



Pendugaan Peptida Bioaktif Cadangan Protein Koro Pedang Hasil Hidrolisis Protease Tubuh Melalui Pendekatan *In Silico*

[In Silico Approach of Bioactive Peptides Protein Storage from Jack Bean by Human Gastrointestinal System Proteases]

Marciano Oscar Maida¹⁾, Azis Boing Sitanggang^{2)*}, dan Slamet Budijanto²⁾

¹⁾ Program Studi Ilmu Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB University, Bogor, Indonesia

²⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB University, Bogor, Indonesia

Received October 11th 2024 / Revised August 21st 2025 / Accepted December 4th 2025

ABSTRACT

The jack bean plant (*Canavalia ensiformis* L.) contains storage proteins composed of essential amino acids, and the biological activity of these components occurs after a hydrolysis process. The hydrolysis of peptide bonds that appear in the digestive tract can be identified using an *in silico* approach that utilises a bioinformatics web page. This study aims to predict bioactive peptides resulting from the hydrolysis of storage proteins in the jack beans using a web-based *in silico* method. Based on literature studies, the jack bean's dominant storage proteins include canavalin, concanavalin A, and concanavalin B. The amino acid sequences of each type of protein were obtained from the Universal Protein Resource (UniProt) page. Simulations of hydrolysis or cleavage of peptide bonds in the body using Gastrointestinal System (GIS) enzymes, in the form of pepsin, trypsin, and chymotrypsin or a combination thereof, were carried out in the Expert Protein Analysis System (ExPASy) portal on the Peptide Cutter page. The bioactive peptides resulting from the cleavage were identified for their suitability based on the literature using the BIOPEP-UWM database. The simulation results indicate that all jack bean storage proteins possess biological properties, including antihypertensives, antidiabetics, and antioxidant effects. Concanavalin A produced the highest bioactive peptide yield of 82.89%, followed by concanavalin B at 64.23%, and canavalin at 48.95%. The estimation of bioactive peptides from jack bean storage proteins by hydrolysis of body proteases using an *in silico* approach proved helpful. It can be further applied to other protein sources using different enzyme combinations.

Keywords: bioactive peptides, *in silico*, jack bean, peptide cutter, protein storage

ABSTRAK

Tanaman koro pedang (*Canavalia ensiformis* L.) terdiri dari cadangan protein yang tersusun atas asam amino esensial, dan aktivitas biologis komponen-komponen ini terjadi setelah proses hidrolisis. Hidrolisis ikatan peptida yang terjadi di saluran cerna dapat diidentifikasi menggunakan pendekatan *in silico* yang memanfaatkan halaman web bioinformatika. Penelitian ini bertujuan menduga peptida bioaktif yang dihasilkan dari hidrolisis cadangan protein pada koro pedang menggunakan metode *in silico* berbasis laman web. Berdasarkan studi literatur, cadangan protein dominan pada koro pedang meliputi canavalin, concanavalin A, dan concanavalin B. Sekuen asam amino dari setiap jenis protein didapatkan dari laman *Universal Protein Resource* (UniProt). Simulasi hidrolisis atau pemotongan ikatan peptida dalam tubuh yang memanfaatkan enzim pencernaan (GIS), berupa pepsin, tripsin, dan kimotripsin maupun kombinasinya, dilakukan dalam portal *Expert Protein Analysis System* (ExPASy) laman *Peptide Cutter*. Peptida bioaktif hasil pemotongan diidentifikasi kesesuaiannya berdasarkan literatur dengan menggunakan pangkalan data BIOPEP-UWM. Hasil simulasi menunjukkan bahwa semua cadangan protein koro pedang memiliki kemampuan biologis, termasuk pengaruh antihipertensi, antidiabetes, dan antioksidan. Concanavalin A menghasilkan peptida bioaktif tertinggi sebesar 82,89%, diikuti concanavalin B sebesar 64,23%, dan canavalin sebesar 48,95%. Pendugaan peptida bioaktif dari protein penyimpan kacang koro dengan hidrolisis protease tubuh menggunakan pendekatan *in silico* terbukti bermanfaat. Pendekatan ini dapat diterapkan lebih luas pada sumber protein lain dengan menggunakan kombinasi enzim yang berbeda.

Kata kunci: cadangan protein, *in silico*, koro pedang, pemotongan protein, peptida bioaktif

*Penulis Korespondensi: E-mail: boing.lipan@apps.ipb.ac.id

PENDAHULUAN

Peptida bioaktif berperan sebagai modulator berbagai proses regulasi dalam tubuh dengan memberikan dampak positif (Sánchez dan Vázquez, 2017). Sumber peptida bioaktif telah banyak digunakan dalam produksi makanan fungsional, nutrasetikal, dan obat-obatan alami. Berdasarkan fungsinya, peptida bioaktif diklasifikasikan sebagai sumber antioksidan, antihipertensi, antidiabetik, anti-inflamasi, hingga efek imunomodulator (Chalamaiah *et al.*, 2019). Kemampuan peptida bioaktif dipengaruhi oleh jenis, komposisi, dan urutan asam amino peptida. Peptida bioaktif umumnya tersusun atas 2 hingga 20 asam amino yang dimurnikan dari hidrolisat yang diperoleh dengan hidrolisis protein. Prekursor protein melepaskan peptida bioaktif melalui pencernaan (enzim gastrointestinal), pengolahan makanan (pemasakan dan fermentasi), penyimpanan (pematangan), atau dengan hidrolisis *in vitro* enzim proteolitik (Rizello *et al.*, 2016).

Cadangan protein dapat menjadi jembatan pemanfaatan makromolekul tanaman untuk menghasilkan peptida bioaktif. Protein tumbuhan memiliki peranan penting dalam fase perkembangan tertentu, baik sebagai sumber pangan yang dikonsumsi maupun ingredien dalam bentuk konsentrat yang kemudian diakumulasikan sebagai cadangan asam amino untuk penyimpanan. Asam amino esensial yang terkumpul dalam cadangan protein ini memiliki kemampuan bioaktivitas yang mampu melengkapi kebutuhan tubuh. Cadangan protein (*storage*) utama pada kacang-kacangan diketahui dalam dua jenis, yaitu legumin (11S) dan vicilin (7S). Koro pedang (*Canavalia ensiformis* L.) juga memiliki cadangan protein berupa canavalin yang menunjukkan homologinya dengan cadangan protein kelompok 7S tanaman lainnya. Selain itu, protein globular berupa *lectin* seperti concanavalin A dan concanavalin B pada koro pedang juga dapat dihidrolisis menjadi beberapa peptida bioaktif yang bermanfaat bagi kesehatan manusia (Harvian *et al.*, 2019). Selain kandungan nutrisinya, budidaya dan produktivitas dari koro pedang jauh lebih besar dibandingkan tanaman kacang lainnya seperti kedelai (Saragih *et al.*, 2018). Sehingga dapat dilakukan eksplorasi nilai gizi koro pedang yang menjadikannya sebagai alternatif komplemen.

Gizi utama koro pedang berupa protein, mengindikasikan terikatnya peptida bioaktif bersama asam amino esensial yang tidak dapat diproduksi tubuh manusia (Puspitojati *et al.*, 2019). Pelepasan ikatan peptida dapat terjadi dalam saluran cerna dengan adanya hasil kerja enzim pencernaan (pepsin) dan enzim pankreas (tripsin, kimotripsin, karboksidasin aminopeptidase) (Nongonierma dan FitzGerald,

2015). Enzim-enzim protease dalam tubuh ini akan memecah protein secara acak dan menghasilkan potongan-potongan peptida yang beragam untuk diserap dan dimanfaatkan oleh tubuh. Memahami peran enzim gastrointestinal (GIS) juga sangat penting untuk menjaga pencernaan dan kesehatan tubuh secara keseluruhan. Penentuan hasil pemotongan peptida menjadi fragmen berukuran kecil dan dampaknya dapat diidentifikasi berdasarkan basis pangkalan data yang diperoleh secara komputerisasi.

Pendugaan peptida bioaktif dapat dilakukan secara *in vitro*, *in vivo*, dan *in silico*. Eksperimen pendekatan *in silico* (*computer-based*) menggunakan pemodelan atau simulasi komputer yang mengembangkan kemampuan komputasi dan kalkulasi dalam merancang dan mengidentifikasi berbagai senyawa secara spesifik dan efektif. Teknik *in silico* sering kali menjadi landasan awal (*sinergisme*) bagi suatu penelitian guna mengurangi biaya dan waktu kuantifikasi. Pendekatan *in silico* kini lebih rutin dan beragam dilakukan khususnya berkaitan dengan enzim makanan karena kinerja yang cepat dan potensi yang besar (Zhang *et al.*, 2020). Penggunaan teknik *in silico* dalam pemotongan protein di bidang pangan telah dilaporkan dalam mengkarakterisasi protein pada susu sapi (Sitanggang *et al.*, 2018), protein canavalin (Harvian *et al.* 2019), protein pada tempe kedelai (Tamam, 2020), hingga protein pada kedelai dan kefir (Fahri *et al.*, 2022). Namun, minim ditemukannya studi yang mengidentifikasi terkait peptida dengan bioaktivitas dari cadangan protein tumbuhan, khususnya yang terdapat pada kacang koro pedang dengan melibatkan kemampuan hidrolisis enzimatis (termasuk enzim GIS).

Identifikasi dan karakterisasi mengenai peptida bioaktif cadangan protein koro pedang dengan pendekatan *in silico* masih perlu dilakukan secara menyeluruh. Penelitian ini bertujuan menduga peptida bioaktif yang dihasilkan dari hidrolisis cadangan protein kacang koro pedang (*Canavalia ensiformis* L.) secara *in silico* dengan memanfaatkan basis laman *web* dan perangkat lunak. Simulasi hidrolisis protein dilakukan menggunakan enzim protease yang berasal dari gastrointestinal atau GIS (pepsin, tripsin, dan kimo-tripsin), serta dalam berbagai strategi kombinasi enzim (individu dan gabungan). Peptida hidrolisat disusun berdasarkan pemotongan, komposisi asam amino (AA), dan urutannya dibandingkan dengan rangkaian peptida bioaktif yang telah dilaporkan, sehingga protein koro pedang dapat ditabulasikan. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai protein koro pedang sebagai bahan fungsional di berbagai bidang makanan dan kesehatan.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan penelitian ini diperoleh melalui informasi elektronik dari berbagai literatur (Chalamaiah *et al.*, 2019; Daroit dan Brandelli, 2021; Duvaud *et al.*, 2021; Harvian *et al.*, 2019; Iwaniak *et al.*, 2024; Minkiewicz *et al.*, 2019; Nongonierma dan FitzGerald, 2015; Puspitojati *et al.*, 2019; Retnowati *et al.*, 2024; Sitanggang *et al.*, 2018; Tamam, 2020; Wijatnoko *et al.*, 2024) maupun situs bioinformatika pangkalan data BIOPEP-UWM (<https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>) (diakses pada Juli 2024) dan situs *universal Protein Resource* atau UniProt (<https://www.uniprot.org/>) (diakses pada Juli 2024) yang memberikan akses atas berbagai data protein ataupun proteomik.

Alur penelitian

Penelitian ini dibagi melalui beberapa tahapan utama, di antaranya yaitu: (1) identifikasi cadangan protein kacang koro pedang, (2) identifikasi dan tabulasi peptida bioaktif dari komposisi atau sekuen rangkaian asam amino yang dilaporkan pada pangkalan data, (3) identifikasi dan tabulasi komposisi asam amino dan sekuen cadangan protein kacang koro pedang dengan utilitas *Basic Local Alignment Search Tool* atau BLAST, (4) simulasi pemotongan protein sekuen dengan perangkat lunak *Peptide-Cutter* (https://web.expasy.org/peptide_cutter/), (5) penyusunan peptida hasil pemotongan, dan (6) perhitungan presentase kecocokan antara peptida hasil pemotongan dengan pangkalan data BIOPEP-UWM untuk didapatkan informasi peptida bioaktif kacang koro pedang *in silico* dalam tubuh. Informasi dikumpulkan dari berbagai hasil penelitian, studi pustaka, hingga pangkalan data, dan sebagian lagi diperoleh dari perhitungan dengan perangkat lunak.

Identifikasi sekuen dan komposisi AA dengan utilitas BLAST

Laman *Universal Protein Resource* atau UniProt (<http://www.uniprot.org/>) digunakan sebagai sumber informasi dalam identifikasi komposisi sumber asam amino dan sekuen dari cadangan protein koro pedang yang telah diperoleh (Zaru *et al.*, 2023). UniProt menyediakan kumpulan informasi fungsional protein terkini dan komprehensif untuk serangkaian urutan protein terpilih (The UniProt Consortium, 2023). Pengambilan *batch* entri dan pemetaan ID antara UniProt dan basis data eksternal dapat dibangun dengan utilitas BLAST (<https://www.uniprot.org/blast/>). BLAST atau *Basic Local Alignment Search Tool* dapat menemukan kesamaan antar sekuen untuk memprediksi hubungan fungsional yang juga membantu identifikasi bagian dari suatu gen.

Simulasi pemotongan protein sekuen dengan *PeptideCutter*

Pemotongan protein atau proteolisis dilakukan pada perangkat lunak *PeptideCutter* portal *Expert Protein Analysis System (ExPASy) Molecular Biology Server*. *PeptideCutter* digunakan memprediksi lokasi pemotongan protease dalam sekuen protein sehingga informasi protease pencernaan berguna dalam memisahkan domain protein hingga memastikan sensitivitas protein di protease endogen.

Simulasi pemotongan rangkaian asam amino dari protein koro pedang dilakukan menggunakan enzim proteolitik GIS, yakni pepsin (pH 1.3), tripsin, dan kimotripsin (spesifitas tinggi). Pemotongan dilakukan menggunakan berbagai kondisi pemotongan enzim, baik dengan satu (1) enzim, kombinasi dua (2) enzim, dan kombinasi tiga (3) enzim. Setiap protein dihidrolisis secara terpisah menggunakan tujuh kombinasi enzim: (i) pepsin, (ii) tripsin, (iii) kimotripsin, (iv) pepsin+tripsin, (v) pepsin+kimotripsin, (vi) tripsin+kimotripsin, dan (vii) pepsin+tripsin+kimotripsin.

Tabulasi peptida dan aktivitas biologis dengan basis BIOPEP-UWM

Penyusunan peptida hasil simulasi pemotongan dilakukan secara manual berdasarkan jumlah titik potong (*number of cleavages*) dan posisi pemotongan (*cleavage sites*) untuk setiap simulasi. Jumlah peptida, peptida bioaktif, dan persentase peptida bioaktif simulasi *PeptideCutter* diidentifikasi menggunakan basis data dari BIOPEP-UWM (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia>) (Minkiewicz *et al.*, 2019). Urutan protein terpilih, diperiksa bio-fungsionalitasnya melalui perintah "*profiles of potential biological activity*" di BIOPEP-UMW analysis dengan menginput setiap protein sekuen pada perintah "*for your sequence*". Pencocokan peptida hasil pemotongan protein terhadap pangkalan data peptida bioaktif dilakukan menggunakan fungsi *vlookup* dan *pivot* yang tersedia pada perangkat lunak *Microsoft Excel* (version 2021).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi sekuen dan komposisi asam amino cadangan protein koro pedang

Kacang koro pedang (*Canavalia ensiformis* L.) memiliki cadangan protein utama yang disebut canavalin dan concanavalin, protein kelompok globulin yang diperoleh dalam jumlah terbesar dari keseluruhan protein terlarut dalam koro pedang. Karakteristik dan komposisi asam amino dari setiap cadangan protein koro pedang dilakukan dengan penelusuran pada laman UniProt menggunakan utilitas BLAST. Canavalin yang merupakan cadangan protein utama dalam koro pedang diketahui memiliki 445 residu asam amino, concanavalin A dengan 290

asam amino, dan concanavalin B dengan 324 residu asam amino yang hampir sebagian besar masing-masing protein tersusun dari banyak residu leucine (Tabel 1).

Komposisi asam amino concanavalin A memungkinkan mengikat karbohidrat tertentu dengan sensitivitas tinggi dan spesifitas yang kuat terhadap glukosa (Zhou *et al.*, 2024). Concanavalin A dengan sistem berbasis afinitas sedang dapat mendeteksi glukosa darah dan melepaskan insulin sesuai perubahan kadar glukosa (Bai *et al.*, 2018). Komposisi asam amino concanavalin B yang lebih panjang memungkinkan pengikatan dan interaksi karbohidrat-protein dengan berbagai pengaruh proses seluler (Retnowati *et al.*, 2024). Komposisi asam amino canavalin memiliki bentuk fraksi vicilin yang dibelah

secara proteolitik (McPherson, 2020), terdiri dari residu hidrofobik yang memengaruhi fungsionalitas dengan campuran asam amino polar dan non-polar yang membantu stabilitas fungsinya (Tabel 2 dan Tabel 3).

Simulasi pemotongan protein koro pedang dan penyusunan sekuen peptida

Cadangan protein koro pedang memiliki peptida yang aktif setelah terhidrolisis, hal ini dapat disimulasikan secara *in silico* menggunakan basis laman *web* pada perangkat simulator *PeptideCutter* dari portal ExPASy. Enzim proteolitik GIS digunakan dalam pemotongan protein untuk menunjukkan bioaktivitas dalam pencernaan tubuh, berupa pepsin, tripsin, dan kimotripsin.

Tabel 1. Karakteristik komposisi asam amino (AA) protein koro pedang menggunakan utilitas BLAST pada laman UniProt

Table 1. Characteristics of amino acid (AA) composition from jack bean protein using BLAST utility on UniProt page

Jenis Protein (Type of Protein)	Kode, Status (Code, Status)	Komposisi AA* (Composition of AA)*	Berat Molekul (Da) (Molecular Weight (Da))	Jumlah AA** (Total of AA)**
Concanavalin A	P02866, ter-verifikasi (P02866, verified)	MAISKSSSLFLPIFTFITMLMVNVKVSSTHE TNALHFMFNQFSKQKDLILQGDTTGTGDN LELTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVHIWES SAVVASFEATFTFLIKSPDSDPADGIAFFISNID SSIPSGSTGRLLGLFPDANVIRNSTTIDFNAAAY NADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVR SKKTAKWNMQNGKVGTAHIIYNSVDKRLSAV VSYPNADSATVSYDVLNDNLPEWVRVGLSA STGLYKETNTILSWSTSKLKSNEIPDIATVV MGCERKALILMVWIWMSFWTLSLADISSTEIA VYWGQREDGLLRDTCKTNNYKIVFISFLDKFG CEIRKPELELEGVCGPSVGNPCSFLESQIKEC QRMGVKVFALGGPKGTYSACSADYAKDLAE YLHTYFLSERREGPLGKVALDGIHFDIQKPV ELNWDNLLEELYQIKDVYQSTFLLSAAPGCLS PDEYLDNAIQTRHFDYIFVRFYNDRSCQYSTG NIQRIRNAWLSWTKSVYPRDKNLFLELPASQA TAPGGGYIPPSALIGQVLPYLPDLQTRYAGIAL WNRQADKETGYSTNIIRYLNATAMPFTSNLLK YPS	31480.3672	290 AA
Concanavalin B	P49347, ter-verifikasi (P49347, verified)	MAISKSSSLFLPIFTFITMLMVNVKVSSTHE TNALHFMFNQFSKQKDLILQGDTTGTGDN LELTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVHIWES SAVVASFEATFTFLIKSPDSDPADGIAFFISNID SSIPSGSTGRLLGLFPDANVIRNSTTIDFNAAAY NADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVR SKKTAKWNMQNGKVGTAHIIYNSVDKRLSAV VSYPNADSATVSYDVLNDNLPEWVRVGLSA STGLYKETNTILSWSTSKLKSNEIPDIATVV MGCERKALILMVWIWMSFWTLSLADISSTEIA VYWGQREDGLLRDTCKTNNYKIVFISFLDKFG CEIRKPELELEGVCGPSVGNPCSFLESQIKEC QRMGVKVFALGGPKGTYSACSADYAKDLAE YLHTYFLSERREGPLGKVALDGIHFDIQKPV ELNWDNLLEELYQIKDVYQSTFLLSAAPGCLS PDEYLDNAIQTRHFDYIFVRFYNDRSCQYSTG NIQRIRNAWLSWTKSVYPRDKNLFLELPASQA TAPGGGYIPPSALIGQVLPYLPDLQTRYAGIAL WNRQADKETGYSTNIIRYLNATAMPFTSNLLK YPS	36727.9102	324 AA
Canavalin	P50477, ter-verifikasi (P50477, verified)	MAFSARFPLWLLGLVLLASVSASFHSGHS GGEAEDESEESRAQNNPYLFRSNKFLTLFKN QHGSRLRLQRFNEDTEKLENLRDYRVLEYCS KPNTLLPHHSDSDLLVLLEGQAILVLVNP GRDITYKLDQGDIAIKIAGTFYILINPDNNQNL RILKFAITFRPRTVEDFFLSSTKRLPSYLSAF SKNFLEASYDSPYDEIEQTLLQEEQEGVIVKM PKDQIQEISKHAQSSSRKTLSSQDKPFNLRSR DPIYSNNYGLYEITPEKNSQLRDLILLNCLQ MNEGALFVPHYNSRATVILVANEGRAEVELV GLEQQQQGLESMLRRYAATLSEGDIIIPS SFPVALKAASDLNMVGIGVNAENNERNFLAG HKENVIRQIPRQVSDLTTPGSGEEVEELLENQ KESYFVDGQPRHIDAGGKARRAHLPLNLFRTF Y	50326.5273	445 AA

Keterangan: *Penamaan AA (asam amino) berdasarkan sistem satu huruf, **Perhitungan berat molekul menggunakan perangkat lunak Protein Calculator v3.4 yang dibuat oleh The Scripps Research Institute, USA (<https://protecalc.sourceforge.net/>)

Note: *Entitle of AA (amino acids) is based on a single letter system, **Calculation of molecular weight using Protein Calculator v3.4 software made by The Scripps Research Institute, USA (<https://protecalc.sourceforge.net/>)

Tabel 2. Simulasi pemotongan canavalin dengan enzim pepsin (pH 1,3) dengan perangkat *PeptideCutter*
 Table 2. Simulation of canavalin cleavage with pepsin enzyme (pH 1.3) with *PeptideCutter*

Posisi Pemotongan (Position of Cleavage Site)	Sekuen Peptida Hasil Pemotongan (Resulting Peptide Sequence)	Panjang Peptida (Jumlah AA) (Peptide Length (Total of AA))	Berat Molekul (Da) (Peptide Mass (Da))
2	MA	2	220.287
7	SARF	4	479.536
10	PLW	3	414.505
16	GVV	3	273.332
24	ASVSAS	6	520.540
50	<u>AHSGHSGGEAEDESEESRAQNNPYL</u>	25	2671.646
55	RSNK	4	503.559
58	LT	2	232.280
67	KNQHGS	7	782.854
69	RL	2	287.362
73	LQRF	4	562.669
79	NEDTEK	6	734.718
82	EN	2	261.235
88	RDYRV	5	707.787
97	LEYCSKPNT	9	1054.183
100	LL	2	244.334
107	PHHSDSD	7	793.748
118	EGQAI	5	516.552
131	VNPDGRDTYK	10	1164.240
145	DQGDAIKIQAGTP	13	1313.430
147	FY	2	328.368
156	INPDNNQN	8	927.926
159	RI	2	287.362
161	LK	2	259.349
165	AIT	3	303.359
174	RRPGTVED	8	929.001
186	SSTKRLPSY	9	1038.169
189	SA	2	176.172
193	SKN	3	347.371
195	FL	2	278.351
209	<u>EASYDSPYDEIEQT</u>	14	1646.638
248	<u>QEEQEGVIVKMPKQIQEISKHAQSSSRKTLSSQDKP</u>	37	4195.672
250	FN	2	279.296
264	<u>RSRDPYISNNYGK</u>	13	1569.697
275	YEITPEKNSQ	10	1208.290
278	RD	2	289.291
281	LDI	3	359.423
285	NC	2	235.258
292	QMNEGA	6	648.689
305	FVPHYNSRATVI	12	1403.604
316	VANEGRAEVE	10	1073.128
319	VG	2	174.200
327	EQQQQQG	7	844.836
332	ESMQ	4	493.532
339	RRYAAT	6	736.829
352	SEGDIIVPSSF	12	1263.410
355	PVA	3	285.343
361	KAASD	5	490.514
377	<u>NMVGIGVNAENNERN</u>	15	1630.753
379	FL	2	278.351
396	<u>AGHKENVIRQIPRQVSD</u>	17	1947.184
399	TF	2	266.297
408	PGSGEEVEE	9	931.909
417	ENQKESY	7	896.909
437	<u>VDGQPRHIDAGGKARRAHL</u>	19	2054.302
440	PNL	3	342.395
443	RT	2	275.308
445	FY	2	328.368

Keterangan: Sekuen peptida yang digaris tebal menunjukkan peptida dengan sifat fungsional (berdasarkan basis data BIOPEP-UWM), sekuen peptida yang digaris bawah menunjukkan peptida dengan berat molekul di atas 1.500 Da (berdasarkan kalkulasi Protein Calculator v3.4)

Note: Bolded peptide sequences indicate peptides with functional properties (based on BIOPEP-UWM database), underlined peptide sequences indicate peptides with molecular weights above 1,500 Da (based on Protein Calculator v3.4 calculations)

Tabel 3. Penggolongan kepolaran rantai samping sekuen peptida hasil simulasi pemotongan canavalin dengan enzim pepsin (pH 1,3)

Table 3. Classification of side chain polarity of peptide sequences from simulation of canavalin cleavage with pepsin enzyme (pH 1.3)

Sekuen Peptida Hasil Pemotongan (Resulting Peptide Sequence)	Persentase AA (%)*** (Percentage of AA (%))***		Sifat Fungsional**** (Functional Properties)****
	Hidrofobik (Hydrophobic)	Hidrofilik (Hydrophilic)	
MA	100	0	DPP-IV inhibitor
SARF	50	50	-
PLW	100	0	ACE inhibitor
GVV	66.67	33.33	-
ASVSAS	50	50	-
AHSGHSGGEAEDESEESRAQNNPYL	20	80	-
RSNK	0	100	-
LT	50	50	Antioksidatif (Antioxidative); DPP-IV inhibitor; Hipourisemia (Hypouricemic)
KNQHGS	14.29	85.71	-
RL	50	50	ACE inhibitor; DPP-IV inhibitor
LQRF	50	50	-
NEDTEK	0	100	-
EN	0	100	-
RDYRV	20	80	-
LEYCSKPNT	22.22	77.78	-
LL	100	0	Rangsangan (Stimulating); DPP-IV inhibitor; Lactocypin inhibitor; Cytosol alanyl aminopeptidase inhibitor
PHHSDSD	14.29	85.71	-
EGQAI	40	60	-
VNPDGRDITYK	20	80	-
DQGDAIKIQAGTP	38.46	61.54	-
FY	50	50	Alpha-amylase inhibitor; ACE inhibitor; Antioksidatif (Antioxidative); Hipotensi (Hypotensive)
INPDNNQN	25	75	-
RI	50	50	DPP-IV inhibitor
LK	50	50	Antioksidatif (Antioxidative);
AIT	66.67	33.33	-
RRPGTVED	25	75	-
SSTKRLPSY	22.22	77.78	-
SA	50	50	-
SKN	0	100	-
FL	100	0	ACE inhibitor; Neuropeptida (Neuropeptide); DPP-IV inhibitor; DPP-III inhibitor
EASYDSPYDEIEQT	21.43	78.57	-
QEEQEGVIVKMPKDQIQEISKHAQSSSRKTLSSQDKP	27.03	72.97	-
FN	50.00	50	DPP-IV inhibitor
RSRDPYSNNYGK	15.38	84.62	-
YEITPEKNSQ	20.00	80	-
RD	0.00	100	-
LDI	66.67	33.33	-

Sekuen Peptida Hasil Pemotongan (Resulting Peptide Sequence)	Persentase AA (%)*** (Percentage of AA (%))***		Sifat Fungsional**** (Functional Properties)****
	Hidrofobik (Hydrophobic)	Hidrofilik (Hydrophilic)	
NC	0	100	-
QMNEGA	33.33	66.67	-
FVPHYNSRATVI	50	50	-
VANEGRAEVE	40	60	-
VG	50	50	ACE inhibitor; DPP-IV inhibitor
EQQQQQG	0	100	-
ESMQ	25	75	-
RRYAAT	33.33	66.67	-
SEGDIIVIPSSF	50	50	-
PVA	100	0	-
KAASD	40	60	-
NMVGIGVNAENNERN	33.33	66.67	-
FL	100	0	ACE inhibitor; Neuropeptida (Neuropeptide); DPP-IV inhibitor; DPP-III inhibitor
AGHKENVIRQIPRQVSD	35.29	64.71	-
TF	50	50	ACE inhibitor; Hipotensi (Hypotensive); DPP-IV inhibitor; DPP-III inhibitor; Renin inhibitor; Penghambat lipase pankreas (Pancreatic lipase inhibitor)
PGSGEEVEE	22.22	77.78	-
ENQKESY	0	100	-
VDGQPRHIDAGGKARRAHL	36.84	63.16	-
PNL	66.67	33.33	-
RT	0	100	-
FY	50	50	Alpha-amylase inhibitor; ACE inhibitor; Antioksidatif (Antioxidative); Hipotensi (Hypotensive)

Keterangan: Rantai samping sekuen peptida yang diwarna-merah menunjukkan asam amino dengan sifat hidrofobik, ***Perhitungan persentase kepolaran AA menggunakan perangkat lunak Peptide Synthesis yang dibuat oleh Peptide 2.0 Inc., USA (<http://www.peptide2.com/>), ****Aktivitas peptida dengan sifat fungsional (berdasarkan basis data BIOPEP-UWM)

Note: Red-colored side chains of the peptide sequence indicate amino acids with hydrophobic properties, ***Calculation of AA polarity percentage using Peptide Synthesis software made by Peptide 2.0 Inc., USA (<http://www.peptide2.com/>), ****Peptide activity with functional properties (based on the BIOPEP-UWM database)

Berdasarkan Gambar 1, pemotongan protein dilakukan menggunakan tujuh (7) kombinasi enzim pemotong (individu dan gabungan) secara terpisah, sehingga didapatkan 21 simulasi pemotongan (tiga jenis protein dan tujuh jenis kombinasi enzim). Penggambaran informasi hasil pemotongan dapat terlihat pada Tabel 2, menunjukkan simulasi pemotongan protein canavalin dengan enzim pepsin (pH 1,3). Simulasi menghasilkan informasi umum yang terdiri dari posisi pemotongan, sekuen peptida hasil pemotongan, jumlah AA, dan berat molekul dari

setiap simulasi ketujuh kombinasi jenis enzim yang digunakan.

Pemotongan protein menjadi gugusan fragmen atau fraksi ini menghasilkan peptida bioaktif dengan efek positif bagi tubuh (El-Sayed *et al.*, 2020). Hasil simulasi pemotongan protein didapatkan berupa polipeptida, oligopeptida, dipeptida, hingga asam amino bebas (Tabel 3). Gambar 2 menunjukkan jumlah sekuen fragmen hasil pemotongan protein untuk setiap kombinasi enzim yang digunakan. Jumlah peptida yang dihasilkan berbanding lurus dengan berat molekul dari protein yang dipotong. Dari

ketiga protein terpilih, canavalin memiliki berat molekul terbesar yaitu 50326,53 Da (Tabel 1) yang juga menghasilkan total fragmen terbesar dengan ketujuh kombinasi enzim sebesar 721 sekuen fragmen. Sedangkan concanavalin A dengan berat molekul terkecil (31480,37 Da) memiliki jumlah fragmen terkecil berkisar 370 sekuen fragmen.

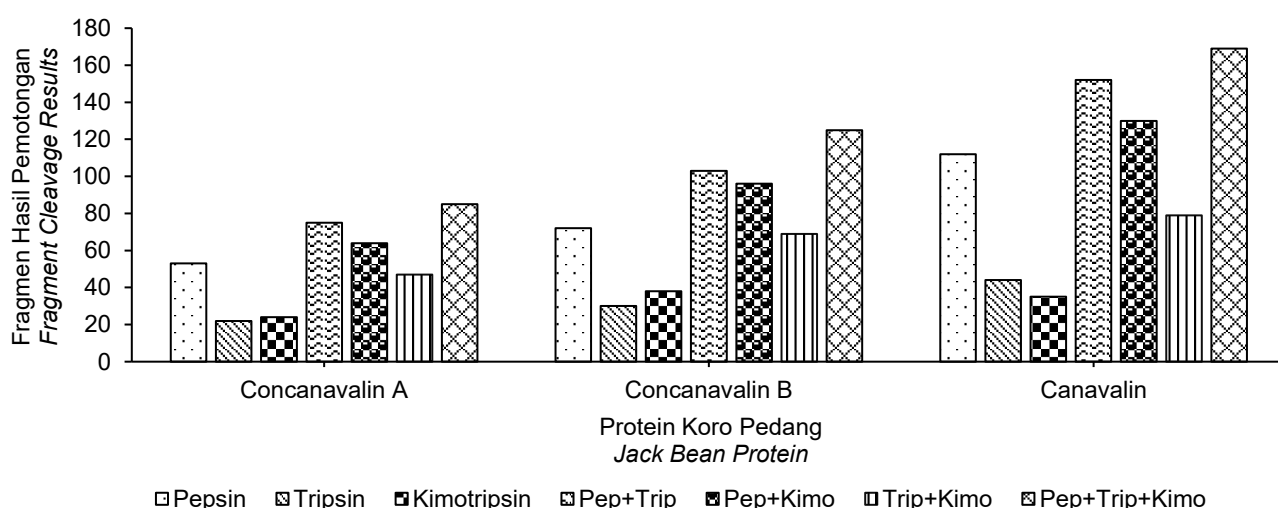
Penyusunan peptida-peptida dilakukan berdasarkan huruf pertama kombinasi AA, sehingga memudahkan pencarian aktivitas biologi melalui pangkalan data. Fragmen peptida kemudian dianalisis lanjut kesesuaian urutan dan komposisi AA terhadap fragmen peptida bioaktif yang diperoleh dari basis data BIOPEP-UWM (Iwaniak *et al.*, 2024). Pada Tabel 2 terdapat 445 kemungkinan fragmen peptida canavalin hasil pemotongan enzim pepsin (pH 1.3), yang sebagian besar memiliki berat molekul lebih kecil dari 1500 Da (93,75%) dan 12 peptida di antaranya berupa peptida bioaktif.

Peptida hasil pemotongan protein koro pedang dengan aktivitas biologis

Peptida hasil pemotongan ditabulasikan menggunakan fungsi *vlookup* dan *pivot* yang terdapat pada perangkat lunak *Microsoft Excel* untuk mendapatkan informasi peptida bioaktif dari cadangan protein koro pedang dengan kombinasi enzim yang digunakan. Peptida bioaktif yang ditunjukkan oleh Gambar 3 dan Gambar 4 memiliki variasi dalam jumlah berdasarkan kombinasi enzim pemotongnya. Kombinasi enzim simulasi tidak selalu memberikan jumlah peptida bioaktif tertinggi. Hidrolisis protein canavalin dengan menggunakan kombinasi tiga enzim (pepsin+tripsin+kimotripsin) menghasilkan 11 peptida bioaktif, sedangkan hidrolisis dengan pepsin saja dapat menghasilkan 12 peptida bioaktif. Selain itu, hidrolisis

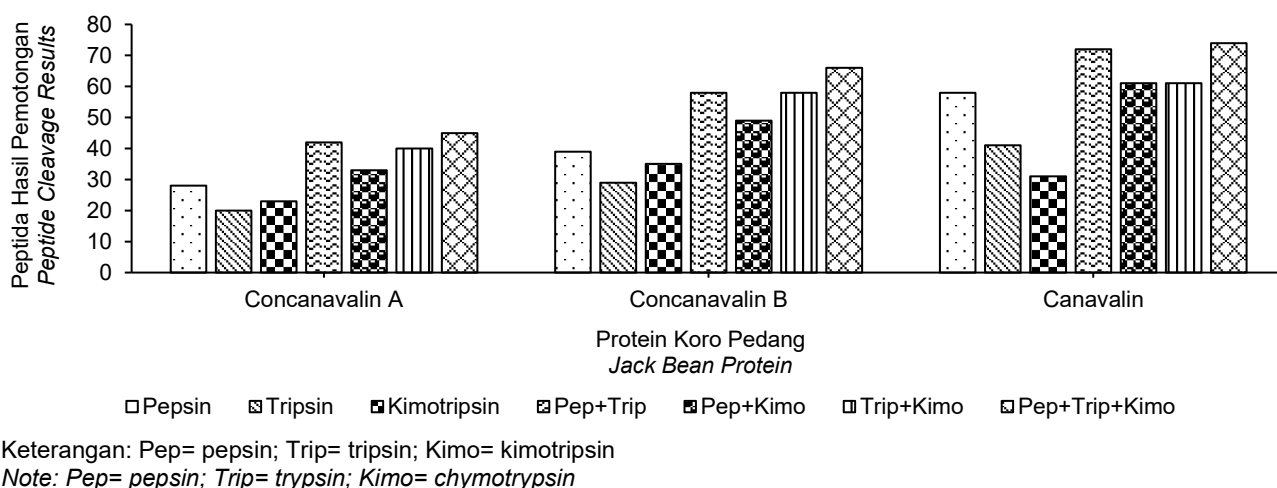
dengan kombinasi tiga enzim pada protein concanavalin A yang memiliki berat molekul terendah (31480,37 Da) apabila dibandingkan protein canavalin dengan berat molekul tertinggi (50326,53 Da) juga sama-sama memiliki jumlah peptida bioaktif sebanyak 11. Sementara hidrolisis protein concanavalin B menghasilkan peptida bioaktif tertinggi sejumlah 13 (dengan kombinasi tiga enzim) dan juga peptida bioaktif terendah sejumlah 1 (dengan enzim tripsin), diikuti canavalin dengan 1 peptida bioaktif untuk masing-masing hidrolisis dengan tripsin dan kimotripsin.

Enzim gastrointestinal (GIS) seperti pepsin, tripsin, dan kimotripsin diproduksi oleh tubuh dan bekerja sebagai katalis dalam pemecahan protein menjadi peptida dan asam amino kecil. Pepsin sangat efisien pada pH rendah sesuai dengan karakteristiknya yang bekerja di lambung, sementara tripsin dan kimotripsin bekerja di usus halus sehingga lebih aktif pada pH netral. Tergolong sebagai kelompok endopeptidase yang memecah protein secara acak pada bagian tengah (dalam) rantai molekul berdasarkan jenis asam amino atau yang berdekatan dengan situs pemotongan enzim, umumnya menghasilkan asam amino spesifik dengan jumlah terbatas (Witono *et al.*, 2020). Pepsin memotong ikatan peptida setelah AA hidrofobik pada pH rendah (Fu *et al.*, 2021), tripsin memotong ikatan peptida setelah AA lisin dan arginin pada polipeptida terminal C (Zhang dan Zhu, 2024), sementara kimotripsin memotong ikatan peptida setelah AA hidrofobik aromatik bermolekul besar seperti tirosin, triptofan, ataupun fenilalanin (Vreeke *et al.*, 2023). Perbedaan spesifitas inilah yang mengakibatkan hidrolisis cadangan protein koro pedang menjadi beragam dan berbeda.

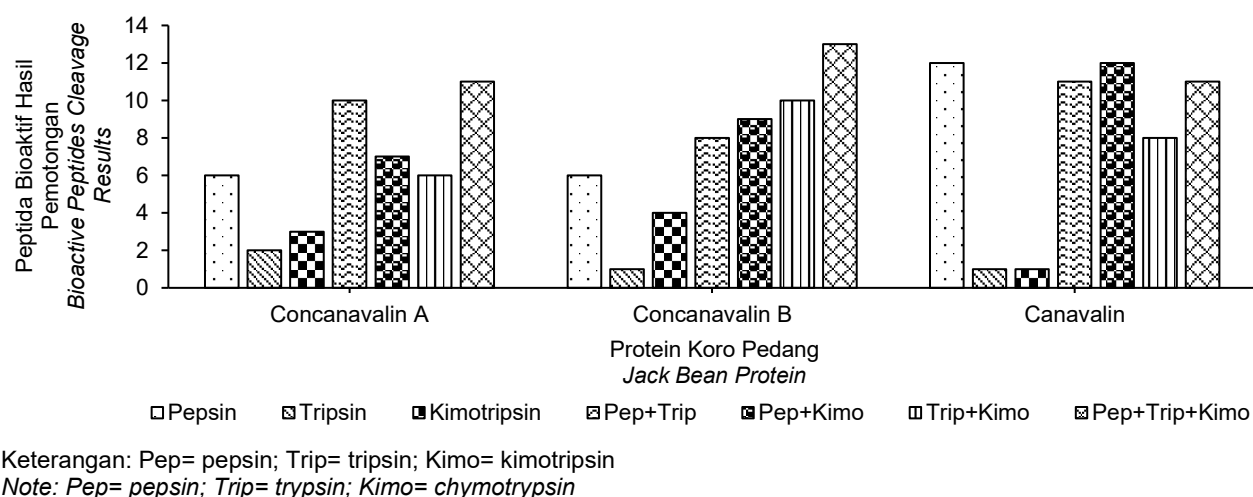


Keterangan: Pep= pepsin; Trip= tripsin; Kimo= kimotripsin
 Note: *Pep= pepsin; Trip= trypsin; Kimo= chymotrypsin*

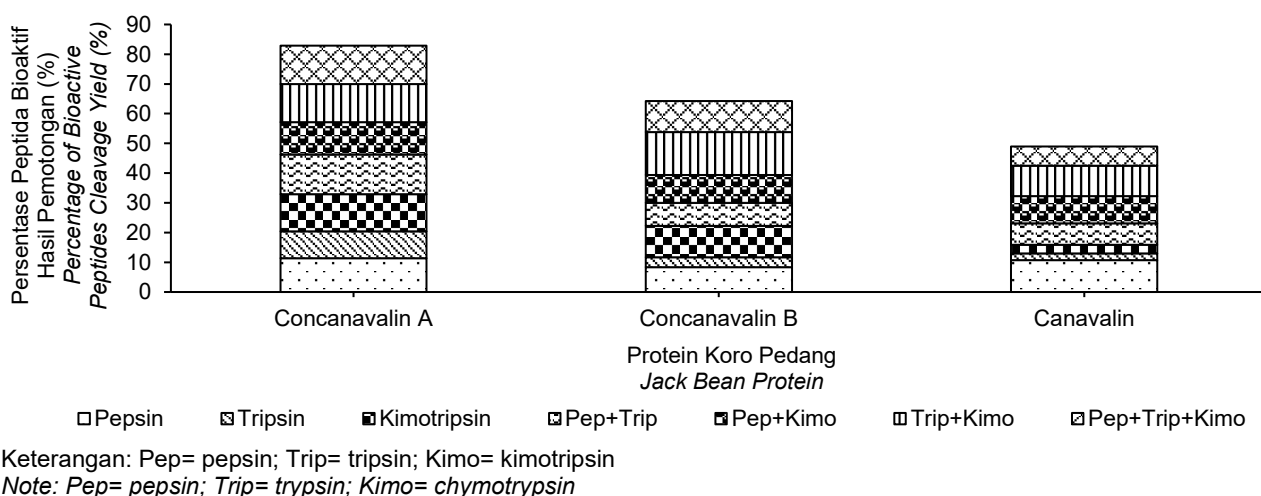
Gambar 1. Jumlah fragmen dari hasil pemotongan protein koro pedang dengan enzim pencernaan GIS
 Figure 1. Number of fragments from the cleavage of jack bean protein with GIS digestion enzyme



Gambar 2. Jumlah peptida dari hasil pemotongan protein koro pedang dengan enzim GIS
Figure 2. Number of peptides from the cleavage of jack bean protein with GIS enzyme



Gambar 3. Jumlah peptida bioaktif dari hasil pemotongan protein koro pedang dengan enzim GIS
Figure 3. Number of bioactive peptides from the cleavage of jack bean protein with GIS enzyme



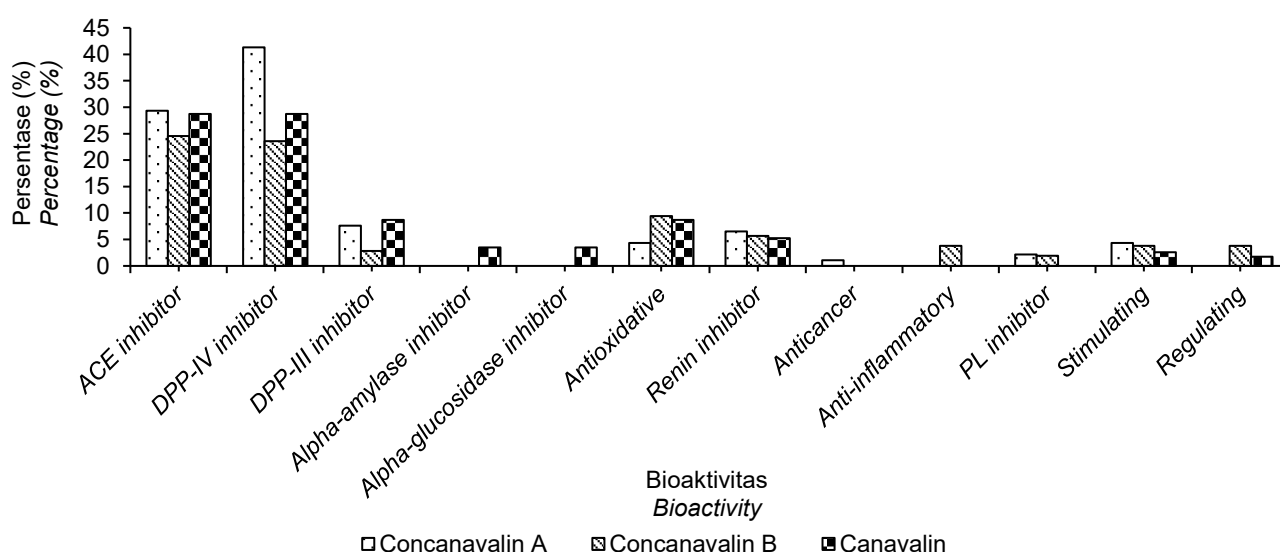
Gambar 4. Persentase peptida bioaktif hasil pemotongan protein koro pedang
Figure 4. Percentage of bioactive peptides from the cleavage of jack bean protein

Peptida bioaktif ditabulasikan menggunakan fungsi *vlookup* dan *pivot* dari perangkat lunak *Microsoft Excel*, maka diperoleh persentase peptida bioaktif hasil pemotongan dari berbagai protein menggunakan berbagai kombinasi enzim. Secara persentase (Gambar 5), dengan menggunakan ketujuh kombinasi enzim pemotong menghasilkan peptida bioaktif tertinggi pada protein concanavalin A sebesar 82,89%, diikuti concanavalin B sebesar 64,23%, dan canavalin sebesar 48,95%. Peptida dengan sifat fungsional yang dihasilkan dari pemotongan berbentuk dipeptida dan tripeptida, seperti pada concanavalin A terdapat *Met-Phe* dan *Val-Arg* yang memiliki bioaktivitas ganda sebagai ACE dan DPP-IV inhibitor, serta *Val-Gly-Leu* (DPP-IV inhibitor) dan *Pro-Glu-Trp* (antioksidatif), pada concanavalin B terdapat *Ile-Arg* (antioksidatif dan DPP-IV inhibitor), *Val-Arg-Phe* (ACE inhibitor), *Leu-Ser-Trp* (ACE Inhibitor dan antioksidatif), dan *Ile-Val-Phe* (ACE inhibitor), serta pada canavalin terdapat *Val-Gly* (ACE dan DPP-IV inhibitor), *Thr-Phe* (ACE, DPP-III, dan DPP-IV Inhibitor), *Pro-Leu-Trp* (ACE Inhibitor), *Arg-Asp-Tyr* (Antioksidatif), dan *Asn-Leu-Arg* (ACE Inhibitor). Rekapitulasi peptida bioaktif yang didapat-kan dari hasil komputasi (Tabel 2), kemudian dicocokkan potensinya berdasarkan database BIOPEP-UWM (data potensi seluruh peptida tidak dapat ditampilkan).

Potensi koro pedang diuji lebih luas akan sifat fungsional dan aktivitas biologis peptidanya sebagai antioksidan, antidiabetes, antihipertensi, imuno-modulator, antimikroba, antikanker, dan bioaktivitas relevan lainnya dalam penghambatan enzim spesifik (Daroit dan Brandelli, 2021). Frekuensi kemunculan peptida bioaktif untuk setiap jenis bioaktivitas dapat dilihat pada Gambar 6. Basis data BIOPEP-UWM berisi 48 kelas utama aktivitas biologis peptida,

dengan 12 kelas di antaranya ditemukan dalam urutan protein koro pedang yang dianalisis. Nilai yang relatif rendah menunjukkan bahwa jumlah peptida dengan aktivitas biologis yang diketahui dalam jumlah sedikit di protein koro pedang. Semua jenis protein koro pedang diketahui dapat menjadi sumber antihipertensi, antioksidan, dan antidiabetes. Hal ini sejalan dengan beberapa literatur, yang menyebutkan bahwa canavalin, concanavalin A, dan concanavalin B memiliki peptida bioaktif sebagai antioksidan dan penghambatan *angiotensin I-converting enzyme* (ACE), yang mampu menurunkan hipertensi dan bertindak sebagai antioksidan (Harvian *et al.*, 2019). Concanavalin khususnya concanavalin B memiliki aktivitas antioksidan dan penurunan lipid, serta penghambat *dipeptidyl peptidase IV* (DPP-IV) dan ACE (Maldonado-Torres *et al.*, 2021). Begitupun pelepasan peptida *anti-inflammatory* yang diduga pada concanavalin B (Wijatnoko *et al.*, 2024).

Hasil penelitian *in silico* ini dapat digunakan sebagai informasi dasar untuk pelaksanaan studi *in vitro*, *in vivo*, maupun uji aktivitas lanjutan secara *in silico* untuk mendukung penentuan aktivitas peptida bioaktif yang dapat ditemukan dalam cadangan protein koro pedang. Keterbatasan model dalam penelitian ini adalah belum mencakup seluruh interaksi molekuler yang relevan dengan aktivitas biologis peptida, sehingga perlu ditindaklanjuti melalui pemodelan yang lebih komprehensif. Analisis variabilitas dan bioaktivitas yang diperoleh juga dapat menjadi acuan agar studi lanjutan dapat dilakukan lebih efisien, baik dari segi waktu maupun biaya. Strategi kombinasi studi *in silico* diikuti studi *in vitro* dan *in vivo* telah banyak digunakan sebagai eksplorasi komponen bioaktif yang berasal dari alam serta pengaplikasiannya pada pangan.



Gambar 5. Persentase bioaktivitas protein koro pedang hasil hidrolisis enzim GIS
Figure 5. Percentage of bioactivity jack bean proteins with GIS enzyme hydrolysis

KESIMPULAN

Pendugaan peptida bioaktif cadangan protein koro pedang secara *in silico* dengan hidrolisis protease tubuh berupa enzim GIS (pepsin, tripsin, dan kimotripsin) dapat dengan mudah dilakukan menggunakan pemanfaatan laman web UniProt utilitas BLAST, basis pangkalan data BIOPEP-UWM, serta perangkat lunak *PeptideCutter* pada ExPASy dan fungsi *Microsoft Excel*. Hasil simulasi semua jenis protein koro pedang terpilih (concanavalin A, concanavalin B, dan canavalin) dapat menjadi sumber peptida bioaktif yang memiliki aktivitas antihipertensi, antidiabetes, dan antioksidan. Berdasarkan proteolisis *in silico*, concanavalin A memiliki kemampuan bioaktivitas tertinggi, diikuti concanavalin B, dan canavalin. Jumlah dan aktivitas peptida hasil pemotongan secara *in silico* dapat saja menampilkan perbedaan atas dasar jenis, jumlah, dan kombinasi enzim yang digunakan. Hasil penelitian ini diharapkan dapat diverifikasi secara *in vitro* maupun *in vivo* sebagai informasi tambahan yang menunjukkan potensi cadangan protein koro pedang sebagai sumber peptida bioaktif.

DAFTAR PUSTAKA

- Bai, M., He, J., Kang, L., Nie, J., & Yin, R. (2018). Regulated basal and bolus insulin release from glucose-responsive core-shell microspheres based on concanavalin A-sugar affinity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 889–899. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.030>
- Chalamaiah, M., Ulug, S. K., Hong, H., & Wu, J. (2019). Regulatory requirements of bioactive peptides (protein hydrolysates) from food proteins. *Journal of Functional Foods*, 58, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.050>
- Daroit, D. J., & Brandelli, A. (2021). *In vivo* bioactivities of food protein-derived peptides – a current review. *Current Opinion in Food Science*, 39, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.01.002>
- Duvaud, S., Gabella, C., Lisacek, F., Stockinger, H., Ioannidis, V., & Durinx, C. (2021). Expasy, the Swiss bioinformatics resource portal, as designed by its users. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W216–W227. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab225>
- El-Sayed, H. S., Salama, H. H., & Edris, A. E. (2020). Survival of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 in spray dried functional yogurt powder during processing and storage. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 19(7), 461–467. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2020.08.003>
- Fahri, M. I., Sherlyna, F., & Nurcholis, M. (2022). *In silico* analysis of protein of milk, soybean, and kefir as anti-thrombotic bioactive peptide. *HAYATI Journal of Biosciences*, 30(2), 216–223. <https://doi.org/10.4308/hjb.30.2.216-223>
- Fu, Z., Akula, S., Thorpe, M., & Hellman, L. (2021). Marked difference in efficiency of the digestive enzymes pepsin, trypsin, chymotrypsin, and pancreatic elastase to cleave tightly folded proteins. *Biological Chemistry*, 402(7), 861–867. <https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0386>
- Harvian, Z. A., Ningrum, A., Anggrahini, S., & Setyaningsih, W. (2019). *In silico* approach in evaluation of jack bean (*Canavalia ensiformis*) canavalin protein as precursors of bioactive peptides with dual antioxidant and angiotensin I-converting enzyme inhibitor. *Materials Science Forum*, 948, 85–94. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.948.85>
- Iwaniak, A., Minkiewicz, P., & Darewicz, M. (2024). BIOPEP-UWM database – present and future. *Current Opinion in Food Science*, 55, 101108. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2023.101108>
- Maldonado-Torres, D. A., Jara-Romero, G. J., Rosas-Cárdenas, F. F., Fernández-Velasco, D. A., & Luna-Suárez, S. (2021). Engineering concanavalin B to release bioactive peptides against metabolic syndrome. *Foods*, 10(7), 1554. <https://doi.org/10.3390/foods10071554>
- McPherson, A. (2020). Binding of benzoic acid and anions within the cupin domains of the vicilin protein canavalin from jack bean (*Canavalia ensiformis*): Crystal structures. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 524(1), 268–271. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.101>
- Minkiewicz, P., Iwaniak, A., & Darewicz, M. (2019). BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: Current opportunities. *International Journal of Molecular Science*, 20(23), 5978. <https://doi.org/10.3390/ijms20235978>
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2015). Bioactive properties of milk proteins in humans: A review. *Peptides*, 73, 20–34. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.08.009>
- Puspitojati, E., Cahyanto, M. N., Marsono, Y., & Indrati, R. (2019). Production of Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) inhibitory peptides during the fermentation of jack bean (*Canavalia ensiformis*) tempe. *Pakistan Journal of Nutrition*, 18(5), 464–470. <https://doi.org/10.3923/pjn.2019.464.470>

- Retnowati, R. D., Nuryady, M. M., Purwanti, E., Wahyuni, S., & Hindun, I. (2024). Immunostimulating effect of jackbean flour on non-specific immunity of mice *in vitro* and *in silico*. *Green and Tropical Laboratory for Sustainability*, 1(1), 19–25. <https://doi.org/10.22219/gtlabs.v1i1.36289>
- Rizello, C. G., Tagliazucchi, D., Babini, E., Rutella, G. S., Saa, D. L. T., & Gianotti, A. (2016). Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. *Journal of Functional Foods*, 27, 549–569. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.09.023>
- Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1(1), 29–46. <https://doi.org/10.1093/fqs/fyx006>
- Saragih, M. P., Suharsi, T. K., & Qadir, A. (2018). Pertumbuhan dan pembungaan tanaman koro pedang (*Canavalia ensiformis*) pada kondisi ternaungi dan kombinasi pemupukan berbeda. *Buletin Agrohorti*, 6(3), 382–387. <https://doi.org/10.29244/agrob.v6i3.21106>
- Sitanggang, A. B., Sudarsono, S., & Syah, D. (2018). Pendugaan peptida bioaktif dari susu terhidrolisis oleh protease tubuh dengan teknik *in silico*. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 29(1), 93–101. <https://doi.org/10.6066/jtip.2018.29.1.93>
- Tamam, B. (2020). Peptida bioaktif pada tempe, serta perannya bagi kesehatan. PT Penerbit Nuha Medika, Yogyakarta, 75–93.
- The UniProt Consortium. (2023). UniProt: The universal protein knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
- Vreeke, G. J. C., Vincken J. P., & Wierenga, P. A. (2023). The path of proteolysis by bovine chymotrypsin. *Food Research International*, 165, 112485. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112485>
- Wijatnoko, B. D., Yamamoto, Y., Hirayama, M., & Suzuki, T. (2024). Identification and molecular mechanism of anti-inflammatory peptides isolated from jack bean protein hydrolysates: *in vitro* studies with human intestinal Caco-2BBE cells. *Plant Foods for Human Nutrition*, 79, 624–631. <https://doi.org/10.1007/s11130-024-01201-x>
- Witono, Y., Maryanto, M., Taruna, I., Masahid, A. D., Cahyaningati, K. (2020). Aktivitas antioksidan hidrolisat protein ikan wader (*Rasbora jacobsoni*) dari hidrolisis oleh enzim calotropin dan papain. *Jurnal Agroteknologi*, 14(1), 44–57.
- Zaru, R., Orchard, S., & The UniProt Consortium. (2023). UniProt tools: BLAST, align, peptide search and ID mapping. *Current Protocols*, 3(3), e697. <https://doi.org/10.1002/cpz1.697>
- Zhang, G., & Zhu, T. F. (2024). Mirror-image trypsin digestion and sequencing of D-proteins. *Nature Chemistry*, 16, 592–598. <https://doi.org/10.1038/s41557-023-01411-x>
- Zhang, Y., Aryee, A. N. A., & Simpson, B. K. (2020). Current role of *in silico* approaches for food enzymes. *Current Opinion in Food Science*, 31, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.11.003>
- Zhou, J., Ma, H., Guan, M., Feng, J., Dong, X., Wei, Y., & Zhang, T. (2024). Anti-inflammatory Fucoidan-ConA oral insulin nanosystems for smart blood glucose regulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 659, 124250. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124250>