

Uji *In Silico* Potensi Enzim Bromelain dan Enzim Actinidin Sebagai Proteolitik terhadap Protein Pembentuk Katarak

In Silico Test Potential of Bromelain and Actinidin Enzymes as Proteolytic against Cataract-forming Proteins

Elok Tiara Pratmawati¹, Nugraha Wahyu Cahyana², Zahrah Febianti^{3*}

¹ Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Jember

² Laboratorium Ilmu Kesehatan Mata, Fakultas Kedokteran, Universitas Jember

³ Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Jember

Article Info

Article History:

Received: June 18, 2021

Accepted: February 23, 2024

Published: June 24, 2024

*Corresponding author:

E-mail: zfebianti.fk@unej.ac.id

How to cite this article:

Pratmawati, ET., Cahyana, N.W., Febianti, Z. (2024). In Silico Test Potential of Bromelain and Actinidin Enzymes as Proteolytic against Cataract-forming Proteins. *Journal of Agromedicine and Medical Sciences*, 10 (2): 95-100

<https://doi.org/10.19184/ams.v10i1.25496>

Abstrak

Katarak adalah kekeruhan pada lensa mata yang menyebabkan gangguan penglihatan hingga terjadi kebutaan. Penyebab katarak multifaktorial, salah satunya disebabkan oleh agregasi protein *crystallin*, yaitu protein larut air yang mengisi 80% dari seluruh protein lensa. Agregasi protein *crystallin* dapat terjadi akibat beberapa mekanisme seperti terbentuknya amyloid fibril (terkait katarak senilis) dan mutasi P23T (terkait katarak kongenital). Saat ini, operasi merupakan satu-satunya tata laksana katarak yang tersedia. Meskipun merupakan tata laksana terbaik, operasi membutuhkan biaya yang tidak sedikit dan tidak bebas dari komplikasi. Oleh sebab itu, diperlukan alternatif tatalaksana terkait penyakit katarak seperti penggunaan bahan alam yang memiliki sifat proteolitik. Nanas mengandung enzim bromelain dan kiwi mengandung actinidin. Enzim tersebut merupakan protease yang dapat mendestabilisasi dan menghambat pembentukan agregat sehingga berpotensi melisis protein penyebab katarak. Untuk membuktikan potensi tersebut, dapat dilakukan suatu penelitian dengan uji *in silico* dengan metode *docking* menggunakan *ClusPro*. Hasil dari uji *in silico* ini adalah *binding energy*, yaitu energi yang dibutuhkan untuk membentuk suatu ikatan. *Binding energy* antara enzim bromelain dan enzim actinidin dengan protein mutasi P23T γ D-*crystalline* penyebab katarak kongenital secara berurutan yaitu -696,2 Kkal/mol dan -750,8 Kkal/mol. *Binding energy* antara enzim bromelain dan enzim actinidin dengan protein amyloid penyebab katarak senilis secara berurutan yaitu -685,0 Kkal/mol dan -682,3 Kkal/mol. Oleh karena itu, enzim bromelain memiliki kemampuan lebih baik dalam membentuk ikatan terhadap protein mutasi P23T γ D-*crystalline* sedangkan enzim actinidin memiliki kemampuan lebih baik dalam membentuk ikatan terhadap protein amyloid β .

Kata Kunci: *ClusPro, Molecular Docking, Binding energy, SwissModel*

Abstract

A cataract is the development of an opacity within the lens that can cause blindness. Cataracts are caused by the aggregation of crystallin proteins, which are water-soluble proteins that make up 80% of all lens proteins. Crystallin protein aggregation can occur due to several mechanisms such as the formation of amyloid fibrils (associated with senile cataract) and P23T mutations (associated with congenital cataracts). Currently, surgery is the only cataract treatment available. Although it is the best treatment, surgery requires high cost and is not free from complications. Therefore, alternative treatments for cataracts are needed, such as the use of natural ingredients that have proteolytic properties. Pineapple contains bromelain and kiwi contains actinidin. Both enzymes are protease which destabilize and inhibit the formation of aggregates. So that those enzymes can potentially lyse the protein causes cataracts. To prove the potency of the enzymes, we conducted an *in silico* study using *Cluspro docking* online program. We investigate the binding energy of each enzymes with the amyloid fibril and P23T mutation. The binding energy between bromelain and actinidine with P23T mutation protein respectively are -696.2 Kcal/mol and -750.8 Kcal/mol. The binding energy between Bromelain and Actinidin with amyloid protein are -685.0 Kcal/mol and -682.3 Kcal/mol respectively. Therefore, bromelain enzyme had a better ability to bind to the P23T D-crystallin mutation



This is an open-access article distributed under the term of the Creative Commons Attribution License

(<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work id properly credited

Pendahuluan

Katarak merupakan penyebab kebutaan terbanyak di dunia yaitu sebesar 34,47% diikuti oleh gangguan refraksi yang tidak terkoreksi, dan glaukoma. Di Indonesia, katarak yang tidak ditangani merupakan penyebab utama kebutaan dan gangguan pengelihatan tertinggi pada penduduk di atas 50 tahun, yaitu sebanyak 77,7% (Ismandari, 2018). Katarak disebabkan oleh agregasi protein *crystallin*, yaitu protein larut air yang mengisi 80% dari seluruh protein lensa (Slingsby & Wistow, 2014). Agregasi protein *crystallin* dapat terjadi akibat terbentuknya *amyloid fibril*. *Amyloid fibril* dapat terbentuk pada kondisi denaturasi seperti radiasi ultraviolet (UV). Radiasi UV dapat membuat endapan yang mengandung struktur *amyloid β -sheet* dan agregat amorf sehingga terbentuk katarak. Agregasi dari protein *crystallin* juga dapat terjadi akibat mutasi. Ada berbagai jenis mutasi pada gen *crystallin* salah satunya yaitu mutasi P23T. Mutasi tersebut menyebabkan perubahan asam amino secara dramatis, sehingga menurunkan kelarutan protein yang pada akhirnya menyebabkan agregasi protein. Mutasi P23T pada γ D- *crystallin* berkaitan dengan terbentuknya katarak kongenital (Alperstein et al., 2019; Ji et al., 2013). Saat ini, operasi merupakan satu-satunya tata laksana katarak yang tersedia. Meskipun merupakan tata laksana terbaik, operasi membutuhkan biaya yang tidak sedikit dan terdapat kekurangan fasilitas pada negara berkembang. Operasi katarak juga tidak bebas dari berbagai komplikasi intra maupun pasca operasi (Astari, 2018; Cahyana et al., 2020; Sreelakshmi & Abraham, 2016). Berdasarkan hal tersebut maka diperlukan alternatif tata laksana terkait penyakit katarak seperti penggunaan bahan alam yang memiliki sifat proteolitik yaitu nanas dan kiwi.

Nanas (*Ananas comosus*) mengandung enzim bromelain yang merupakan 95% campuran protease sistein, yang tahan terhadap proteolisis. Bromelain juga merupakan molekul kuat yang dapat mendestabilisasi agregat protein dan dapat menghambat pembentukan agregat tersebut dari keadaan monomer dan oligomer. Oleh sebab itu bromelain merupakan unsur dari nanas yang penting dan bermanfaat salah satunya dalam bidang farmasi (Das & Bhattacharyya, 2017; Martins et al., 2014; Setyawati & Yulihastuti, 2011). Kiwi merupakan salah satu tanaman tropis yang berasal dari daerah Shaanxi di dataran tiongkok dengan genus *Actinidia*. *Actinidia* terdiri dari banyak jenis, kurang lebih 75 spesies. Salah satu spesies utama yang telah dikembangkan yaitu *Actinidia chinensis* (Zamzami & Citrus, 2020). Penelitian menunjukkan bahwa *Actinidia chinensis* mengandung actinidin yang merupakan enzim protease kuat. Actinidin merupakan enzim yang dikategorikan sebagai protease sistein yang bersifat hidrolitik dan mengandung gugus sulfhidril bebas yang berperan penting dalam aktivitas katalisisnya (Homaei & Etemadipour, 2015; Kaur et al., 2010; Padmanabhan & Paliyath, 2015).

Enzim protease yang berasal dari tanaman nanas (bromelain) maupun kiwi (actinidin) memiliki efek proteolitik yang berpotensi melisiskan protein mutasi P23T γ D-*crystallin* dan protein *amyloid β* untuk menjadi tata laksana dari katarak. Untuk membuktikan potensi bahan dalam menimbulkan efek

yang diinginkan dapat dilakukan suatu penelitian. Salah satu metode penelitian yang dapat digunakan yaitu metode *In silico*. *In silico* dapat memprediksi efek biologis dari suatu bahan aktif melalui teknologi komputerisasi dengan tujuan untuk menemukan obat baru dengan waktu yang singkat dan biaya yang murah (Wadood et al., 2013). Pada penelitian sebelumnya, bromelain dengan kombinasi enzim papain dan ficin dapat secara signifikan melarutkan dan menyerap kekeruhan vitreous (Takeuchi et al., 2020). Namun, masih belum ada penelitian terkait enzim bromelain dan enzim actinidin terhadap protein mutasi P23T γ D-*crystallin* dan protein *amyloid β -sheet* yang menyebabkan katarak.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi Enzim Bromelain dan Enzim Actinidin sebagai proteolitik terhadap protein pembentuk katarak melalui uji *In Silico*.

Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan penelitian *insilico* berbasis komputer dengan menggunakan *software molecular docking*.

Pemodelan

Sekuens enzim bromelain diperoleh melalui situs <https://www.uniprot.org> dengan kode akses P14518. Sekuens protein tersebut digunakan untuk pemodelan enzim bromelain menggunakan SwissModel melalui situs <https://swissmodel.expasy.org/>. Kode Protein Data Bank (PDB) struktur enzim actinidin (1AEC), protein mutasi P23T γ D-*crystallin* (2KFB), dan protein *amyloid β* (2BP4) diperoleh melalui situs PDB <https://www.rcsb.org/>.

Molecular docking

Hasil pemodelan enzim bromelain dan kode PDB yang didapatkan digunakan untuk proses *molecular docking* menggunakan situs <https://cluspro.bu.edu/>. Struktur 3D enzim bromelain dan kode enzim actinidin dimasukkan pada kolom reseptor, sedangkan kode PDB P23T γ D-*crystallin* dan protein *amyloid β* dimasukkan pada kolom ligan.

Hasil dari *molecular docking* dianalisis dengan menampilkan *binding energy* (Kkal/mol). Nilai *binding energy* terendah menunjukkan semakin mudah terbentuk ikatan. Sehingga, nilai *binding energy* terendah yang akan digunakan.

Hasil Penelitian

Template yang digunakan untuk melakukan pemodelan homologi yaitu *template* dengan kode PDB 6u7d.1.A. Kualitas model yang dihasilkan oleh Swiss-Model dinilai oleh fungsi penilaian skor QMEAN. Hasil dari pemodelan enzim bromelain memiliki skor GMQE 0,92 dan skor QMEAN sebesar -0,15.

Pencarian *template* enzim Bromelain yang digunakan untuk melakukan pemodelan menggunakan BLAST dan HHblits pada SwissModel (Waterhouse et al., 2018). *Template* yang

digunakan untuk melakukan pemodelan homologi yaitu *template* dengan kode PDB 6u7d.1.A. Pemilihan *template* tersebut didasarkan pada *Global Model Quality Estimate* (GMQE). GMQE adalah estimasi kualitas yang menggambarkan gabungan dari keselarasan struktur target pemodelan dan struktur *template*. Skor GMQE yang dihasilkan dinyatakan dengan angka antara 0 dan 1. Angka yang lebih tinggi menunjukkan keakuratan yang lebih tinggi (Waterhouse et al., 2018). Skor GMQE dari pemodelan enzim bromelain menunjukkan skor 0,92 yang menandakan bahwa hasil pemodelan yang baik dan akurat.

Model dibentuk berdasarkan *template* dengan ProMod3 3.2.0. Koordinat yang dipertahankan antara target dan *template* disalin dari *template* ke model. Selanjutnya dilakukan insersi, delesi, dan pemodelan ulang (Studer et al., 2021).

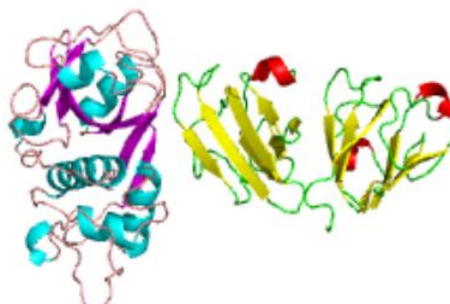
Kualitas model enzim bromelain yang dihasilkan oleh Swiss-Model dinilai oleh fungsi penilaian skor QMEAN. Skor QMEAN

adalah skor penilaian komposit yang menggambarkan aspek struktur geometris protein dan memberikan estimasi kualitas untuk seluruh struktur dan per residu berdasarkan satu model tunggal. Skor QMEAN sekitar nol menunjukkan kesesuaian yang baik antara struktur model dan struktur eksperimental dengan ukuran yang sama. Skor -4,0 atau lebih rendah merupakan indikasi model dengan kualitas rendah (Benkert et al., 2011). Hasil dari pemodelan enzim bromelain memiliki skor QMEAN sebesar -0,15 yang menunjukkan hasil dari pemodelan yang baik dan memiliki kesesuaian yang baik dengan struktur eksperimental dengan ukuran yang sama. Oleh sebab itu, hasil pemodelan tersebut dapat digunakan untuk *molecular docking*.

Nilai *binding energy* terendah setiap enzim terhadap target *docking* ditampilkan pada Tabel 1, serta bentuk model interaksi pengikatan antara enzim dengan protein target ditampilkan pada Gambar 1 – 4.

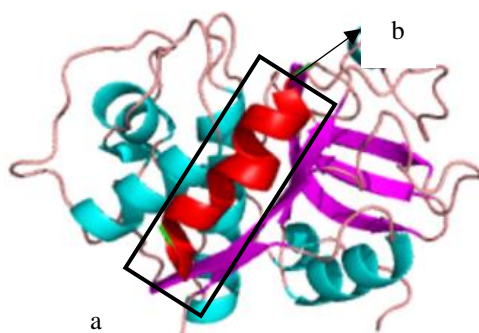
Tabel 1. Perbandingan nilai *binding energy* setiap enzim terhadap target docking

Target Docking	Enzim Bromelain	Enzim Actinidin
	Nilai <i>Binding Energy</i> (Kkal/mol)	Nilai <i>Binding Energy</i> (Kkal/mol)
Protein mutasi P23T γ D-crystallin	-696,2	-750,8
Protein <i>amyloid β</i>	-685,0	-682,3



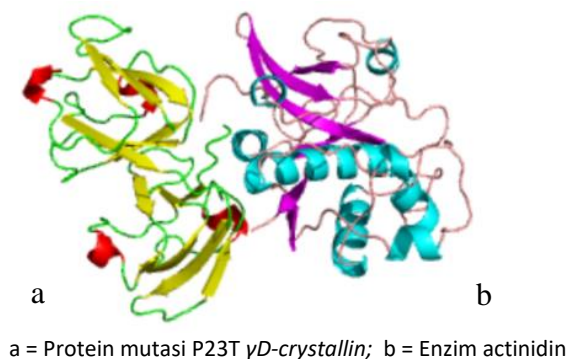
(a)= Enzim bromelain (b) = Protein mutasi P23T γ D-crystallin

Gambar 1. Model interaksi pengikatan terendah antara Enzim bromelain dan Protein mutasi P23T γ D-crystallin

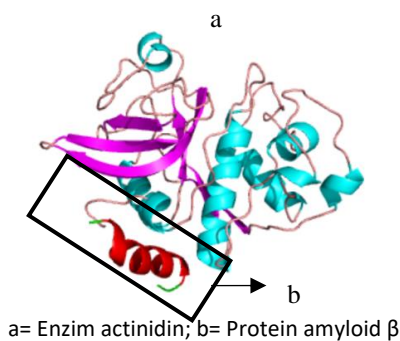


a = Enzim bromelain; b = protein *amyloid β*

Gambar 2. Model interaksi pengikatan terendah antara enzim bromelain dan protein *amyloid β*



Gambar 3. Model interaksi pengikatan terendah antara enzim actinidin dan protein mutasi P23T γ D-crystallin



Gambar 4. Model interaksi pengikatan terendah antara enzim actinidin dan protein amyloid β

Pembahasan

Katarak kongenital adalah kekeruhan pada lensa yang terdeteksi saat lahir atau segera setelah lahir dengan usia kurang dari satu tahun (Ilyas & Yulianti, 2017). Kelainan ini dapat terjadi karena berbagai sebab, antara lain gangguan metabolisme (galaktosemia), infeksi selama embriogenesis, cacat gen, dan kelainan kromosom (Santana & Waiswol, 2011). Salah satu mutasi yang dapat menimbulkan katarak kongenital adalah mutasi P23T pada γ D-crystallin. Mutasi P23T secara signifikan merubah asam amino dengan menurunkan kelarutan protein, sehingga dapat menyebabkan agregasi protein meskipun keseluruhan struktur pada dasarnya tidak berubah. Agregat ini dibentuk oleh peningkatan jumlah interaksi protein-protein hidrofobik (Pande, et al., 2010; Ji, et al., 2013).

Sementara itu, katarak senilis adalah katarak yang terjadi diatas 50 tahun dan merupakan 90% dari semua jenis katarak. Katarak senilis disebabkan oleh degenerasi pada protein crystallin lensa mata yang membentuk agregat. Selain itu, agregasi protein crystallin dapat terjadi akibat terbentuknya amyloid fibril (Moreau & King, 2012; Alpersteina, et al., 2019). Amyloid fibril adalah fibrosa abnormal yang dapat ditemukan di organ dan jaringan. Amyloid fibril terbentuk dari protein larut normal yang berkumpul untuk membentuk insoluble fibers yang resisten terhadap degradasi. Amyloid fibril sebagian besar tersusun atas struktur β -sheet dalam cross- β conformation (Ramarana & Serpel, 2008). Dalam penelitian ini, dilakukan peninjauan *binding energy* antara enzim bromelain dan enzim actinidin terhadap protein mutasi P23T γ D-crystallin dan protein amyloid β sebagai protein pembentuk katarak. Sifat proteolitik enzim bromelain dan enzim actinidin terhadap protein mutasi P23T γ D-crystallin berpotensi melisis protein penyebab agregasi. Selain itu, sifat

proteolitik enzim bromelain dan enzim actinidin berpotensi sebagai proteolitik terhadap protein amyloid β sehingga dapat mempertahankan homogenitas lensa dan mencegah terjadinya kerusakan protein crystallin penyusun struktur lensa mata. Oleh karena itu, enzim bromelain dan actinidin berpotensi digunakan sebagai terapi pada penyakit katarak senilis. Potensi enzim bromelain dan enzim actinidin dapat diprediksi melalui uji *in silico* dengan metode *molecular docking*. Analisis *docking* bertujuan untuk mengetahui interaksi antara protein ligan dan reseptor dan disajikan dalam bermacam-macam model interaksi. Interaksi ini didasarkan pada *binding energy*. *Binding energy* adalah energi yang dibutuhkan untuk membentuk suatu ikatan. Energi negatif menunjukkan selama proses pembentukan ikatan terjadi pelepasan energi ke lingkungan, sehingga *binding energy* paling rendah yang akan digunakan (Kozakov et al., 2017; Laily & Khoiri, 2016). Berdasarkan hasil yang telah disebutkan dalam Tabel 1, dapat diketahui bahwa enzim bromelain memiliki ikatan paling stabil atau *binding energy* paling rendah terhadap protein mutasi P23T γ D-crystallin sedangkan enzim actinidin memiliki ikatan paling stabil atau *binding energy* paling rendah terhadap protein amyloid β . Belum ada penelitian sebelumnya mengenai uji *in silico* enzim bromelain dan enzim actinidin terhadap protein pembentuk katarak, tetapi terdapat penelitian sebelumnya yang telah melakukan uji *in silico* enzim bromelain sebagai inhibitor terhadap protein *immediate early* (IE) pada Cytomegalovirus penyebab tumor otak. Protein IE1 dapat memodifikasi sel tumor otak sehingga sel tumor dapat tumbuh dengan lebih agresif dan menyebar dengan cepat melalui dua jalur utama, yaitu menghambat dua protein supresor tumor utama di dalam sel tumor otak dan meningkatkan pertumbuhan melalui jalur sinyal di dalam tumor. Hasil dari uji *in silico* pada penelitian tersebut didapatkan nilai *binding energy* antara enzim bromelain dan

protein IE1 sebesar -691,39 Kkal/mol (Agarwal & Verma, 2019). Perbedaan nilai *binding energy* tersebut disebabkan karena perbedaan struktur protein mutasi P23T γ D-*crystallin* dan protein *amyloid β* dengan protein IE1. Perbedaan struktur molekul dapat menyebabkan perbedaan jumlah ikatan hidrogen, interaksi elektrostatis, gaya hidrofobik, dan Van der Waals yang terbentuk sehingga akan mempengaruhi nilai *binding energy*. Selain itu, terdapat penelitian yang membandingkan kemampuan berbagai enzim protease tanaman untuk menghidrolisis protein pada daging. Dari berbagai enzim yang diteliti, enzim actinidin merupakan enzim yang paling efektif untuk menghidrolisis protein myofibril daging (Ha et al., 2012). Ada berbagai enzim proteolitik lain yang bersumber dari tanaman dan berpotensi sebagai terapi katarak senilis maupun kongenital. Enzim-enzim tersebut diantaranya papain, ficin, dan zingibain. Papain adalah enzim proteolitik yang terdapat dari tanaman pepaya. Papain merupakan proteinase sistein nonspesifik yang memiliki spesifisitas substrat yang luas. Enzim papain bersifat hidrolitik yang dapat meningkatkan pemecahan protein yang lebih besar menjadi fragmen yang lebih kecil yang dinamakan peptida dan asam amino (Mótyán et al., 2013; Takeuchi et al., 2020). Ficin adalah enzim yang berasal dari tanaman *Ficus carica*. Ficin termasuk dalam protease serine. Dalam bidang medis, ficin digunakan dalam produksi material jahit luka, dalam persiapan arteri hewan untuk implantasi, dan pada penggolongan darah. Ficin juga dapat menghancurkan dan membunuh protein cacing intestinal (Takeuchi et al., 2020). Zingibain adalah protease sistein yang ditemukan dalam jahe. Enzim ini banyak digunakan dalam industri makanan untuk pembuatan keju atau pelunakan daging. Enzim ini diketahui menunjukkan aktivitas antiproliferatif terhadap jamur dan sel ganas manusia (Gagaoua et al., 2015; Rajkumari & Sanatombi, 2018). Efek proteolitik dari enzim papain, ficin, dan zingibain tersebut dapat menjadi referensi penelitian selanjutnya. Dari penelitian tersebut dapat dilakukan perbandingan kemampuan proteolitik dengan enzim bromelain dan enzim actinidin sebagai tata laksana katarak kongenital dan senilis. Metode *in silico* menghasilkan prediksi model interaksi dan *binding energy* berdasarkan data eksperimental yang telah tersedia. Oleh sebab itu, hasil dari uji *in silico* merupakan prediksi secara statistik dan memerlukan validasi dengan metode penelitian lain seperti *in vivo* dan *in vitro* untuk membuktikan keakuratan prediksinya. Selain itu pada metode *in silico*, sisi aktif enzim digambarkan sebagai senyawa rigid yang tidak dapat mengubah bentuk sisi aktif enzim saat berikatan dengan ligannya, hal tersebut berbeda dengan kondisi sebenarnya. Metode *in silico* juga tidak memperhitungkan faktor suhu, pH, substrat, dan inhibitor yang mana hal tersebut mempengaruhi fungsi kerja enzim. Proses visualisasi dari hasil *molecular docking* ClusPro antara ligan dan reseptor tidak dapat memetakan pada tingkat jenis ikatan dan residu protein yang berinteraksi. Jenis ikatan yang dimaksud yaitu ikatan hidrogen, interaksi elektrostatis, gaya hidrofobik, dan Van der Waals. Proses visualisasi dari hasil *docking* ClusPro memerlukan perangkat lunak untuk dapat memetakan secara detail, namun dibutuhkan biaya yang lebih untuk melakukan hal tersebut.

Kesimpulan

Perbandingan nilai *binding energy* antara enzim bromelain dan enzim actinidin menunjukkan bahwa enzim bromelain memiliki kemampuan lebih baik dalam membentuk ikatan terhadap terhadap protein mutasi P23T γ D-*crystallin* yang berperan dalam potofisiologi terjadinya katarak kongenital sedangkan enzim actinidin memiliki kemampuan lebih baik dalam membentuk ikatan terhadap protein *amyloid β* yang berperan dalam patofisiologi katarak senilis. Oleh sebab itu, enzim bromelain potensial untuk dikembangkan sebagai tata laksana katarak kongenital dan enzim actinidin potensial untuk dikembangkan sebagai tata laksana katarak senilis. Perlu dilakukan penelitian laboratorium untuk memastikan kemampuan proteolitik enzim bromelain dalam berinteraksi dengan protein *amyloid β* dan enzim actinidin dalam berinteraksi dengan protein mutasi P23T γ D-*crystallin*. Selain itu, dapat juga dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menambahkan enzim proteolitik yang berasal dari tanaman lain.

Daftar Pustaka

- Agarwal, M., & Verma, A. (2019). In Silico Molecular Docking of Inhibitors Against Human Cytomegalovirus IE1 : Protein responsible for Brain Tumour. *Journal of Materials Science & Surface Engineering*, 6(6), 884–887.
- Alperstein, A. M., Ostrander, J. S., Zhang, T. O., & Zanni, M. T. (2019). Amyloid found in human cataracts with two-dimensional infrared spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(14), 6602–6607. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821534116>
- Astari, P. (2018). Katarak: Klasifikasi, Tatalaksana, dan Komplikasi Operasi. *CDK-269*, 45(10), 748–753.
- Benkert, P., Biasini, M., & Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3), 343–350. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>
- Cahyana, N., Widjanto, E., Kalsum, U., & Prayitnaningsi, S. (2020). Digital Repository Universitas Jember Effect of Isolate Catechin GMB4 in Expression of GRP8 and Tunnel Digital Repository Jember of Global Universitas Pharma Technology. *Journal of Global Pharma Technology*, 12(02), 335–343.
- Das, S., & Bhattacharyya, D. (2017). Bromelain from pineapple: Its stability and therapeutic potentials. *Tropical Fruits: From Cultivation to Consumption and Health Benefits, Pineapple*, October 2017, 43–100.
- Gagaoua, M., Hoggas, N., & Hafid, K. (2015). Three phase partitioning of zingibain, a milk-clotting enzyme from Zingiber officinale Roscoe rhizomes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 73(1), 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.069>
- Ha, M., Bekhit, A. E. D. A., Carne, A., & Hopkins, D. L. (2012). Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. *Food Chemistry*,

- Pratmawati *et al* 134(1), 95–105.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.071>
- Homaei, A., & Etemadipour, R. (2015). Improving the activity and stability of actinidin by immobilization on gold nanorods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1176–1181.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.029>
- Ilyas, H. S. & Yulianti, S. R. 2017. Ilmu Penyakit Mata. 5 penyunt. Jakarta: Badan Penerbit FK UI.
- Ismandari, F. (2018). Infodatin Situasi Gangguan Penglihatan. In *Kementrian Kesehatan RI Pusat Data dan Informasi*.
<https://pusdatin.kemkes.go.id/download.php?file=download/pusdatin/infodatin/infodatin-Gangguan-penglihatan-2018.pdf>
- Ji, F., Koharudin, L. M. I., Jung, J., & Gronenborn, A. M. (2013). Crystal structure of the cataract-causing P23T γ D-crystallin mutant. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 81(9), 1493–1498.
<https://doi.org/10.1002/prot.24321>
- Kaur, L., Rutherford, S. M., Moughan, P. J., Drummond, L., & Boland, M. J. (2010). Actinidin enhances gastric protein digestion as assessed using an in vitro gastric digestion model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 5068–5073. <https://doi.org/10.1021/jf903332a>
- Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., Beglov, D., & Vajda, S. (2017). The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature Protocols*, 12(2), 255–278.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169>
- Laily, A. N., & Khoiri, A. N. (2016). IDENTIFIKASI SENYAWA ANTIDIABETES SECARA in Silico PADA *Carica pubescens* Lenne & K. Koch. *El-Hayah*, 5(4), 135.
<https://doi.org/10.18860/elha.v5i4.3469>
- Martins, B. C., Rescolino, R., Freitas Coelho, D. de, Espindola, F. S., Zanchetta, B., Tambourgi, E. B., & Silveira, E. (2014). Studies of stability and characterization this enzyme bromelain in pineapple (*Ananas comosus*). *BMC Proceedings*, 8(S4), 6561.
<https://doi.org/10.1186/1753-6561-8-s4-p137>
- Mótyán, J., Tóth, F., & Tózsér, J. (2013). Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules*, 3(4), 923–942.
<https://doi.org/10.3390/biom3040923>
- Moreau, K. L. & King, J. A. 2012. Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention. *Trends in Molecular Medicine*. 18(5) : 273-282.
- Padmanabhan, P., & Paliyath, G. (2015). Kiwifruit. *Encyclopedia of Food and Health*, 490–494.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00409-8>
- Ji, F., Koharudin, L. M. I., Jung, J. & Gronenborn, A. M. 2013. Crystal structure of the cataract-causing P23T cD-crystallin mutant. *Protein*. 81 : 1493-1498.
- Pande, A. Ghosh, K. S. Priya, R. B. Jayanti, P. 2010. Increase in Surface Hydrophobicity of the Cataract-Associated P23T Mutant of Human γ D-Crystallin Is Responsible for Its Dramatically Lower, Retrograde Solubility. *Biochemistry*. 49(29) : 6122-6129
- Santana, A. & Waiswol, M. 2011. The genetic and molecular basis of congenital cataract. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 74(2) : 136-142
- Rambarana, R. N. & Serpel, L. C. 2008. Amyloid fibrils. *Prion*, 2(3) : 112-117.
- Rajkumari, S., & Sanatombi, K. (2018). *Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants*.
- Setyawati, I., & Yulihastuti, D. A. (2011). Penampilan Reproduksi dan Perkembangan Skeleton Fetus Mencit Setelah Pemberian Ekstrak Buah Nanas Muda. *Jurnal Veteriner*, 12(3), 192–199.
- Slingsby, C., & Wistow, G. J. (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.
<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.02.006>
- Sreelakshmi, V., & Abraham, A. (2016). Age Related or Senile Cataract: Pathology, Mechanism and Management. *Austin Journal of Clinical Ophthalmology*, 3(2), 1067.
- Studer, G., Tauriello, G., Bienert, S., Biasini, M., Johnner, N., & Schwede, T. (2021). ProMod3 - A versatile homology modelling toolbox. *PLoS Computational Biology*, 17(1), 1–18.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1008667>
- Takeuchi, M., Shieh, P. C., & Horng, C. T. (2020). Treatment of symptomatic vitreous opacities with pharmacologic vitreolysis using a mixture of bromelain, papain and ficin supplement. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(17). <https://doi.org/10.3390/app10175901>
- Wadood, A., Ahmed, N., Shah, L., Ahmad, A., Hassan, H., & Shams, S. (2013). In-silico drug design: An approach which revolutionarised the drug discovery process. *OA Drug Design and Delivery*, 1(1), 1–4.
<https://doi.org/10.13172/2054-4057-1-1-1119>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Zamzami, L., & Citrus, I. (2020). Kiwi (*Actinidia deliciosa*). In *INDO-HITS (Indonesian Horticultural Innovation, Technology and Science): Sumber Daya Genetik Tanaman Buah Subtropika Potensial* (Issue March, pp. 3–16).