anyone-explain-what-is-the-relationship-between-binding-energy-and-stability-in-docking/5514491fd4c118e15c8b45de/citation/download>.
- Moore AT. Understanding the molecular genetics of congenital cataract may have wider implications for age related cataract. *British Journal of Ophthalmology* 2004;88:2-3.

- Moreau K.L., dan J.A King. 2012. Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention. *Trends in molecular medicine*, 18(5), 273–282.
- Nafi A, F.H Ling, J. Bakar, H.M Ghazali. 2014. Partial characterization of an enzymatic extract from Bentong ginger (*Zingiber officinale* var. Bentong). *Molecules*. 19(8): 36–48.
- Nafi' A, H.L Foo, B. Jamilah, dan H.M Ghazali. 2013 Properties of proteolytic enzyme from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Int Food Res J*. 20(1): 3–8.
- Nartey, A. 2017. The pathophysiology of cataract and major interventions to retarding its progression : a mini review. *Adv Ophthalmol Vis Syst*.
- Nitsawang S. 2006. Enzyme and Microbial Technology. 39: 1103–1107
- Nizami A.A., dan A.C. Gulani. 2020. Cataract. *StatPearls*
- Noori, R.H., dan R. Spanagel. 2013. *In silico* pharmacology: drug design and discovery's gate to the future. *SpringerOpen Journal*, 1(1).
- Pande, A., Annunziata, O., Asherie, N., Ogun, O., Benedek, G. B., and Pande, J. (2005) Decrease in protein solubility and cataract formation caused by the Pro23 to Thr mutation in human γ D-crystallin. *Biochemistry* 44, 2491–2500.
- Pandey A.N., A. Raina, dan P. Singh. 2016. A Clinical Study of Congenital Cataract. *J Ophthalmol Vis Neurosci*.
- Pavan, R., Jain, S., Shraddha, & Kumar, A. (2012). Properties and therapeutic application of bromelain: a review. *Biotechnology research international*, 2012, 976203. <https://doi.org/10.1155/2012/976203>
- Pérez S, Tvaroška .2014 .Carbohydrate-protein interactions: Molecular modeling insights. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Vol (71): 9–136 p.
- Prima P., B. Pairul, S.H. Nasution. 2017. Jahe (*Zingiber officinale*) Sebagai Anti Ulserogenik Ginger (*Zingiber officinale*) as Anti Ulcerogenic. 7:42–6.
- Qiao, Y. 2009. Economic methods of ginger protease's extraction and purification. 1619-1628.
- Rajavi Z., dan H. Sabbaghi. 2016. Congenital cataract screening. *J Ophthalmic Vis Res*.11(3): 310-12.

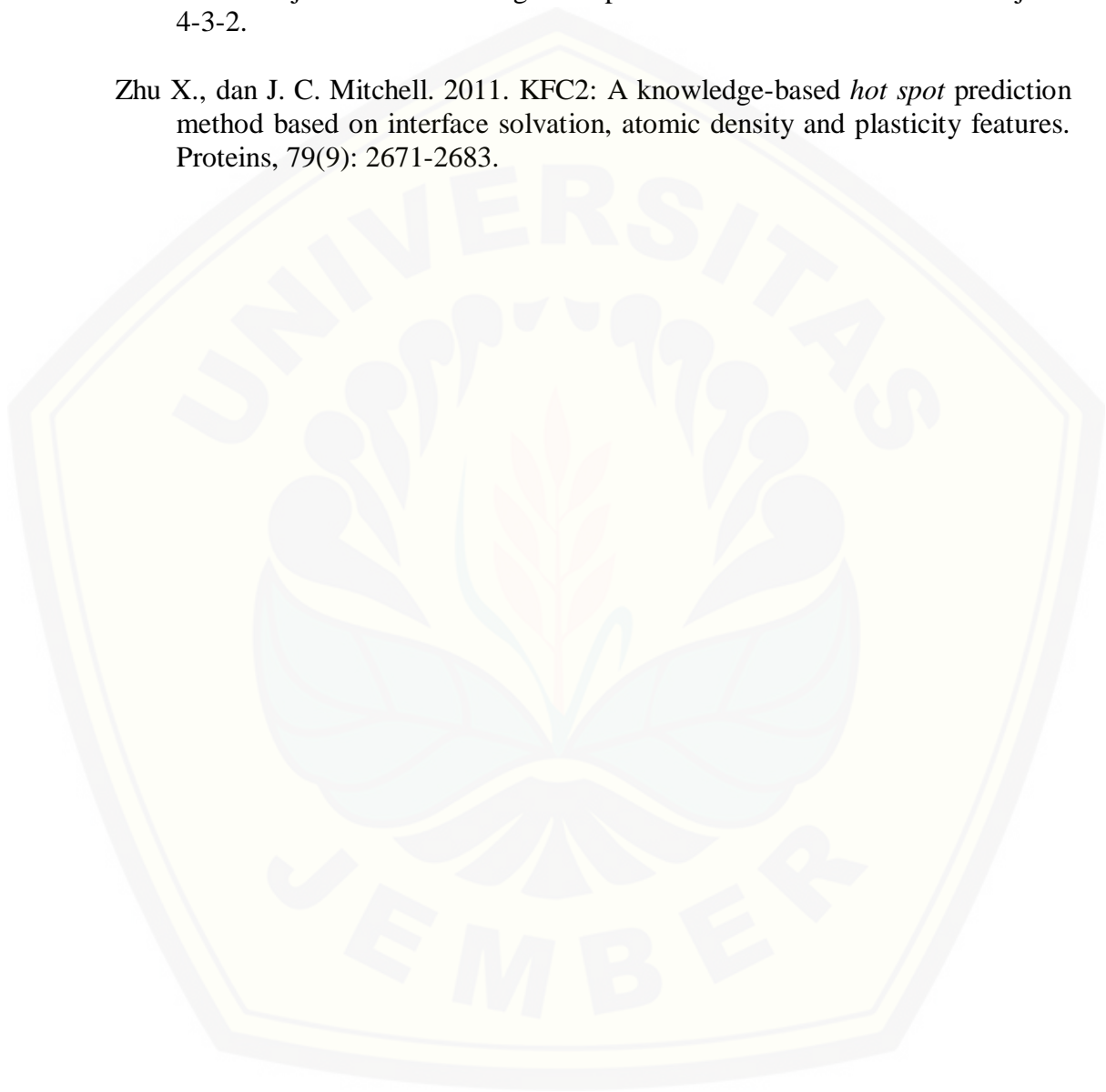
- Rao V.S., dan K. Srinivas. 2011. Modern drug discovery process : An *in silico* approach. *J Bioinforma Seq Anal.* 2: 89–94.
- Rickhal, H. 2012. Keterlibatan Enzim Dalam Bahan Pangan Skala Industri Makanan Dan Minuman. Jurusan Kimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Haluoleo Kendari.
- Riordan-Eva P, A. J., 2018. Vaughan and Asbury's General Ophthalmology. New York: McGraw Hill
- Riordan-Eva P, J.J. Augsburger, Vaughan, dan Asbury's. 2017. *General Ophthalmology*. 19th ed. New York: McGraw-Hill Education
- Santana, A., dan M. Waiswo. 2011. The genetic and molecular basis of congenital cataract. *Arquivos brasileiros de oftalmologia*, 74(2): 136-142.
- Sawitri K. N., S.T. Wahyudi, dan T. Sumaryada. 2014. Molecular Dynamics Simulation and Unfolding Process of a full IGB1protein, *Jurnal Biofisika*, Vol 10 (1) pp 59-64.
- Shah M.A, S.M., A. Applewar, C. Patel, K. Patel. 2012. Ocular trauma score as a predictor or of final visual outcomes in traumatic cataract cases in pediatric patient. *J Cataract refract Surg.* 38: 959-69
- Shah M.A., dan S.A. Mir. 2019. Plant Proteases in Food Processing. *Bioactive Molecules in Food*.
- Sharma K.K., dan P. Santhoshkumar. 2009. Lens aging: effects of crystallin. *Biochim Biophys Acta.* 1790(10): 95-108.
- Sherwood, L. 2013. *Introduction To Human Physiology*. 8th Ed. Jakarta : EGC.
- Shiels A, P.E. Cabrera., dan Hejtmancik J.F. 2016. Genetics of age-related cataract. *Curated Ref Collect Neurosci Biobehav Psychol.* 207–10.
- Singh S.K., J. Patel, dan D. Bachle. 2014. A review on *Zingiber officinale* : a natural gift. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*; 5(3):508-25.
- Slingsby, C., dan G.J. Wistow. (2014). Functions of crystallins in and out of lens: roles in elongated and post-mitotic cells. *Progress in biophysics and molecular biology*, 115(1), 52–67.
- Sreelakshmi V., dan A. Abraham. 2016. Age Related or Senile Cataract: Pathology, Mechanism and Management. *Austin J Clin Ophthalmol.* 3(2):1067.

- Strooper B, Annaert W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci.* 2000 Jun;113 (Pt 11):1857-70. PMID: 10806097.
- Suharna. 2012. Studi Insilico Senyawa Turunan Flavonoid terhadap Penghambatan Enzim Tirosinase. Skripsi. Makassar: UIN Alauddin.
- Syahputra G., L. Ambarsari, T., dan Sumaryada. 2014. Docking Simulation of Curcumin and Its Analogs as Inhibitors on 12- Lipoxygenase Enzymes, *Jurnal Biofisika*, 10(1) 48-58.
- Takagane K, Nojima J, Mitsunashi H, Suo S, Yanagihara D, Takaiwa F, Urano Y, Noguchi N, Ishiura S.2015. Abeta induces oxidative stress in senescence-accelerated (SAMP8) mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* Vol (79):912-8.
- Takeuchi, Masaru, Shieh, Po-Chuen, Horng, dan Chi-Ting. 2020. Treatment of Symptomatic Vitreous Opacities with Pharmacologic Vitreolysis Using a Mixture of Bromelain, Papain and Ficin Supplement. *Applied Sciences*.
- Tewari D, O. Samoila, dan D. Gocan. 2019. Medicinal plants and natural products used in cataract management. *Front Pharmacol.* 10:1–22.
- Varma S.D., K. Hegde, dan M. Henein. 2003 Oxidative damage to mouse lens in culture. Protective effect of pyruvate. *Biochim Biophys Acta.* 1621(3):246-52.
- Wadood A, N. Ahmed, dan L. Shah. 2011. *In silico* drug design: An approach which revolutionarised the drug discovery process. *OA Drug design & Delivery.* 1(1):3.
- Wang Y, dkk. 2010. Formation of Amyloid Fibrils In Vitro from Partially Unfolded Intermediates of Human C-Crystallin. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* Vol (51):672–678.
- Wistow G, dan C. Slingsby. 2010. Structure and evolution of crystallin. *The Encyclopedia of the Eye.* 2: 229–238.
- Wistow G. 2012. The human *crystalline* gene families. *Human genomics.* 6(1): 26.
- World Health Organization (WHO). 2012. *Global Data On Visual Impairments 2010.* WHO Press.
- wwPDB Consortium. 2019. Protein data bank: the single global archive for 3D macromolecular structure data. *Nucleic Acids Research.* 47: 520–D528

Xu J, Li D, Zheng T, Lu Y. 2017. B-Amyloid Expression in Age-Related Cataract Lens Epithelia and the Effect of B-Amyloid on Oxidative Damage in Human Lens Epithelial Cells. *Mol Vis*. Vol (23):1015–28.

Yunta, María. (2016). Docking and Ligand *Binding energy*: Uses and Pitfalls. *american journal of modeling and optimization*. 4. 74-114. 10.12691/ajmo-4-3-2.

Zhu X., dan J. C. Mitchell. 2011. KFC2: A knowledge-based *hot spot* prediction method based on interface solvation, atomic density and plasticity features. *Proteins*, 79(9): 2671-2683.



LAMPIRAN

LAMPIRAN 1. PROSEDUR *MOLECULAR DOCKING* MENGGUNAKAN APLIKASI CLUSPRO

A. Pengisian *Job Name* dan kode PDB untuk *receptor* dan *ligand*

Dock [sign out](#)

Note: Due to increased server usage, please submit no more than 15 jobs at a time.

Job Name:

Server:

Accepted PDB Input:
20 standard amino acids and RNA (as receptor only), ref: RNA Select Heparin Mode to use Heparin as Ligand.

Receptor	Ligand
PDB ID: <input type="text" value="9PAP"/>	PDB ID: <input type="text" value="2KFB"/>
Upload PDB	Upload PDB
Chains: <input type="text"/>	Chains: <input type="text"/>

Whitespace separate desired chains. Leave chains blank to use all chains.

▶ **Advanced Options**

B. Cluspro melakukan proses *docking* kurang lebih selama 4 jam

Running Jobs [sign out](#)

Id	Name	User	Status
584192	Papain-P23T	gangsardamai	processing pdb files
584191	584191	ophioploteus	running on supercomputer
584190	gpcr	ragarwa4	running on supercomputer
584189	584189	ophioploteus	running on supercomputer
584187	penovo 3	helysonlucas	running on supercomputer
584186	pepnovo 2	helysonlucas	running on supercomputer
584185	TGFb RI and RII	yutaoqi07	clustering and minimization
584182	584182	ophioploteus	running on supercomputer
584173	PAYA22	piiper	finalizing job
584129	JAHESH2	piiper	running on supercomputer
584125	EOIO	samuela75	running on supercomputer

C. Peninjauan hasil *docking* aplikasi Cluspro dengan mengklik kode Id.

[sign out](#)

Running Jobs

Id	Name	User	Status
584195	Zingibain - Beta Amy	gangsardamai	processing pdb files
584194	Zingibain - P23T	gangsardamai	pre-docking minimization
584193	Papain-Beta Amyloid	gangsardamai	in queue on supercomputer
584192	Papain-P23T	gangsardamai	in queue on supercomputer
584191	584191	ophioploteus	running on supercomputer
584190	gpcr	ragarwa4	running on supercomputer
584189	584189	ophioploteus	running on supercomputer
584187	penovo 3	helysonlucas	running on supercomputer
584186	pepno 2	helysonlucas	running on supercomputer
584185	TGFb RI and RII	yutaoqi07	clustering and minimization

D. Memilih menu *view model score* untuk mengetahui nilai *binding energy*

[sign out](#)

Job Details: Papain-P23T

[View Models](#)

Balanced | [Electrostatic-favored](#) | [Hydrophobic-favored](#) | [VdW+Elec](#)

[Download Model Scores for this Coefficient](#)

Coefficient Weights

See *Kozakov et. al.* in [Papers](#) for a description of these terms

$$E = 0.40E_{rep} + -0.40E_{att} + 600E_{elec} + 1.00E_{DARS}$$

Cluster Scores

We strongly encourage you to read the [FAQ related to these scores](#) before using them.

Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	82	Center	-577.2

E. Memilih *cluster*/ model interaksi pengikatan dengan nilai *lowest energy* paling rendah.

Job Details: Papain-P23T
[View Models](#)

Balanced | [Electrostatic-favored](#) | [Hydrophobic-favored](#) | [VdW+Elec](#)
[Download Model Scores for this Coefficient](#)

Coefficient Weights
 See *Kozakov et. al.* in [Papers](#) for a description of these terms
 $E = 0.40E_{rep} + -0.40E_{att} + 600E_{elec} + 1.00E_{DARS}$

Cluster Scores
 We strongly encourage you to read the [FAQ related to these scores](#) before using them.

Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	82	Center	-577.2
		Lowest Energy	-698.4
1	80	Center	-646.4
		Lowest Energy	-730.4
2	78	Center	-561.8
		Lowest Energy	-632.9
3	72	Center	-633.2
		Lowest Energy	-633.2
4	50	Center	-586.2
		Lowest Energy	-652.1
5	46	Center	-622.9
		Lowest Energy	-622.9

F. Kembali pada menu sebelumnya dan pilih gambaran *cluster*/ model interaksi pengikatan dengan nilai *lowest energy* paling rendah.

[Sign out](#)

Job Details: Zingibain - P23T
[View Model Scores](#)
[Download all Models for all Coefficients](#)

Balanced | [Electrostatic-favored](#) | [Hydrophobic-favored](#) | [VdW+Elec](#)
 Display Models:
[Download Displayed Models](#)

If you use these models in a paper, please cite our [papers](#)

0 1

