

LAPORAN HASIL PENELITIAN

ANALISAIN *SILICO* ENZIM PAPAN TERHADAP PROTEIN KATARAK

oleh

Dr. dr. Nugraha Wahyu Cahyana Sp.M

Dosen Fakultas Kedokteran

Universitas Jember



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN
TINGGI NIVERSITAS JEMBER
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA
MASYARAKAT

BIAYA MANDIRI

HALAMAN PENGESAHAN

LAPORAN HASIL PENELITIAN

Judul Kegiatan : Analisa *In Silico* Enzim Papain Terhadap Protein Katarak

Kode>Nama Rumpun Ilmu : Kedokteran Umum

Ketua Pelaksana

d. Nama : Dr.dr. Nugraha Wahyu Cahyana, Sp.M
e. Pangkat /Golongan/NIP : Penata/ III-c/196307141999031001
f. Jabatan : Lektor

Jumlah Anggota : -

Waktu Pelaksanaan : Januari-Februari 2021

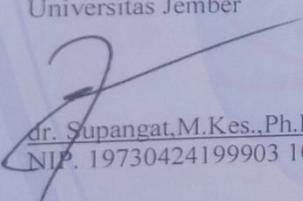
Biaya

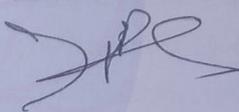
3. Dana Yang diperlukan : Rp. 2.000.000
4. Sumber Dana : Mandiri

Jember, 22 Februari 2021

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Jember

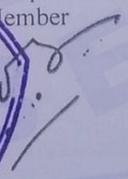
Ketua Pelaksana Penelitian


dr. Supangat, M.Kes., Ph.D., Sp.BA
NIP. 19730424199903 1002


Dr. dr. Nugraha Wahyu Cahyana, Sp.M
NIP. 196307141999031001

Mengetahui,
Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Jember




Prof. Ir. Achmad Subagiyo, M.Agr., Ph.D
NIP. 196905171992011001

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 fenotipe (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 β) (Strooper dan Annaert, 2000). β -amyloid (A β) memiliki kaitan kuat dengan stres oksidatif (Takagane dkk., 2015). Radikal bebas, termasuk beberapa *Reactive Oxygen Species* (ROS) seperti SO₂, H₂O₂, 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 penglihatan 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).

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 komputersasi 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 affinity* atau energi pengikatan, semakin kecil nilai *binding affinity*, 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) 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 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 affinity* enzim papain terhadap protein *Crystalline P23T γD* melalui uji *in silico* ?
2. Bagaimana nilai *binding affinity* enzim papain terhadap protein *β-amyloid (Aβ)* melalui uji *in silico* ?
3. Bagaimana perbandingan nilai *binding affinity* enzim papain terhadap protein *Crystalline P23T γD* melalui uji *in silico* ?
4. Bagaimana Perbandingan nilai *binding affinity* enzim papain terhadap protein *β-amyloid (Aβ)* melalui uji *in silico* ?

1. 3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. Mengetahui nilai *binding affinity* enzim papain terhadap protein *Crystalline P23T γD* melalui uji *in silico*.
2. Mengetahui nilai *binding affinity* enzim papain terhadap protein *β-amyloid (Aβ)* melalui uji *in silico*.
3. Mengetahui perbandingan nilai *binding affinity* enzim papain terhadap protein *Crystalline P23T γD* melalui uji *in silico*.
4. Mengetahui perbandingan nilai *binding affinity* enzim papain terhadap protein *β-amyloid (Aβ)* melalui uji *in silico*.

1. 4 Manfaat Penelitian

Manfaat Bagi Peneliti

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

1.4.1 Manfaat Bagi Penelitian Lain

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

1.4.2 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 silika (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.

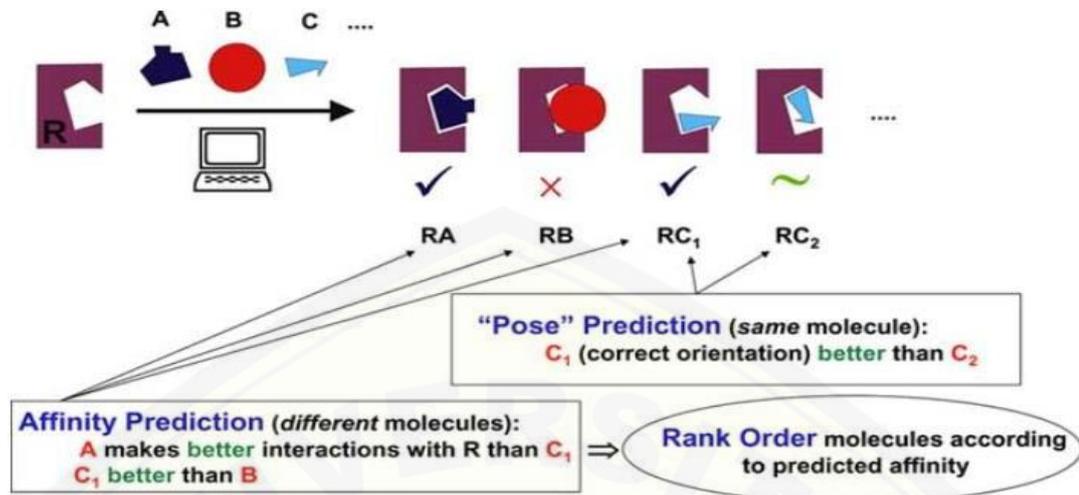
Salah satu bentuk aplikasi bioinformatika adalah untuk mendesain kandidat molekul obat (*drug design*). *Drug design* dilakukan untuk mengetahui aktivitas kimia suatu kandidat molekul obat melalui metode komputasi. Bioinformatika berperan membantu memudahkan menghitung karakter molekul yang kompleks 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 *folding* 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 affinity* atau energi pengikatan, semakin kecil nilai *binding affinity*, maka ikatan akan semakin mudah terbentuk. Hasil analisis penambatandisajikan dalam kumpulan model interaksi. Model interaksi yang memiliki *binding affinity* paling rendah adalah yang akan digunakan (Laily dan Khoiri, 2016).

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

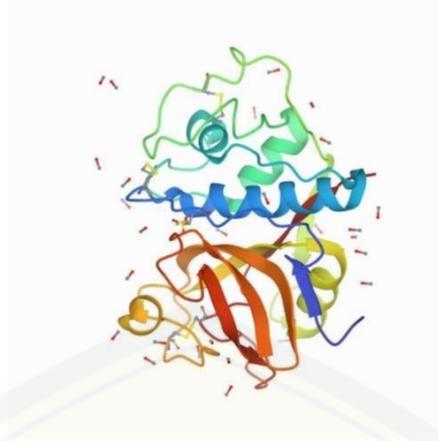
Server ClusPro (<https://cluspro.org>) adalah alat yang banyak digunakan untuk *docking* protein-protein. Server ini menyediakan halaman beranda yang sederhana, hanya membutuhkan dua file dalam format *Protein data bank* (PDB). Pengguna cukup mengunggah dua struktur protein, atau masukkan kode PDB dari 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 I, 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. Penyadapan 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 penyadapan 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 *coldstorage*.

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) - (NH₄)₂SO₄ 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 (NH₄)₂SO₄) dan air deionisasi untuk mencapai berat total 10 g. Larutan fosfat disiapkan dengan menggunakan K₂HPO₄ dan NaH₂PO₄, 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 $12.000 \times g$ 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 disebar 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.

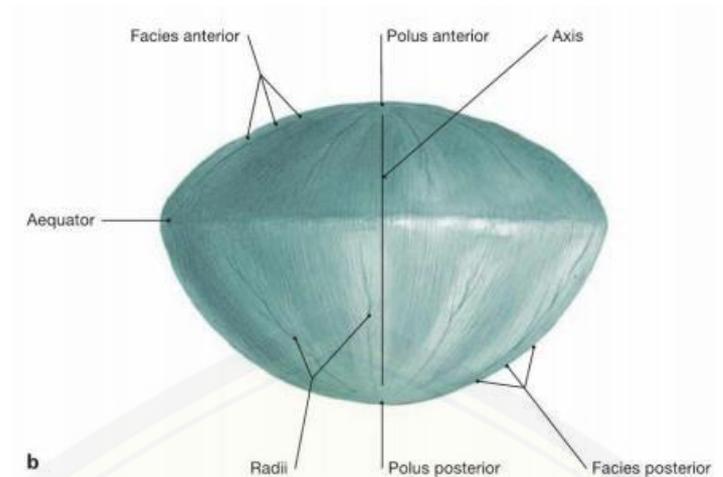
Pengeringan semprot tidak mungkin dilakukan dalam skala kecil. Papain semprot kering memiliki aktivitas enzim yang lebih tinggi dibandingkan papain lainnya dan benar-benar larut dalam air. Perawatan yang sangat hati-hati saat menangani bentuk papain ini karena dapat menyebabkan alergi dan emfisema jika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

Oven konvensional (Mammert), 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 Anatomi dan Fisiologi Mata

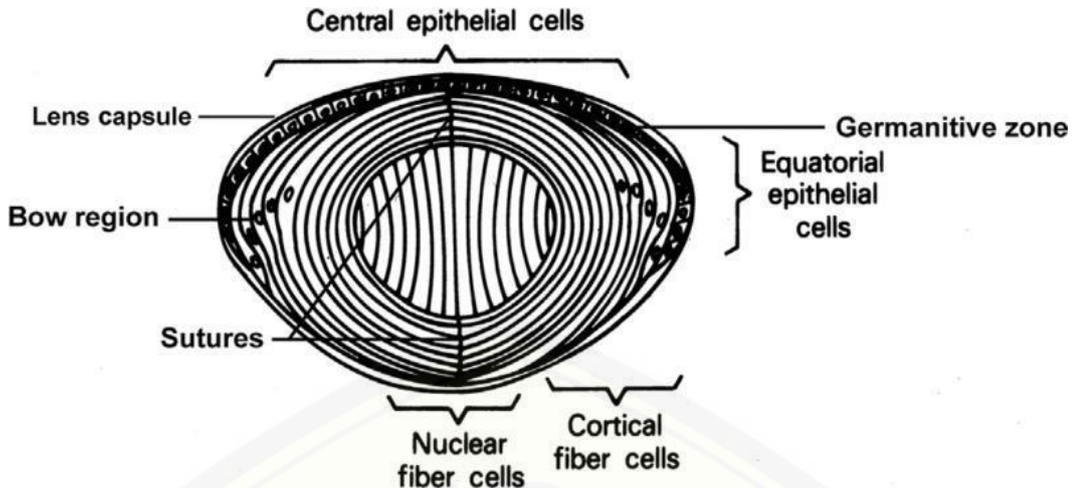
Lensa mata adalah struktur transparan, berbentuk bikonveks, dan avaskuler yang berfungsi sebagai akomodasi mata. Lensa mata terletak di belakang iris dan di depan corpus vitreum, ditopang oleh zonula zinn yang menggantungkan lensa mata di seluruh ekuatornya pada badan siliar. Lensa mata terdiri dari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

2.7 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 β 2-*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, tapi 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
α A	19909	CRYAA	21q22.3
α B	20159	CRYAB	11q23.1
β A1	23191	CRYBA1	17q11.2
β A2c	21964	CRYBA2	2q35
β A3	25150	CRYBA1d	17q11.2
β A4	22243	CRYBA4	22q12.1
β B1	27892	CRYBB1	22q12.1
β B2	23249	CRYBB2	22q11.23
β B3	24230	CRYBB3	22q11.23
γ C	20747	CRYGC	2q33.3
γ D	20607	CRYGD	2q33.3
γ S	20875	CRYGS	3q27.3

(Sumber : Moreau dan King, 2012)

2.8 Gangguan Mata Akibat Perubahan Protein *Crystalline*

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

2.8.1 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 tapi 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 mikroftalmia. Pada mutasi ini arginin digantikan oleh sistein di posisi 116. Pergantian ini menghasilkan oligomerisasi abnormal dari α - dan β -crystallins 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 bila 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 mempengaruhi 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 didasarkan 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).

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 sekira 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

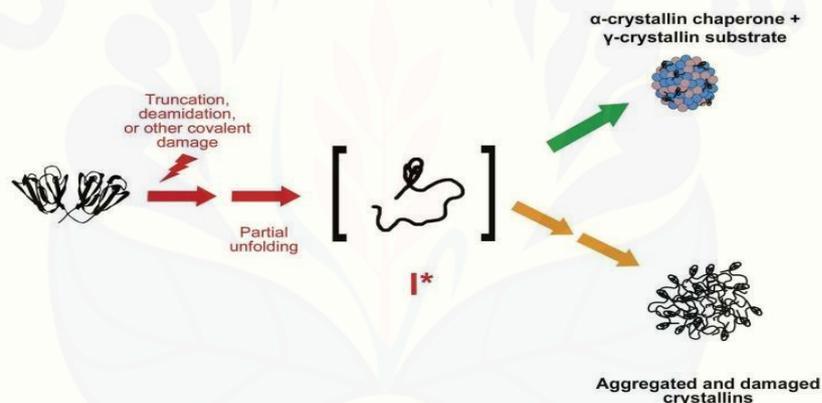
Akibat bertambahnya usia maka cacat imunologik juga bertambah yang akhirnya mengakibatkan kerusakan pada sel

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 $\beta\gamma$ -*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* γD - dan γC 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 astigmatisme.

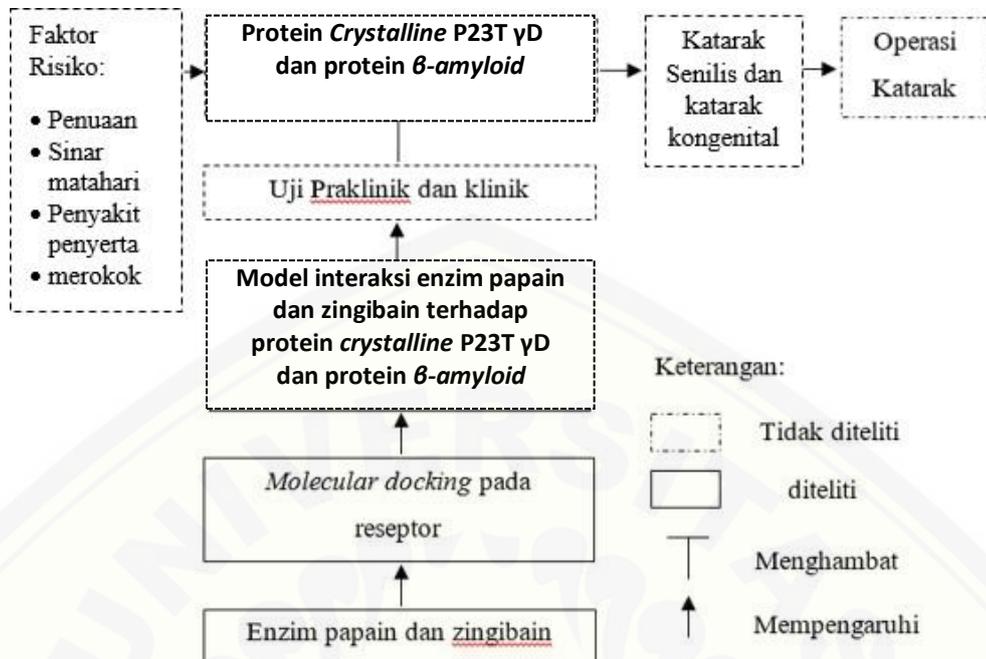
2. Ekstraksi Katarak Ekstrakapsular

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 astigmatisme 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 astigmatisme setelah pembedahan. Teknik ini merupakan pilihan utama pada negara maju.

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-Februari 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

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.

Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu :

1. *Binding affinity*

Binding affinity adalah nilai kekuatan interaksi pengikatan antara enzim papain dan zingibain dengan protein *crystalline* yang di dapat dari *website*<https://cluspro.bu.edu/>

2. Model Interaksi Pengikatan

Model Interaksi Pengikatan adalah gambar struktur tiga dimensi interaksi antara enzim papain dan zingibain dengan protein *crystalline* yang di dapat dari *website*<https://cluspro.bu.edu/>

Variabel kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah struktur protein *crystalline* 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 affinity* pada menu *view model score*.
12. Menganalisis nilai *binding affinity* dan model interaksi pengikatan.

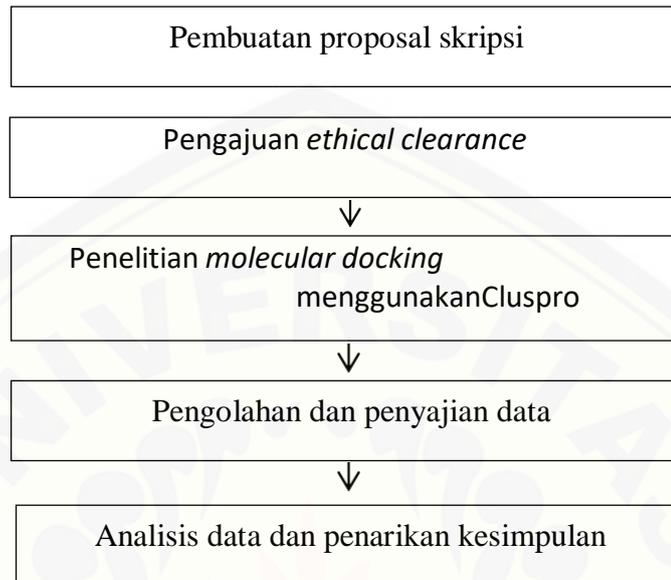
3.6 Analisis Data

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

3.7 Alur Penelitian



Alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1 berikut.



Gambar 3.1 Alur penelitian

3.8 Biaya Penelitian Rencana

No	Keterangan	Biaya
1	Persiapan	
	- Administrasi	Rp. 200.000;
2	Proses Penelitian	Rp. 1.000.000;
3	Penyusunan dan Pengadaan Laporan Hasil Penelitian	Rp. 200.000;
4	Seminar Hasil	Rp. 400.000;
5	Biaya Lain-lain	Rp. 200.000;
	Total Biaya	Rp. 2.000.000;

Terbilang : (Dua Juta Rupiah)

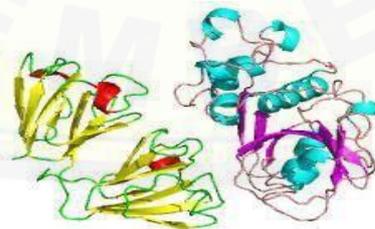
4.1 Hasil Penelitian

Penelitian uji *in silico* potensi proteolitik enzim papain dan enzim zingibain terhadap protein pembentuk katarak kongenital dan senilis telah dilaksanakan pada tanggal 08 Januari 2021 – 10 Januari 2021. Setelah dilakukan *docking* melalui Clusopro, didapatkan hasil *binding affinity* dan model interaksi pengikatan antara enzim papain dan zingibain terhadap protein P23T *crystalline* γ D dan protein β -*amyloid*.

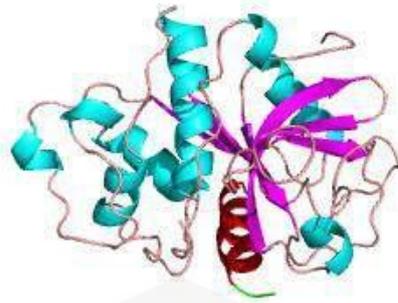
Nilai *binding affinity* dan model interaksi pengikatan setiap enzim terhadap target *docking* ditampilkan pada tabel dan gambar berikut.

Tabel 4.1 Nilai *binding affinity* setiap enzim terhadap target *docking*

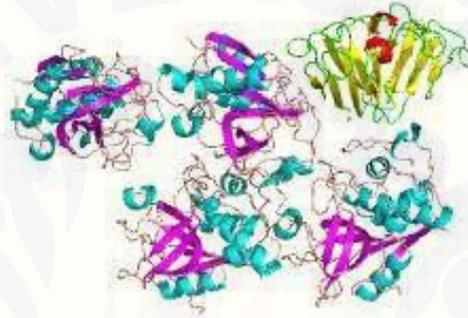
Target Docking	Enzim papain	
	Model Interaksi Pengikatan	Nilai Bindin Affinity
Protein P23T <i>crystalline</i> γ D	1	730,4
	1	697,2
Protein B- <i>amyloid</i>		



Gambar 4.1 Model interaksi pengikatan 1 enzim papain terhadap protein P23T *crystalline* γ D

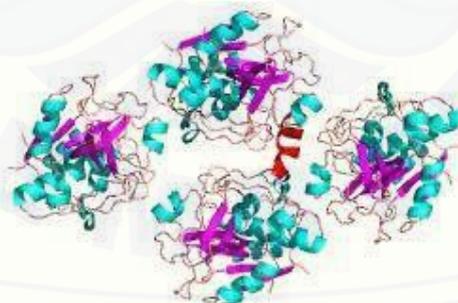


Gambar 4.2 Model interaksi pengikatan 1 enzim papain terhadap protein *B-amyloid*



Gambar 4.3 Model interaksi pengikatan 2 enzim zingibain terhadap protein P23T

crystalline γ D



Gambar 4.4 Model interaksi pengikatan 0 enzim zingibain terhadap protein *B-amyloid*

Pembahasan

Protein adalah polimer yang tersusun dari unit-unit asam amino yang saling berikatan melalui ikatan amida. Susunan unit asam amino yang lebih pendek atau oligomer disebut sebagai peptida dan berperan dalam berbagai proses biologis tubuh (Hart, 2003). Enzim adalah jenis dari protein yang memiliki fungsi katalis reaksi kimia. Enzim memiliki spesifisitas molekul yang menjadi substratnya untuk dikatalis. Konsentrasi substrat, suhu dan pH merupakan faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim (Rickhal, 2012). Dalam hal ini, interaksi antara enzim papain dan zingibain terhadap protein P23T *crystalline* γ D dan protein β -*amyloid* sebagai protein pembentuk katarak dapat diketahui *binding affinity* dan model interaksinya.

Secara *in silico*, enzim papain dan zingibain diketahui dapat menjadi proteolitik terhadap protein P23T *crystalline* γ D sehingga dapat mengurangi jumlah protein dengan tingkat kelarutan yang rendah, berat molekul yang tinggi, dan rentan terjadi agregasi. Hal ini menunjukkan potensi penggunaan enzim papain dan zingibain sebagai terapi penyakit katarak kongenital. Reaksi proteolitik enzim papain dan zingibain terhadap protein β -*amyloid* juga dapat diketahui melalui uji *in silico*. Reaksi proteolitik dapat menurunkan jumlah protein β -*amyloid* sehingga tingkat stres oksidatif dapat menurun dan mencegah terjadinya kerusakan protein *crystalline* penyusun struktur lensa mata. Oleh karena itu, enzim papain berpotensi menjadi terapi penyakit katarak senilis.

Analisis *docking* dilakukan untuk mengetahui interaksi paling stabil antara protein ligan dan protein reseptor yang diproses melalui *docking*. Interaksi ini didasarkan pada *binding affinity*/energi pengikatan, semakin kecil nilai energinya, akan semakin mudah untuk berikatan. Hasil analisis *docking* disajikan dalam berbagai model interaksi, untuk menentukan model interaksi yang akan digunakan adalah yang energinya paling rendah.

Binding affinity adalah kekuatan interaksi antara dua (atau lebih) molekul yang mengikat secara *reversible* (Kastritis dan Bonvin, 2012). *Binding affinity* dipengaruhi oleh interaksi antarmolekul non-kovalen seperti ikatan hidrogen,

interaksi elektrostatik, gaya hidrofobik dan Van der Waals antara kedua molekul. Selain itu, afinitas pengikatan antara ligan dan molekul targetnya dapat dipengaruhi oleh keberadaan molekul lain (Yunta, 2016). Derajat pengikatan ligan dengan protein mengacu pada *binding affinity*. Sedangkan Energi yang dilepaskan karena pembentukan ikatan, atau lebih tepatnya, interaksi ligan dan protein disebut *binding energy*. 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 pengikatan ligan dan protein semakin baik (Asthana, 2014). Berdasarkan hasil yang telah disebutkan, dapat diketahui bahwa enzim zingibain memiliki nilai *binding affinity* yang lebih rendah atau ikatan yang lebih stabil dibandingkan enzim papain ketika diinteraksikan dengan protein P23T *crystalline* γ D dan protein β -*amyloid*.

Gambar 4.3 adalah model interaksi pengikatan 2 yang menggambarkan interaksi enzim zingibain terhadap protein P23T *crystalline* γ D. Model interaksi pengikatan ini memiliki *binding affinity* atau energi paling rendah yaitu sebesar 890.5 dibandingkan dengan model interaksi yang dibentuk enzim papain.

Gambar 4.4 adalah model interaksi pengikatan 0 yang menggambarkan interaksi enzim zingibain terhadap protein *B-amyloid*. Model interaksi pengikatan ini memiliki *binding affinity* atau energi paling rendah yaitu sebesar -873.5 dibandingkan dengan model interaksi yang dibentuk enzim papain.

Penelitian sebelumnya menunjukkan nilai *binding affinity* enzim papain yang lebih baik ketika berinteraksi dengan target *docking* lainnya. Uji *in silico* enzim papain terhadap α -amilase menunjukkan nilai *binding affinity* sebesar -799,4, sedangkan interaksi antara Papain terhadap α -glukosidase menunjukkan nilai *binding affinity* sebesar -934,7 (Laily dan Khoiri, 2016). Penelitian ini bertujuan untuk menguji potensi enzim papain sebagai antidiabetes. Jong- Anurakkun (2007) menjelaskan penghambatan α -glukosidase akan menunda pencernaan dan penyerapan karbohidrat sehingga menekan hiperglikemia setelah makan (*postprandial*). Inhibitor α -glukosidase juga dapat menghambat aktivitas enzim α -amilase dalam menghidrolisis polisakarida dalam lumen usus (DepKes

RI, 2005). Aktivitas enzim α -glukosidase seperti maltase dan sukrase dalam menghidrolisis oligosakarida menjadi glukosa, fruktosa dan monosakarida lain pada dinding usus halus dapat dihambat oleh senyawa obat inhibitor α -glukosidase. Senyawa obat ini hanya berpengaruh terhadap penurunan kadar gula darah pada waktu makan dan tidak mempengaruhi kadar gula darah setelahnya.

Sebenarnya ada berbagai macam proteolitik lain yang bersumber dari tanaman dan berpotensi sebagai terapi katarak senilis maupun kongenital. Bromelain, ficin, dan actinidin adalah enzim proteolitik yang bersumber dari tanaman dan bisa jadi memiliki potensi proteolitik yang lebih tinggi dibanding enzim papain dan zingibain.

Bromelain termasuk dalam kelompok enzim pencerna protein yang diperoleh secara komersial dari buah atau batang nanas. Bromelain-buah dan bromelain-batang mengandung komposisi enzimatik yang berbeda. "Bromelain" biasanya mengacu pada "bromelain-batang" (Pavan, dkk., 2012)

Ficin, merupakan enzim yang berasal dari getah buah ara. Ficin adalah keluarga protease yang dikenal sebagai *cysteine endopeptidases*, kelompok yang melingkupi papain yang berasal dari getah pepaya. Umumnya saat memakan kulit atau daging buah ara yang berwarna putih langsung dapat dirasakan sensasi terbakar atau gatal. Ini karena ficin dalam getah, terutama jika buah itu masih mentah (Liener dan Friedenson, 1970)

Buah kiwi mengandung sejumlah besar enzim actinidin proteolitik yang sangat aktif. Actinidin sangat ideal sebagai pelunak daging. Pada tingkat yang ditemukan dalam buah kiwi, kandungan actinidin tidak menjadi bahaya kesehatan utama bagi kebanyakan orang, tetapi telah dikaitkan dengan respons alergi terhadap buah Kiwi. Actinidin dapat menyebabkan kerusakan pada bibir (terutama di sudut mulut) tetapi hanya jika buah yang dimakan dalam jumlah yang sangat banyak (Ferguson dan Stanley, 2003).

Enzim proteolitik bromelain, ficin, dan actinidin tersebut dapat menjadi refrensi penelitian selanjutnya sehingga dapat dilakukan perbandingan kemampuan proteolitik dengan enzim papain sebagai terapi katarak kongenital dan senilis.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Diperoleh kesimpulan bahwa enzim zingibain yang berasal dari tanaman *Zingiber officinale* memiliki kemampuan membentuk ikatan terhadap protein P23T *crystalline* γ D dan protein β -*amyloid*

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

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menambahkan enzim yang berasal dari tanaman lain dan bersifat proteolitik. Penelitian laboratorium juga diperlukan untuk memastikan kemampuan proteolitik enzim Papain dalam berinteraksi dengan protein *crystalline* lensa mata.

DAFTAR PUSTAKA

- 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 affinity?. 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].
- 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 A 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, totalphenolics 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 affinity 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. TheClusPro 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*.
- 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* oori, 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 IGB1 protein, *Jurnal Biofisika*, Vol 10 (1) pp 59-64.

Shah M.A, S.M., A. Applewar, C. Patel, K. Patel. 2012. Oular 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, Mitsuhashi 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 Affinity: 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