

	Vol. 2 No. 1 Mei 2022
	Halaman : 19 – 31
	e-ISSN : 2809 - 9796

Pemodelan *Calponin* Ikan Gabus (*Channa striata*) dengan Phyre² dan Interaksi dengan Protein Lain

Mirza Maulana Ahmad, Noer Komari*

¹Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru, Indonesia

*e-mail korespondensi: nkomari@ulm.ac.id

Submitted: 21 Desember 2021; Accepted: 9 April 2022

ABSTRACT – Knowledge of the three-dimensional structure of proteins is very important to understand their character and function at the molecular level. Determination of protein structure in the laboratory is expensive and relatively difficult because it requires sophisticated instruments and takes a long time. As an alternative, an in silico approach can be used to predict the three-dimensional structure of proteins, namely the *fold recognition* method. The purpose of this study was to create a three-dimensional structure model of snakehead fish (*Channa striata*) *calponin* protein using the Phyre2 *web server*. The target protein sequence was obtained from UniProt KB with code K9LH64. The results of the study showed that the template for building the model was the c1wynA code. The results of the model (MP) evaluation obtained a coverage value was 45%, a confidence value was 100%, and an identity value was 69%. Validation of the model (MP) using the PROCHECK program showed the model was in the most favoured residue plot of 82.4%. This model deserves to be used as a model for *calponin* protein of snakehead fish, because the disallowed area was below 15%. The results of the analysis of interactions with other proteins using STRING-DB obtained the interaction model (MP) with Actin assembly-inducing protein (ACTA2) was 0.791; and Tropomyosin (TPM1) was 0.786. The results of molecular docking using PatchDock obtained the value of Atomic Contact Energy (ACE) for the *calponin* protein model (MP)-ACTA2 was 372.76 kJ/mol; *Calponin* model protein (MP)-TPM1 was 406.93 kJ/mol. The interactions that occurred in the *calponin* model (MP)-ACTA2 were hydrogen bonds at residues Gly-41, Glu-60, Arg-64, Arg-66, Pro-67, Gly-68, Lys-71 and hydrophobic bonds at Arg-64, Lys-71, Lys-72, Ile-73, Val-138. The interactions model of *calponin* model (MP)-TPM1 were hydrogen bonding at residues Ser-13, Lys-71, Ala-95, Tyr-96, Ser-136, Arg-137, Arg-150 and hydrophobic bonds at residues Leu-12, Ala-14, Lys-71, Ala-95, Val-138, Arg-150, Phe-152.

KEYWORD: Fold Recognition; Phyre²; 3D Structure Protein; Calponin; Protein Interaction

PENDAHULUAN

Kajian bioinformatika berkembang karena kemajuan teknis perangkat keras dan perangkat lunak komputasi, serta media penyimpanan yang cepat dengan kapasitas tinggi. (Ayyildiz & Piazza, 2019). Kontribusi bioinformatika untuk memprediksi fungsi protein dari urutan menuju struktur adalah memperkirakan model protein yang efektif. Metode homologi atau komparatif adalah metode paling mudah dengan memprediksi struktur protein yang tidak diketahui menggunakan protein homolog berupa template dengan struktur tiga dimensi (3D) yang diselesaikan secara eksperimental (Sotriffer, 2016).

Selain metode homologi ada metode lain yaitu *fold recognition* atau metode pelipatan residu asam amino (Komari et al., 2020).

Pengetahuan tentang struktur tiga dimensi (3D) protein sangat penting untuk memahami karakter dan fungsinya pada tingkat molekuler. Prosedur dan instrumentasi penentuan struktur protein di laboratorium besar dan relatif sulit karena memerlukan instrumen yang canggih, dan waktu penelitian lama. Berdasarkan *database* RCSB:PDB pada oktober 2021, jumlah protein yang telah didapatkan struktur tiga dimensinya secara laboratorium sebanyak 182.840. Jumlah ini sangat sedikit dibandingkan dengan data sekuen protein yang telah diketahui dan disimpan dalam *server database* UniProt. *Database* UniProt pada oktober tahun 2021, jumlah sekuen protein yang disimpan sebanyak 441.163.776. Penelitian penentuan sekuen protein lebih cepat dibandingkan dengan penentuan struktur tiga dimensi protein (Wijaya & Hasanah, 2016). Sebagai alternatif, maka beberapa pendekatan *in silico* dapat digunakan untuk memprediksi struktur tiga dimensi protein. Metode yang digunakan ada dua yaitu, metode *fold recognition/threading* dan metode homologi.

Penelitian ini akan berfokus pada identifikasi dan analisis protein *calponin* pada ikan gabus (*Channa striata*). *Calponin* adalah protein yang berperan penting dalam mengikat kalsium. *Calponin* terkait filamen tipis yang terlibat dalam regulasi dan modulasi kontraksi otot polos yang mampu mengikat aktin, calmodulin dan tropomiosin. Interaksi *calponin* dengan aktin menghambat aktivitas actomiosin Mg-ATPase (Vanaraja et al. 2011). Penelitian Islam et al. (2014) menunjukkan bahwa *calponin* memiliki potensi dalam perkembangan dan prognosis kanker, selain itu perannya juga dalam mengatur proliferasi sel, migrasi, dan pembentukan pembuluh darah. Protein *calponin* pada ikan gabus merupakan protein yang penting karena fungsinya sebagai pengikat pada otot polos dan non-polos, serta berpotensi sebagai anti kanker. Penelitian tentang *calponin* masih terbatas karena belum ditemukan struktur tiga dimensinya dan sifat fisikokimia masih kurang dikaji oleh peneliti, sehingga penelitian ini akan mengkaji pemodelan protein *calponin* ikan Gabus (*Channa striata*) menggunakan *web server* Phyre². Penelitian ini diharapkan mendapatkan model protein *calponin* ikan gabus untuk kajian atau penelitian lanjutan yang terkait, misalnya mekanisme molecular protein, docking molecular, dan virtual screening terkait dengan *calponin*.

METODE PENELITIAN

Pemilihan Sekuen Protein Target

Sekuen protein target *calponin* dari ikan gabus (*Channa striata*) didapat dari *database* UniProt KB (<https://www.UniProt.org/>) dengan kode K9LH64. Sekuen protein hasil pencarian dilihat apakah ada atau tidaknya struktur 3D pada Protein Data Bank (RSCB PDB). Sekuen protein yang dipilih disimpan dalam format FASTA untuk analisis lanjutan.

Analisis Protein Target

Analisis protein target dilakukan pada *web server* ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). Analisis dilakukan untuk mengetahui sifat fisika dan kimia protein target.

Identifikasi Template dan Pemodelan Protein

Identifikasi template dan pemodelan dilakukan pada *web server* Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~Phyre2/html/page.cgi?id=index>). Sekuen protein target dalam format FASTA di submit ke *web server* Phyre² untuk identifikasi template dan model yang didapatkan. Template yang dihasilkan akan dipilih berdasarkan nilai confidence >90%.

Evaluasi Model

Evaluasi model dilakukan pada web server Phyre² setelah proses identifikasi template dan pemodelan protein selesai. Hasil pemodelan dapat dilihat link hasil (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/Phyre2/Phyre2output/3c6cf8d1cf7deeb7/summary.html>). Model dengan nilai parameter tertinggi dipilih dan dievaluasi. Parameter evaluasi model antara lain *quality model* dan *function model*. Parameter *quality model* yaitu: ProQ2 *quality assessment*, *clashes*, *rotamers*, *Ramachandran analysis*, *alignment confidence* dan *disorder*. Parameter *function model*, yaitu *conservation*, *pocket detection* dan *mutational sensitivity*.

Validasi Model

Validasi model menggunakan program PROCHECK pada *web server* SAVESv6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>). File model yang dipilih pada *web server* Phyre² yang kemudian diunduh dalam format .pdb dan di-submit pada *web server* SAVESv6.0. Parameter validasi model protein antara lain *Ramachandran plot*, *chi1-chi2 plot*, *side-chain params* dan *residue properties*.

Interaksi Protein-protein

Interaksi protein-protein dianalisis menggunakan *web server* STRING-DB, yang merupakan *database* berbasis *web* yang mengumpulkan dan menggabungkan interaksi fisik (interaksi langsung) dan fungsional (interaksi tidak langsung) pada protein-ke-protein (https://string-db.org/cgi/input?sessionId=b8KHqPS9gM7T&input_page_show_search=on). Interaksi-interaksi ini bisa didapatkan dengan mencantumkan nama protein target dan diklik *search*, maka akan didapatkan hasil interaksinya. Hasil interaksi bisa diskriminasi dengan cara kolom minimum *required interaction score* ditingkatkan menjadi high confidence (0,700). Hasil interaksi pada STRING-DB akan digunakan acuan untuk docking molekul protein-protein.

Molecular Docking

Proses *docking* molekular dilakukan dengan PatchDock (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/php.php>) untuk menghitung dan memprediksi kemungkinan interaksi *calponin* (CNN) dengan *actin-2* (ACTA2) dan *Tropomyosin-1* (TPM1). Protein *actin-2* (ACTA2) dan *Tropomyosin-1* (TPM1) didapat dari interaksi protein-protein pada STRING-DB. Protein model *calponin* sebagai protein *receptor* dan protein *actin-2* (ACTA2) dan *Tropomyosin-1* (TPM1) sebagai protein *ligand*. Langkah yang dilakukan adalah dengan memasukkan *file .pdb receptor molecule* dengan protein model *calponin* dan memasukkan *file .pdb ligand molecule* dengan protein *actin-2* pada PDB (6F1T_Chain H) atau model AlphaFold dengan kode P62736 (ACTA2_ *Homo sapiens*) dengan clustering RMSD 4.0. Program akan berjalan dengan klik Submit Form. Hal ini dilakukan juga pada *calponin* dengan *Tropomyosin-1* pada PDB (2Z5I_Chain I) atau model AlphaFold dengan kode P09493 (TPM1_ *Homo Sapiens*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemilihan Sekuen Protein

Protein yang digunakan adalah protein *calponin* pada ikan gabus (*Channa striata*) yang sekuen proteinnya telah diketahui, tetapi struktur 3D-nya belum diketahui. Hasil pencarian target protein pada *database* UniProt dengan memasukkan kata kunci "*calponin*" dengan pilihan organisme pada kolom other organisms "*Channa striata*". Hasil yang didapatkan adalah satu protein *calponin* (diakses pada tanggal 25 Agustus 2021). Sekuen target protein yang dipilih mempunyai kode UniProt K9LH64. Protein tersebut mempunyai panjang residu asam amino 317. Data Protein dipublikasikan oleh UniProt pada Juni 2011 oleh Vanaraja et al. Format FASTA sekuen protein *calponin* disajikan dalam Gambar 1. Data sekuen protein tersebut yang digunakan untuk pembuatan model struktur 3D protein menggunakan *website* Phyre².

```
>tr|K9LH64|K9LH64_CHASR Calponin OS=Channa striata OX=64152 PE=2 SV=1
MASFNKGPAYGLSAEVKNKIAQKYDPQKEEDLRIWIEEITGQKIGPDFQKGLKNGVILCE
LINRLRPGSVKKNQSSLNWHQLENLTNFIKAITAYGLKPHDIFEANDLFESGNTQVQT
TLLALAGMAKTKGCQSRVDIGVKYSRQERMFDEEKMAGQCVIGLQMGTKNCASQAGMN
SYGTRRHLYAPKVQIQPPMDNTTISLQMGTKNGASQAGMTAPGTRRAIYDQKLGTDKCDN
STMSLQMGYSQGANQSGQNFGLGRQIYDAKYCPKAEGVEGEHNGAGGARDYIQDYQDEGY
QGYQEEEQTYQDDGTDY
```

Gambar 1. Sekuen protein *calponin* pada ikan gabus (*Channa striata*) format FASTA

Analisis Protein Target

Analisis protein bertujuan mengetahui sifat kimia dan fisika protein target. Analisis protein menggunakan *web server* ProtParam tools. Hasil analisis ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Sifat fisika dan kimia protein target (*calponin*)

Parameter	Nilai
Rumus kimia	C ₁₅₁₇ H ₂₃₉₀ N ₄₃₄ O ₄₉₁ S ₁₈
Jumlah asam amino	317
Berat molekul	35141,36
Titik isoelektrik (pI)	6,15
Waktu paruh	30 jam (<i>retikulosit mamalia, in vitro</i>) >20 jam (<i>ragi, in vivo</i>) >10 jam (<i>bakteri Escherichia coli (in vivo)</i>)
<i>Instability index</i> (II)	39,94 (stabil)
<i>Alipathic indeks</i>	62,24
<i>Grand average of hydropathicity</i> (GRAVY)	-0,764

Tabel 1 memberikan informasi mengenai jumlah asam amino yang ada pada protein target yaitu sebesar 317; berat molekul 35141,36; dengan rumus kimia C₁₅₁₇H₂₃₉₀N₄₃₄O₄₉₁S₁₈. Nilai titik isoelektriknya (pI) sebesar 6,15. Titik isoelektrik (pI) merupakan nilai pH di mana muatan keseluruhan dari kelompok bermuatan positif dan negatif mencapai stabilitas (sehingga muatan total asam amino adalah nol). Protein bermuatan negatif jika pH di atas titik isoelektrik, dan bermuatan positif jika pH di bawah titik isoelektrik (Thenawidjaja et al., 2017). Waktu paruh protein target pada mamalia retikulosit secara *in vitro* selama 30 jam, pada ragi secara *in vivo* >20 jam, dan pada bakteri *Escherichia coli* secara *in vivo* >10 jam. Waktu paruh adalah perkiraan berapa lama waktu yang diperlukan setengah dari total protein sel untuk menghilang setelah disintesis (Walker, 2002).

Instability Index (II) atau disebut dengan indeks kestabilan pada protein target sebesar 39,94. Indeks kestabilan merupakan ukuran protein yang dapat memperkirakan kestabilan suatu protein. Protein yang memiliki nilai indeks kestabilannya lebih kecil dari 40, maka diprediksi stabil, sebaliknya jika lebih besar dari 40 maka diprediksi tidak stabil (Guruprasad et al., 1990). Berdasarkan data yang didapatkan menunjukkan bahwa protein target merupakan protein yang stabil. Kestabilan yang didapatkan akan mempengaruhi proses pembentukan struktur tiga dimensi (3D) protein target. *Alipathic index* yang didapatkan sebesar 62,24. *Alipathic index* merupakan volume relatif yang diisi oleh asam amino (alanin, valin, isoleusin, dan leusin) yang memiliki rantai samping alifatik dan dapat dianggap sebagai faktor penting untuk peningkatan termostabilitas protein globular (Ikai, 1980). Nilai hidrofobisitas peptida diwakili oleh rata-rata besar indeks hidropatisitas (GRAVY), yang dihitung sebagai jumlah nilai hidropati semua asam amino dibagi dengan panjang urutan. Nilai hidropati dari (Kyte & Doolittle, 1982) digunakan untuk menghitung GRAVY. Nilai GRAVY positif menyiratkan

perilaku hidrofobik, sedangkan yang negatif menunjukkan perilaku hidrofilik. Nilai GRAVY yang didapatkan oleh protein target sebesar -0,764. Nilai ini menunjukkan bahwa protein target bersifat hidrofilik. Nilai GRAVY berpengaruh pada proses pelipatan suatu asam amino dalam pembentukan struktur tersiernya. Protein dengan banyak residu asam amino hidrofilik sulit untuk dilipat menjadi struktur tersier yang sesuai. Berikut komposisi asam amino pada protein *calponin* ikan gabus dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi asam amino pada protein calponin ikan gabus

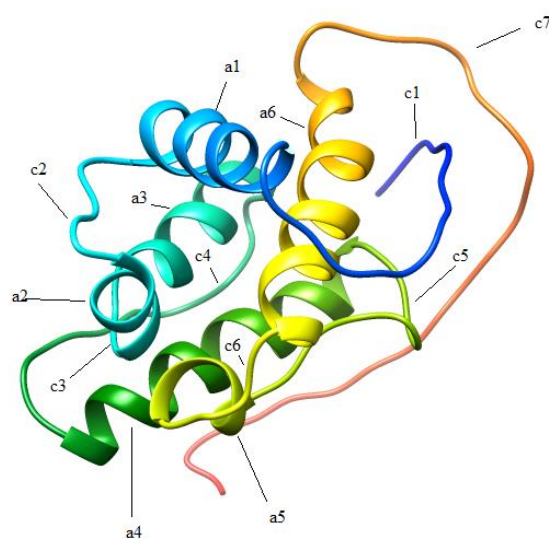
Asam amino	Simbol satu huruf	Simbol tiga huruf	Komposisi Asam amino	Presentase
Glycine	G	Gly	35	11.0%
Glutamine	Q	Gln	29	9.1%
Lysine	K	Lys	24	7.6%
Alanine	A	Ala	23	7.3%
Leucine	L	Leu	20	6.3%
Aspartate	D	Asp	19	6.0%
Glutamate	E	Glu	19	6.0%
Asparagine	N	Asn	18	5.7%
Isoleucine	I	Ile	18	5.7%
Threonine	T	Thr	18	5.7%

Tabel 2 menunjukkan komposisi asam amino yang paling tinggi adalah Glisin (Gly) sebanyak 35 (11%), Glutamin (Gln) sebanyak 29 (9,1%), Lisin (Lys) sebanyak 24 (7,6%), Alanin (Ala) sebanyak 23 (7,3%), Leusin (Leu) sebanyak 20 (6,3%), Aspartat (Asp) sebanyak 19 (6%), Glutamat (Glu) sebanyak 19 (6%), Asparagin (Asn) sebanyak 18 (5,7%), Isoleusin (Ile) sebanyak 18 (5,7%), dan Threonin (Thr) sebanyak 18 (5,7%).

Identifikasi Template dan Pemodelan Protein

Pemodelan protein *calponin* pada ikan gabus (*Channa striata*) menggunakan *web server* Phyre² didapatkan hasil template sebanyak 120 template. Data 10 template terbaik yang berhasil dimodelkan oleh Phyre² dapat dilihat pada Tabel 3.

Template yang dipilih adalah template dengan kode c1wynA yang memiliki nilai confidence 100%, nilai %i.d. 69%, dan nilai coverage 45%. Model yang dihasilkan dari Phyre² (MP) dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Model dengan template c1wynA (MP): kode a1-a6 adalah bentuk α -helix 1-6 dan kode c1-c7 adalah bentuk coil 1-7

Tabel 3. Informasi 10 template terbaik yang berhasil dimodelkan oleh Phyre²

No.	Kode template	Nilai Coverage (%)	Nilai Confidence (%)	Nilai i.d (%)
1.	c1wynA	45% (11-154 residu dari sekuen target tersejajarkan (<i>aligned</i>))	100,0	69
2.	c1wypA	41% (11-144 residu dari sekuen target tersejajarkan (<i>aligned</i>))	100,0	66
3.	d1h67a	33% (26-132 residu dari sekuen target tersejajarkan (<i>aligned</i>))	100,0	66
4.	c1wymA	44% (11-151 residu dari sekuen target tersejajarkan (<i>aligned</i>))	100,0	39
5.	d1ujoa	38% (22-145 residu dari sekuen target tersejajarkan (<i>aligned</i>))	100,0	39
6.	c2rr8A	51% (6-169 residu dari sekuen target tersejajarkan (<i>aligned</i>))	100,0	25
7.	c3i6xC	47% (12-161 residu dari sekuen target tersejajarkan (<i>aligned</i>))	100,0	25
8.	c1p5sA	44% (17-158 residu dari sekuen target tersejajarkan (<i>aligned</i>))	100,0	26
9.	d1p2xa	44% (17-158 residu dari sekuen target tersejajarkan (<i>aligned</i>))	100,0	26
10.	c1wyrA	35% (22-136 residu dari sekuen target tersejajarkan (<i>aligned</i>))	100,0	29

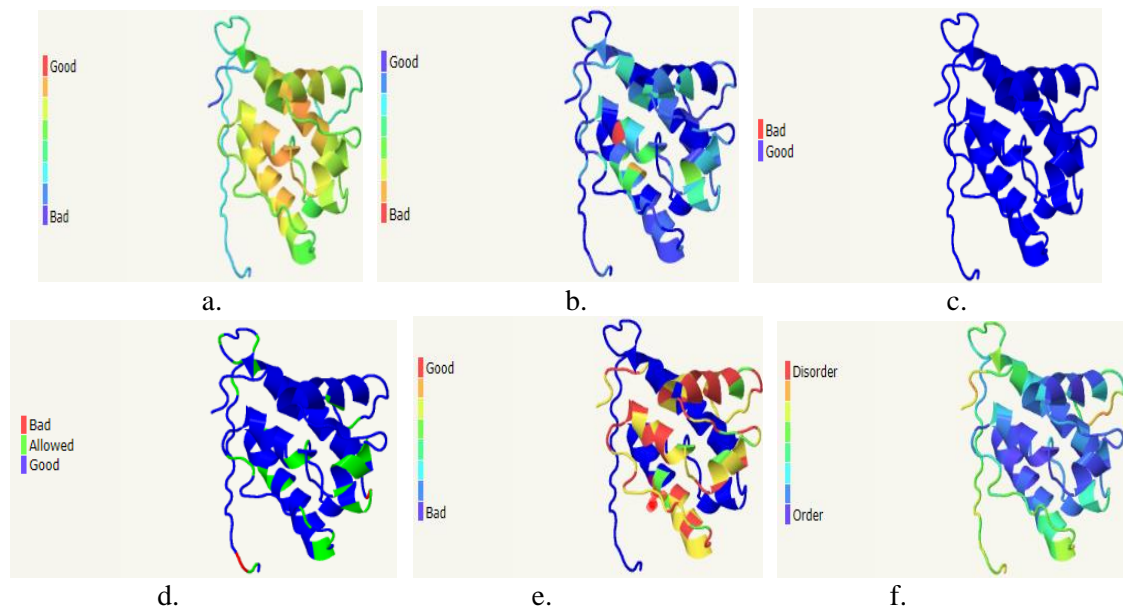
Gambar 2 menunjukkan model protein *calponin* (MP) pada ikan gabus dengan template c1wynA tersusun atas 6 α -helix dan 7 coil. Alpha-helix yang paling panjang ditunjukkan pada nomor (a4) dengan jumlah asam amino sebanyak 18, sedangkan α -helix yang paling pendek ditunjukkan pada nomor (a5) dengan jumlah asam amino sebanyak 5. Coil terpanjang ditunjukkan pada nomor (c7) dengan jumlah asam amino sebanyak 22, sedangkan coil terpendek ditunjukkan pada (c3) dengan jumlah asam amino sebanyak 1.

Evaluasi Model

Evaluasi model dilakukan dengan 2 parameter, yaitu parameter *quality* dan *function*. *Quality model* memiliki 6 parameter, yaitu ProQ2 *quality assessment*, *Clashes*, *Rotamers*, *Ramachandran analysis*, *Alignment confidence* dan *Disorder*. *Function model* memiliki 3 parameter yaitu *Conservation*, *Pocket detection* dan *Mutational sensitivity*. Evaluasi model pada Phyre² dijalankan dengan mode *Run Investigator* pada *template* yang dihasilkan. Setelah prosesnya selesai akan ditampilkan hasil dari *run investigator*-nya. Hasil *run investigator* adalah rangkaian bentuk gambar dan data evaluasi model dari parameter yang ditampilkan. Hasil evaluasi model MP dengan parameter *quality* ditampilkan pada Gambar 3, sedangkan hasil evaluasi model MP dengan parameter *function* disajikan pada Gambar 4.

Hasil yang didapatkan dari ProQ2 *quality assessment* menunjukkan warna merah ke biru atau nilai 0 ke 1, dimana nilai 0 (merah) menunjukkan asam amino bernilai baik. ProQ2 adalah teknik evaluasi kualitas model yang menggunakan mesin vektor pendukung untuk memperkirakan kualitas model protein dalam skala lokal dan global (Ray et al., 2012). ProQ2 yang mendekati nilai 1 adalah pada asam amino 11 (Gly) sebesar 0,659 dan nilai yang paling mendekati 0 adalah pada asam amino 122 (Leu) sebesar 0,075. Model dari ProQ2 pada Gambar 3a menunjukkan didominasi warna kuning-jingga, hijau pada daerah α -helix, dan biru pada daerah coil, sehingga model MP bernilai cukup baik. Model *clashes* menunjukkan bentrokan residu dengan nilai rendah ke tinggi (warna biru ke warna merah). Beberapa atom dalam beberapa residu mungkin terletak terlalu dekat satu sama lain dalam model. Warna pada residu menunjukkan berapa banyak bentrokan yang diamati. Besarnya nilai bentrokan berarti penempatan *sidechain* yang buruk, atau mungkin rantai utama yang salah di wilayah ini. Gambar 3b menunjukkan model bernilai baik karena didominasi warna ungu, biru, biru muda dan

hijau pada daerah α -helix dan *coil*. Indikator warna merah pada *clashes* model MP terdapat pada asam amino 62 (Ile), warna jingga pada asam amino 89 (Phe), dan warna kuning pada asam amino 98 (Leu).



Gambar 3. Hasil evaluasi model parameter quality dengan Phyre² (a. ProQ2 *quality assessment*, b. *clashes*, c. *Rotamers*, d. *Ramachandran analysis*, e. *Alignment Confidence*, f. *Disorder*)

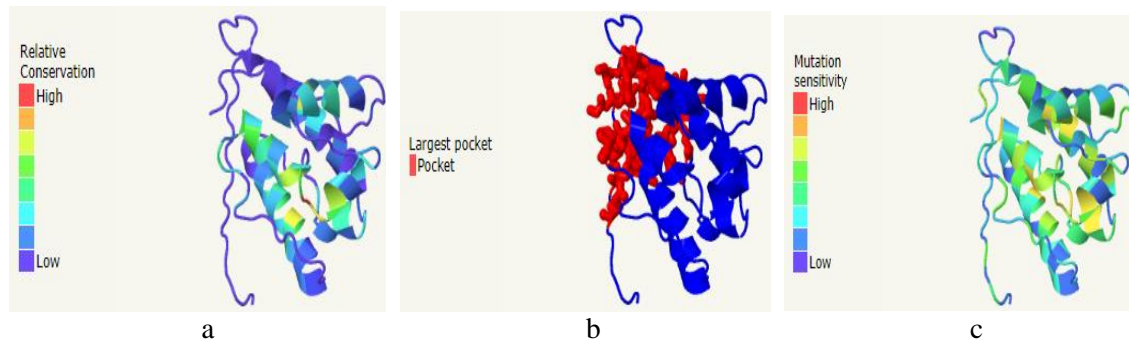
Rotamers menunjukkan beberapa *sidechain* dalam model mungkin tidak dimodelkan secara ideal. Warna merah mungkin menunjukkan masalah dengan rantai utama atau keselarasan yang mendasari di wilayah ini. Model yang dievaluasi oleh *Rotamers* menunjukkan tidak ada residu asam amino yang bermasalah. Gambar 3c menunjukkan bahwa model MP bernilai baik karena didominasi warna biru yang artinya residu yang dimodelkan secara ideal (*Good*).

Ramachandran analysis pada Gambar 3d. menunjukkan residu yang tidak baik berada pada asam amino 17 (Lys), 112 (Ser), dan 152 (Phe). Residu yang *allowed* ditunjukkan pada asam amino 22 (Gln), 32 (Leu), 48 (Phe), 50 (Lys), 51 (Gly), 53 (Lys), 58 (Leu), 68 (Gly), 69 (Ser), 75 (Gln), 77 (Ser), 79 (Asn), 90 (Ile), 91 (Lys), 97 (Gly), 110 (Phe), 111 (Glu), 114 (Asn), 131 (Thr), 133 (Gly), 137 (Arg), 139 (Asp), 141 (Gly), dan 153 (Asp). Beberapa residu dalam model terletak di daerah yang disukai (biru), diperbolehkan (hijau) atau dilarang (merah) dari plot Ramachandran. Pewarnaan ini menunjukkan residu yang bermasalah dengan sudut phi/psi rantai utama. Model MP dari evaluasi Ramachandran menunjukkan model bernilai baik karena didominasi warna biru dan hijau.

Alignment Confidence pada Gambar 3e menunjukkan hasil pensejajaran antara *template* dengan sekuen protein target, dengan bentuk penilaian 0 (baik) ke 1 (kurang baik). Nilai *confidence* diperoleh dari probabilitas posterior yang dihitung dalam algoritma *Forward-Backward*. Pensejajaran yang baik (warna merah) terdapat pada residua asam amino 13 (Ser), 14 (Ala), 25 (Asp), 26 (Pro), 30 (Glu), 32 (Leu), 33 (Arg), 34 (Ile), 36 (Ile), 37 (Glu), 39 (Ile), 41 (Gly), 43 (Lys), 45 (Gly), 49 (Gln), 53 (Lys), 54 (Asn), 59 (Cys), 60 (Glu), 62 (Ile), 64 (Arg), 65 (Leu), 66 (Arg), 67 (Pro), 70 (Val), 74 (Asn), 77 (Ser), 78 (Leu), 81 (His), dan 85 (Asn) senilai 0, sedangkan pensejajaran yang kurang baik (warna biru) terdapat pada asam amino 86-154. Model MP dari evaluasi ini didominasi warna biru, merah, dan kuning yang menunjukkan model bernilai kurang baik.

Daerah yang tidak teratur (*Disorder*) merupakan faktor utama dalam fungsi banyak protein. Daerah yang tidak teratur secara dinamis fleksibel dan berbeda dari struktur sekunder *loop* tidak teratur. Prediksi *disorder* juga menjadi parameter evaluasi yang berharga untuk mengidentifikasi daerah fleksibel yang dapat menghambat keberhasilan kristalisasi protein. Prediksi ini dibuat dengan metode *knowledge-based disorder*. Nilai mendekati 1 menunjukkan disorder (warna merah) dan nilai

mendekati 0 menunjukkan order (warna biru). Gambar 3f menunjukkan bernilai baik karena didominasi warna biru, biru muda, dan hijau pada daerah α -helix dan warna kuning pada daerah *coil*.



Gambar 4. Hasil evaluasi model parameter function dengan Phyre² (a. *Conservation*, b. *Pocket detection*, c. *Mutational sensitivity*)

Residu protein tidak selalu berpacu pada analisis *Quality*, akan tetapi juga secara fungsional. Parameter fungsional protein antara lain *Conservation*, *Pocket detection* dan *Mutational sensitivity*. Phyre² menggunakan metode teoritis informasi berdasarkan divergensi *Jensen-Shannon* untuk menganalisis konservasi dalam urutan yang ditentukan (Capra & Singh, 2007). Gambar 4a. Menunjukkan model *conservation* yang dapat memberikan informasi kemungkinan ada atau tidaknya suatu residu yang fungsional. Indikator warna yang berkisar dari hijau hingga merah menunjukkan kawasan residu dengan nilai konservasi tinggi; semakin mendekati merah, semakin tinggi nilai konservasinya (*High*). Sedangkan indikator warna dari hijau ke ungu memiliki nilai konservasi rendah, semakin mendekati ungu semakin rendah nilai konservasinya (*Low*). Hasil evaluasi model didominasi oleh warna ungu, biru, dan biru muda pada daerah α -helix, dan *coil* yang meindikasikan model tergolong rendah setaip residu, sedangkan warna hijau terdapat pada α -helix yaitu residu 53 (Lys), 56 (Val), 58 (Leu), 61 (Leu), 63 (Asn), 65 (Leu), 86 (Leu), 90 (Ile), 108 (Asp); warna kuning pada residu 35 (Trp), 54 (Asn), 85 (Asn); dan warna merah pada residu 55 (Gly).

Pocket detection adalah tools untuk mengetahui prediksi asam amino apa saja yang dapat dijadikan *active site*. *Largest pocket* sering ditemukan sebagai lokasi *active site*. *Largest pocket* yang terdeteksi oleh program fpocket2 (le Guilloux et al., 2009) ditampilkan dalam mode gambar rangka, berwarna merah. Gambar 4b. menunjukkan residu yang merupakan *active site* adalah residu 11 (Gly), 12 (Leu), 13 (Ser), 14 (Ala), 15 (Glu), 17 (Lys), 18 (Asn), 19 (Lys), 65 (Leu), 66 (Arg), 67 (Pro), 94 (Thr), 95 (Ala), 96 (Tyr), 97 (Gly), 98 (Leu), 99 (Lys), 100 (Pro), 102 (Asp), 124 (Ala), 128 (Met), 129 (Ala), 131 (Thr), 131 (Lys), 142 (Val), 144 (Tyr), 145 (Ser), 146 (Asp), 148 (Gln).

Suatu teknik untuk analisis efek dari masing-masing dari dua puluh mutasi missense potensial pada asam amino tertentu pada urutan asam amino dari protein target diprediksi merupakan *Mutational Sensitivity*. Gambar 4c. menunjukkan evaluasi model MP dari *Mutational Sensitivity*. Peringkat sensitivitas mutasi berkisar dari 0 hingga 9, dengan nilai mendekati 0 menunjukkan bahwa residu memiliki karakteristik mutasi yang buruk. Sebaliknya, jika skor sensitivitas mutasi mendekati 9 menunjukkan karakteristik mutasi yang kuat. Nilai yang paling besar didapatkan sebesar 7 pada residu 52 (Leu), 55 (Gly), 59 (Cys), 65 (Leu), 89 (Phe), 104 (Phe), 122 (Leu), 125 (Leu), sedangkan nilai yang paling kecil terdapat 39 residu.

Validasi Model

Procheck merupakan alat validasi unuk menilai kualitas stereokimia protein berdasarkan analisis geometri residu-residu asam amino penyusun model struktur yang dibandingkan dengan struktur protein eksperimental resolusi tinggi dan menampilkannya dalam bentuk Ramachandran Plot (Saudale, 2020). Hasil validiasi model MP dengan Procheck yang disajikan dalam Tabel 4.

Tabel 4. Hasil validasi model MP menggunakan PROCHECK

Parameter	Nilai
<i>Ramachandran plot</i>	Residu berada pada daerah yang <i>most favoured</i> sebesar 82,0% Residu berada pada daerah yang <i>additional allowed</i> sebesar 16,4% Residu berada pada daerah yang <i>generously allowed</i> sebesar 1,6% Residu berada pada daerah yang <i>disallowed</i> sebesar 0,0%
<i>All Ramachandrans</i>	14 residu <i>labelled</i> (dari 142 residu)
<i>Chi 1-chi 2 plots</i>	1 residu <i>labelled</i> (dari 99 residu)
<i>Side-chain params</i>	5 <i>better</i> , 0 <i>inside</i> , 0 <i>worse</i>
<i>Residue properties</i>	<i>Max. deviation</i> : 2,9
<i>G-factor</i>	<i>Overall</i> : 0,40
<i>Planar groups</i>	100% <i>within limits</i> , 0% <i>highlighted</i>

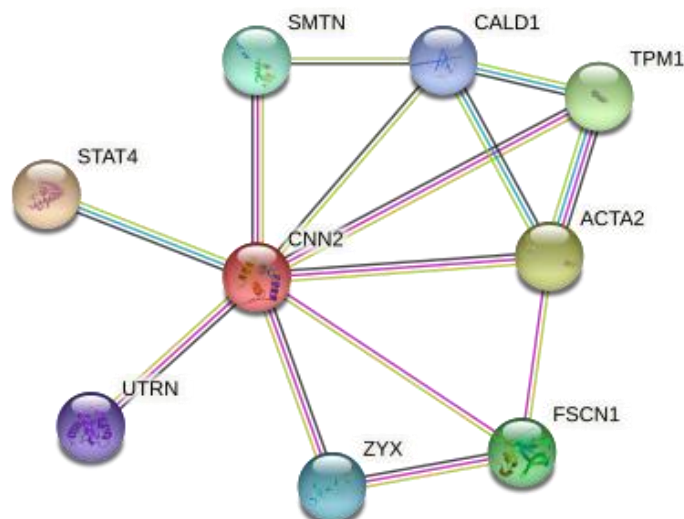
Tabel 4 menunjukkan bahwa Ramachandran plot pada model MP, teridentifikasi sebanyak 82% pada daerah yang *most favoured*, 16,4% pada daerah *additional allowed*, 1,6% pada daerah *generously allowed*, dan 0% pada daerah *dissalowed*. Jumlah residu non-glisin di area *outliner/disallowed* menentukan kualitas struktur protein. Jika residu non-glisin di area *outliner* kurang dari 15%, struktur proteinnya memiliki kualitas yang sangat baik; semakin kecil, semakin baik struktur proteinnya. Secara umum bahwa persentase inti residu dalam model resolusi atom harus >90%, dengan jumlah ini menurun karena sebagai fungsi resolusi menjadi sekitar 70% untuk struktur 3.0-4.0 Å. PROCHECK juga mengidentifikasi bahwa model MP mempunyai 14 residu yang di beri label berdasarkan data *All Ramachandrans* yaitu: Asparagin, Glutamat, Glisin, Isoleusin, Leusin, Lisin, Fenilalanin, Serin, dan Threonin, serta 1 residu yang diberi labeli berdasarkan data *chi1-chi2 plot* yaitu Fenilalanin.

Selain itu, model MP memiliki 5 buah rantai samping yang berada di posisi *better*. Hasil *Side-chain parameters* menunjukkan tidak ada hasil yang *worse* (buruk) melainkan *Better* (lebih baik). Hasil pada model mengalami penyimpangan pada MP mencapai hingga 2,9 dengan panjang/sudut ikatan sebesar 0,9. Nilai *G-factor* pada MP sebesar 0,40. *G-factor* yang optimal lebih besar dari -0,5 sedangkan *G-factor* kurang dari -1,0 dianggap tidak optimal (Ahmed & Gohlke, 2009). **Tabel 4** menunjukkan *overall G-factor* pada Phyre2 memiliki nilai yang optimal. Planar groups MP sebesar 100% *within limits*, 0% *highlighted* yang artinya, tidak ada batang yang melewati garis putus-putus. Validasi model MP memiliki tingkat planaritas yang baik.

Interaksi Protein-protein

Visualisasi interaksi protein-protein dengan *web server* STRING-DB disajikan pada Gambar 5. Hasil interaksi menunjukkan semua jaringan terhubung ke jaringan utama, sehingga tidak perlu menghapus data duplikat dari jaringan yang tidak terhubung ke jaringan utama, sehingga mengurangi jumlah protein dan interaksi protein (Yuniastuti et al., 2021).

Gambar 5 menunjukkan adanya interaksi protein *calponin* (CNN) dengan protein *Actin-2* (ACTA2) dimana benang yang ditunjukan merupakan interaksi yang berdasarkan *textmining* (kuning), *Co-expression* (hitam), dan secara penelitian atau data eksperimental (ungu). Sedangkan benang lainnya seperti STAT4 (*Signal transducer and activator of transcription 4*) memiliki benang interaksi berdasarkan prediksi, *textmining* dan *database* yang akurat. Berdasarkan analisis STRING nilai *score* yang tertinggi berada pada protein STAT4 dengan nilai 0,901; sedangkan ACTA2 sebesar 0,791; dan *Tropomyosin-1* (TPM1) sebesar 0,786. Hal ini membuktikan prediksi *functional partner* yang terbaik adalah STAT4, akan tetapi STAT4 tidak ada kaitannya secara eksperimental dengan *calponin* (CNN) berdasarkan analisis STRING, hanya disebutkan dalam *curated database*. Interaksi yang diambil adalah interaksi *calponin* dengan protein ACTA2 dan protein TPM1 untuk dipelajari interaksinya dengan protein model MP.



Gambar 5. Interaksi Protein-protein *calponin* (CNN): benang kuning = *textmining*, hitam = *Co-expression*, ungu = eksperimental, biru = kurasi *database*

Molecular Docking

Hasil konformasi terbaik interaksi molekul dipilih dan dibandingkan berdasarkan nilai Energi Kontak Atom (ACE) dalam model interaksi protein-protein. Analisis posisi docking spesifik dan pemilihan hasil terbaik di Patchdock didasarkan pada perhitungan nilai ACE terendah (Maiti & Banerjee, 2021). Hasil *docking* diurutkan berdasarkan skor ACE (Duhovny et al., 2002). Protein-protein *docking* dilakukan antara model CNN dari MP dengan protein ACTA2 dan TPM1 dari *database* PDB dan *database* AlphaFold (AF) yang merupakan hasil prediksi interaksi *web server* STRING. nilai ACE interaksi disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil protein-protein docking MP-ACTA2 menggunakan PatchDock

Protein-Protein	Atomic Contact energy (ACE) (kJ/mol)
MP-ACTA2PDB	408,88
MP-ACTA2AF	372,76

catatan: ACTA2PDB: protein aktin yang berasal dari PDB, ACTA2AF: protein aktin yang berasal dari *AlphaFold*.

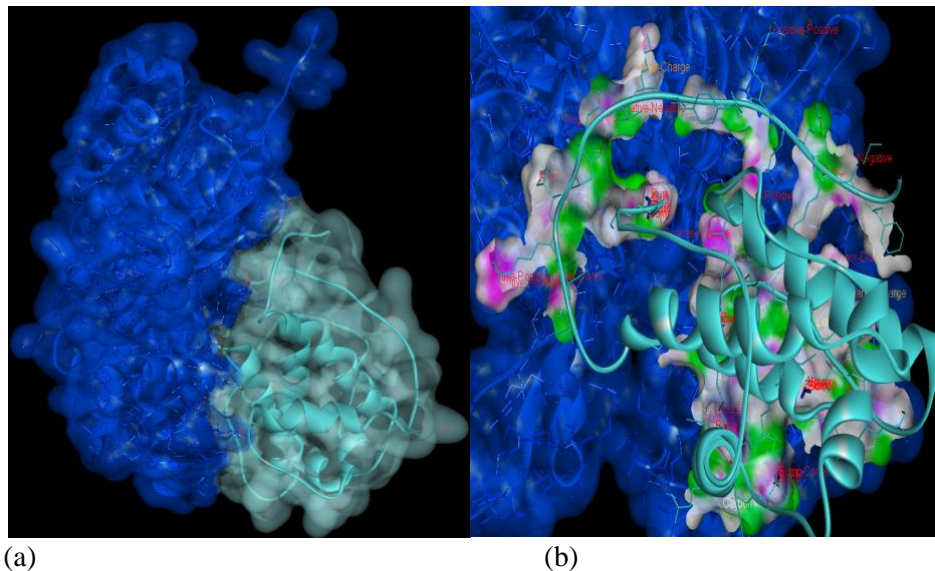
Tabel 5 menunjukkan interaksi protein model MP dengan ACTA2AF memiliki nilai sebesar 372,76 kJ/mol, sedangkan protein model MP dengan ACTA2PDB memiliki nilai ACE sebesar 408,88 kJ/mol. Hal ini membuktikan protein model MP mampu membentuk ikatan yang stabil dengan protein aktin dari *database* AF karena, nilai ACE lebih rendah daripada interaksi dari model protein MP dengan aktin dari *database* PDB. Protein *calponin* bersinergi dengan aktin secara bersama-sama untuk menghambat aktivitas Mg-ATPase.

Tabel 6. Hasil protein-protein docking MP-TPM1 menggunakan PatchDock

Protein-Protein	Atomic Contact energy (ACE) (kJ/mol)
MP-TPM1PDB	430,29
MP-TPM1AF	406,93

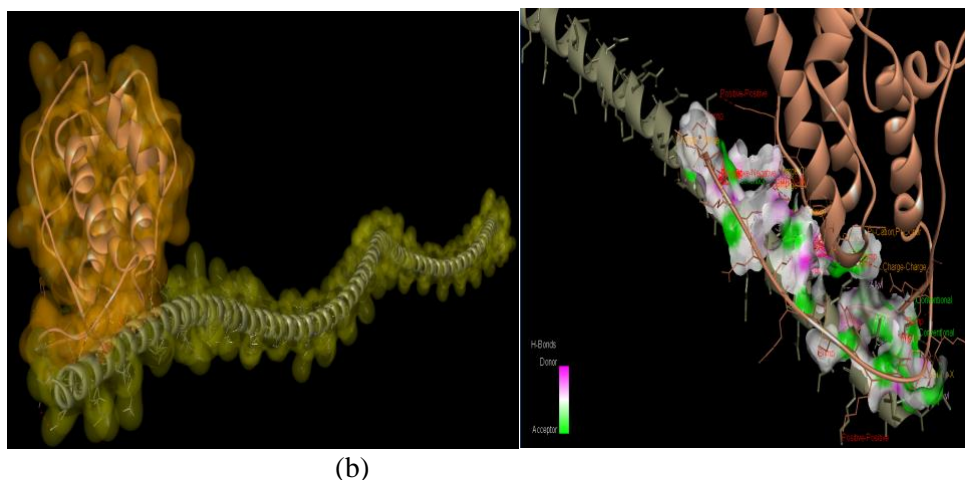
Catatan: TPM1PDB: protein tropomiosin yang berasal dari PDB, TPM1AF: protein tropomiosin yang berasal dari *AlphaFold*.

Tabel 6 menunjukkan bahwa interaksi protein MP dengan TPM1AF memiliki nilai ACE sebesar 406,93 kJ/mol, sedangkan CNNMP dengan TPM1PDB memiliki nilai sebesar 430,29 kJ/mol. Fenomena ini menggambarkan bahwa protein *calponin* model MP mampu berikatan dengan protein tropomyosin pada *database* AF dengan baik. *Calponin* bersinergi dengan aktin dan tropomyosin untuk membangun skeleton sel. Hasil interaksi CNNMP-ACTA2 dan CNNMP-TPM1 disajikan pada Gambar 6 dan Gambar 7.



Gambar 6. Visualisasi Interaksi Protein model MP (biru muda)-ACTA2AF (biru) (a) Pose pengikatan protein-protein (b) Interaksi protein calponin-aktin

Gambar 6 menunjukkan interaksi antar residu model MP dengan actin pada 34 residu asam amino. Ikatan yang terbentuk antara residu pada model MP adalah ikatan hidrogen pada residu Gly-41, Glu-60, Arg-64, Arg-66, Pro-67, Gly-68, Lys-71, ikatan hidrofobik pada residu Arg-64, Lys-71, Lys-72, Ile-73, Val-138, ikatan ionik pada residu Arg-64, Lys-71, Lys-72, Lys-143 dan ikatan jenis lain pada residu Lys-71. Selain interaksi tersebut juga terdapat banyak interaksi antar residu yang tidak diinginkan. Interaksi antar residu pada interaksi protein-protein yang tidak diinginkan akan menyebabkan nilai ACE positif dan besar. Interaksi ini juga menunjukkan bahwa protein tersebut saling bersinergi untuk menjalankan fungsinya (Fakih et al., 2021).



Gambar 7. Visualisasi Interaksi Protein model MP (jingga)-TPM1AF (hijau tua) (a) Pose pengikatan protein-protein (b) Interaksi protein calponin-tropomyosin

Gambar 7 menunjukkan banyaknya residu asam amino yang berinteraksi antara *calponin* dan tropomyosin. Interaksi yang terjadi yaitu ikatan hidrogen pada residu Ser-13, Ala-95, Tyr-96, Lys-71, Cys-134, Ser-136, Arg-150; ikatan hidrofobik pada residu Leu-12, Ala-14, Lys-71, Ala-95, Val-138, Arg-150, Phe-152; dan ikatan ionik pada residu Glu-15, Arg-66, Lys-91, Arg-150, Asp-153. Selain interaksi tersebut juga terdapat residu lain yang cukup banyak saling berinteraksi. Banyaknya interaksi antara residu pada interaksi protein-protein akan menaikkan nilai ACE menjadi positif. Interaksi yang positif juga menunjukkan bahwa antar protein tersebut bersifat sinergi untuk menjalankan fungsinya (Fakih et al., 2021).

KESIMPULAN

Pemodelan struktur tiga dimensi (3D) protein *calponin* pada ikan gabus dengan program Phyre² (MP) menghasilkan model MP dengan template 1wyn dengan nilai coverage 45%, nilai confidence 100%. Hasil evaluasi model yang didapatkan dari model MP berdasarkan quality dengan ProQ2 quality assesment; clashes; rotamers; ramachandran analysis; dan disorder berindikasi baik (Good). sedangkan alignment confidence berindikasi hampir kurang baik (Mostly Bad). Evaluasi model berdasarkan function bahwa nilai conservation tergolong rendah (Low) dan mutational sensitivity tergolong hampir rendah (Mostly Low). Validasi menggunakan PROCHECK pada SAVES menunjukkan model MP mempunyai Ramachandran plot residu berada di daerah yang most favored sebesar 82,0%; residu berada di daerah yang additional allowed sebesar 16,4%; residu berada di daerah yang generously allowed sebesar 1,6%; residu berada di daerah yang disallowed sebesar 0,0%. Model tersebut masih layak dijadikan model karena di daerah disallowed masih dibawah 15%. Hasil docking molecular didapatkan nilai ACE (Atomic Contact Energy) pada *calponin* model MP dengan Actin-2 (ACTA2) yaitu: 408,88 kJ/mol; dan 372,76 kJ/mol. Hasil docking nilai ACE pada *calponin* model MP dengan Tropomyosin1 (TPM1) yaitu: 430,29 kJ/mol; dan 406,93 kJ/mol. Struktur protein MP terbukti mampu mempengaruhi afinitas ligan sehingga akan berpengaruh pula kemampuan berinteraksi dengan ACTA2 maupun TPM1. Interaksi *calponin* dengan actin ada 18 residu yaitu ikatan hidrogen pada Gly-41, Glu-60, Arg-64, Arg-66, Pro-67, Gly-68, Lys-71; ikatan hidrofobik pada Arg-64, Lys-71, Lys-72, Ile-73, Val-138; dan ikatan ionik pada Arg-64, Lys-71, Lys-72, Lys-143; serta ikatan lain pada Lys-71. Interaksi *calponin* dengan tropomyosin menunjukkan 25 residu yaitu ikatan hidrogen pada residu Ser-13, Ala-95, Tyr-96, Lys-71, Cys-134, Ser-136, Arg-150; ikatan hidrofobik terdapat pada Leu-12, Ala-14, Lys-71, Ala-95, Val-138, Arg-150, Phe-152; dan ikatan ionik pada Glu-15, Arg-66, Lys-91, Arg-150, Asp-153. *Calponin* terbukti membentuk interaksi yang baik dengan protein actin dan tropomyosin dan secara sinergi menjalankan fungsinya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Bapak Sunardi, selaku ketua prodi kimia FMIPA ULM yang telah memfasilitasi penggunaan laboratorium bioinformatika untuk keperluan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, A., & Gohlke, H. (2009). Multi-Scale Modeling of Macromolecular Conformational Changes. *1 St International Conference on Mathematical and Computational Biomedical Engineering*, 3(1), 1–4.
- Ayyildiz, D., & Piazza, S. (2019). *Introduction to Bioinformatics. Methods in Molecular Biology*. Switzerland: Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9442-7_1
- Capra, J. A., & Singh, M. (2007). Predicting functionally important residues from sequence conservation. *Bioinformatics*, 23(15), 1875–1882. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm270>
- Duhovny, D., Nussinov, R., & Wolfson, H. J. (2002). Efficient Unbound Docking of Rigid Molecules. *Conference paper, Springer Link*, 2452, 185–200. https://doi.org/10.1007/3-540-45784-4_14.
- Fakih, T. M., Arumsari, A., Dewi, M. L., Hazar, N., & Syarza, T. M. (2021). Identifikasi Mekanisme Molekuler Senyawa Ftalosianina sebagai Kandidat Photosensitizer pada Terapi Fotodinamika secara In Silico. *Alchemy Jurnal Penelitian Kimia*, 17(1), 37. <https://doi.org/10.20961/alchemy.17.1.41184.37-42>

- Guruprasad, K., Reddy, B. V. B., & Pandit, M. W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. In *Protein Engineering*, 4(2). <http://peds.oxfordjournals.org/>
- Ikai, A. (1980). Thermostability and Aliphatic Index of Globular Proteins. In *Communication Journal of Biochemical*, 88.
- Islam, A. H. M. M., Ehara, T., Kato, H., Hayama, M., Kobayashi, S., Igawa, Y., & Nishizawa, O. (2004). *Calponin* h1 expression in renal tumor vessels: Correlations with multiple pathological factors of renal cell carcinoma. *Journal of Urology*, 171(3), 1319–1323. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000101969.34419.57>
- Islam, A. H. M. M., Ehara, T., Kato, H., Hayama, M., & Nishizawa, O. (2004). Loss of *calponin* h1 in renal angiomyolipoma correlates with aggressive clinical behavior. *Urology*, 64(3), 468–473. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2004.03.054>
- Komari, N., Hadi, S., & Suhartono, E. (2020). *Pemodelan Protein dengan Homology Modeling menggunakan SWISS-MODEL Protein Modeling with Homology Modeling using Swiss-Model*. 2(2), 65–70.
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105–132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
- le Guilloux, V., Schmidtke, P., & Tuffery, P. (2009). Fpocket: An open source platform for ligand pocket detection. *BMC Bioinformatics*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-168>
- Maiti, S., & Banerjee, A. (2021). Epigallocatechin gallate and theaflavin gallate interaction in SARS-CoV-2 spike-protein central channel with reference to the hydroxychloroquine interaction: Bioinformatics and molecular docking study. *Drug Development Research*, 82(1), 86–96. <https://doi.org/10.1002/ddr.21730>
- Cavasotto, C. N. (2016). *In Silico Drug Discovery and Design: Theory, Methods, Challenges, and Applications*. New York: CRC Press
- Thenawidjaja, M., Wangsa, T. I., & Debbie, S. R. (2017). Protein Serial Biokimia Mudah dan Menggugah. In M. and W. T. and D. S. Thenawidjaja (Ed.), *Jakarta: Grasindo* (Vol. 35).
- Tomizawa, T., Kigawa T., Koshiha S., Inoue M., & Yokoyama S. (2005). *RCSB PDB - 1WYN: Solution structure of the CH domain of human calponin-2*. Protein Data Bank: Nature Structural Biology. <https://doi.org/10.2210/pdb1wyn/pdb>
- Walker, J. M. (2002). *The Protein Protocols Handbook* (J. M. Walker, Ed.; second edition). New York: Humana Press.
- Wijaya, H., & Hasanah, F. (2016). Prediksi Struktur Tiga Dimensi Protein Alergen Pangan Dengan Metode Homologi Menggunakan Program Swiss-Model (The Prediction of Three-Dimensional Structure from Food Allergen Protein Through Homology Method Using SWISS-MODEL Program). *Prediksi Struktur Tiga Dimensi Protein Alergen Pangan Dengan Metode Homologi Menggunakan Program Swiss-Model*, 07(02), 83–94. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.36974/jbi.v7i2.692>
- Yuniastuti, A., Susanti, R., Dewi, M., Friska, K., Cindy, S., Anik, M., Rizka, K., Siti, M., Ratih, A.S., Rihadatul, A., & Afifah, N. A. (2021). Studi In Silico Interaksi Gen Reg1B Dengan Growth Hormon (GH), Insuline Like Growth Factor (IGF) Dan Tiroid Sebagai Prekdiktor Kejadian Stunting, *Prosiding Seminar Nasional Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang*, 09, 250–255.