

# PREDIKSI IN SILICO DAN ANALISIS MODEL 3D EPITOP POTENSIAL HEAT SHOCK PROTEIN-70 (HSP70) GALLUS GALLUS SEBAGAI KANDIDAT BIOMARKA UJI KUALITAS DAGING UNGGAS

Sulaiman Ngongu Depamede\*, Budi Indarsih, I Ketut Gede Wiryawan,  
Mohamad Hasil Tamsil, Maskur  
Fakultas Peternakan, Universitas Mataram  
Jl. Majapahit No.62, Mataram, Nusa Tenggara Barat. 83115

\*Corresponding Author Email: sulaiman\_n@unram.ac.id

---

## ABSTRAK

Stresor fisik, kimiawi dan biologis sebelum-, selama-, dan sesudah penyembelihan ternak, sangat berpengaruh terhadap kualitas daging. Ekspresi heat shock protein 70 (HSP70) pada daging unggas dinyatakan berpotensi untuk menentukan kualitas daging. Pada penelitian ini dilakukan studi *in silico* terhadap sekuen protein *Heat Shock Protein-70* (HSP70) *Gallus gallus* untuk menganalisis epitop yang berpotensi sebagai biomarka. Metode yang digunakan adalah metode berbasis *software* terkait bioinformatika secara daring. Dari penelitian ini diperoleh dua peptide kandidat biomarka potensial terkait HSP70 yakni AILMGDKSENVQD, dan ISWLDNRNQMAEKEEYEHKQKELEK. Dihasilkan pula model 3 dimensi dari epitop tersebut. Masih dibutuhkan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan potensi kedua biomarka tersebut secara *in vivo*

---

**Keyword:** Biomarka; Epitop; Gallus gallus; HSP70; Kualitas daging

## 1. PENDAHULUAN

Kemajuan teknologi dan peningkatan ekonomi masyarakat telah mengubah pola permintaan konsumen terhadap kuantitas dan kualitas daging, termasuk daging unggas. Menurut Zaboli et al. (2019), ada tiga mekanisme utama yang memengaruhi kualitas daging: (1) penurunan pH yang cepat selama- dan setelah penyembelihan, (2) metabolisme asidosis pada otot rangka, dan (3) cekaman panas yang mengakibatkan naiknya stress oksidatif pada tubuh ternak, khususnya ternak unggas.

Di industri pengolahan daging, daging unggas yang dikenal sebagai daging *pale, soft, and exudative* (PSE) terus menjadi perhatian serius (Xing et al., 2016). Hal ini karena daging unggas, terutama di bagian dada (*pectoralis major*) yang masuk dalam kategori PSE, memiliki protein fungsional yang buruk, yang berpengaruh terhadap kualitas produk dan berujung pada kerugian ekonomi (Desai et al. 2019). Stresor pra penyembelihan, seperti stres panas lingkungan dan kondisi transportasi dapat menjadi pemicu pembentukan daging PSE (Adzitey and Nurul, 2011; Xing et al., 2015). Terkait dengan stressor tersebut, diketahui bahwa dalam tubuh ternak terdapat suatu keluarga protein yang dikenal sebagai *heat shock proteins* (HSPs). Protein ini disintesis dalam merespon stressor fisik, kimiawi, dan biologis, dan dianggap sebagai termometer seluler (Feeder and Hofmann, 1999, Hassan et al. 2019).

Xing et al. (2016) melaporkan bahwa *heat shock protein 70* (HSP70) terkait dengan mekanisme yang berperan pada variasi kualitas daging akibat cekaman panas. Ditambahkan pula, ekspresi dan aktivitas protein pengikat HSP70 yang tinggi pada tubuh unggas, mungkin memainkan peran penting dalam mekanisme tersebut. Meskipun demikian hasil penelitian tersebut masih butuh pengujian lebih lanjut (Xing et al., 2016). Ekspresi HSP70 dikendalikan oleh berbagai faktor seperti, pH

intraseluler, siklik adenosin monofosfat (cAMP), protein kinase C dan kalsium bebas intraseluler (Hassan et al. 2019). Cekaman panas akut maupun kronis memicu ekspresi HSPs, dan di antara semua HSPs, HSP70 berperan penting dalam pengelolaan adaptasi termal pada ternak (Dangi et al. 2014). Bharati et al. (2017) mengungkapkan HSP70 dapat digunakan sebagai biomarker stres panas kronis pada ternak. Keberhasilan Xing et al. (2016) memanfaatkan HSP70 untuk mengkaji kualitas daging unggas kategori *pale, soft, and exudative* (PSE) dengan teknik immuno-fluorescence, membuktikan bahwa komponen HSP70 berpotensi sebagai biomarker.

Dengan kemajuan teknologi bioinformatika, studi *in silico* terhadap suatu kandidat biomarka dapat dilakukan dalam waktu yang relative lebih cepat dibandingkan metode konvensional, meskipun tetap dibutuhkan uji *in vivo* lebih lanjut. Dalam tulisan ini dilaporkan hasil studi *in silico* peptide *Heat shock Protein70* (HSP70) *Gallus gallus* sebagai kandidat biomarka untuk uji kualitas daging unggas.

## 2. BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian berbasis *software* terkait bioinformatika dan uji *in silico* menggunakan program yang dapat diakses secara daring melalui *open server*. Bahan utama penelitian ini adalah sekuen peptide HSP70 *Gallus gallus* yang diturunkan dari bank data UniProtKB (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q7SX63>) dengan prosedur dimodifikasi dari Kisworo and Depamede (2021).

### ***Identifikasi dan Prediksi Epitope Sel B***

Sel B berperan menghasilkan immunoglobulin sebagai manifestasi respon imun tubuh (humoral) terhadap suatu epitop spesifik. Epitop spesifik ini dapat digunakan sebagai suatu biomarka. Untuk memrediksi epitop sel B yang terdapat pada HSP70 digunakan program dari server BepiPred-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) menurut Jespersen et al. (2017). Kandidat epitop dengan panjang asam amino 10 (10-AA) atau lebih, pada ambang default 0,5 yang dipertimbangkan untuk analisis lebih lanjut.

### ***Prediksi Epitop HLA-I dan -II dan Analisis Antigenisitas Epitope Sel T***

Selain respon imun humoral, dibutuhkan pula respon imun seluler yakni yang terkait dengan sel-sel T. Prediksi epitop HLA-I dan II dilakukan dengan mengakses <https://help.iedb.org/hc/en-us/articles/114094147231-MHC-Restriction-and-Allele-Finder>, dikombinasikan dengan <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetCTLpan-1.1> (Stranzl et al. 2010, Jurtz et al. 2017). Antigenisitas HSP70 dianalisis dan ditetapkan berdasarkan Vaxijen (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/Vaxijen/Vaxijen.html>), dengan nilai prediksi *Overall Protective Antigen Prediction* (OPAP) sebesar atau di atas 0,5 (Doytchinova and Flower, 2007).

### ***Prediksi Model 3D epitop***

Pada penelitian ini dianalisis pula model 3 dimensi (3D) dari epitop yang diperoleh menggunakan The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis (Kelley et al. 2015, Wass et al. 2010).

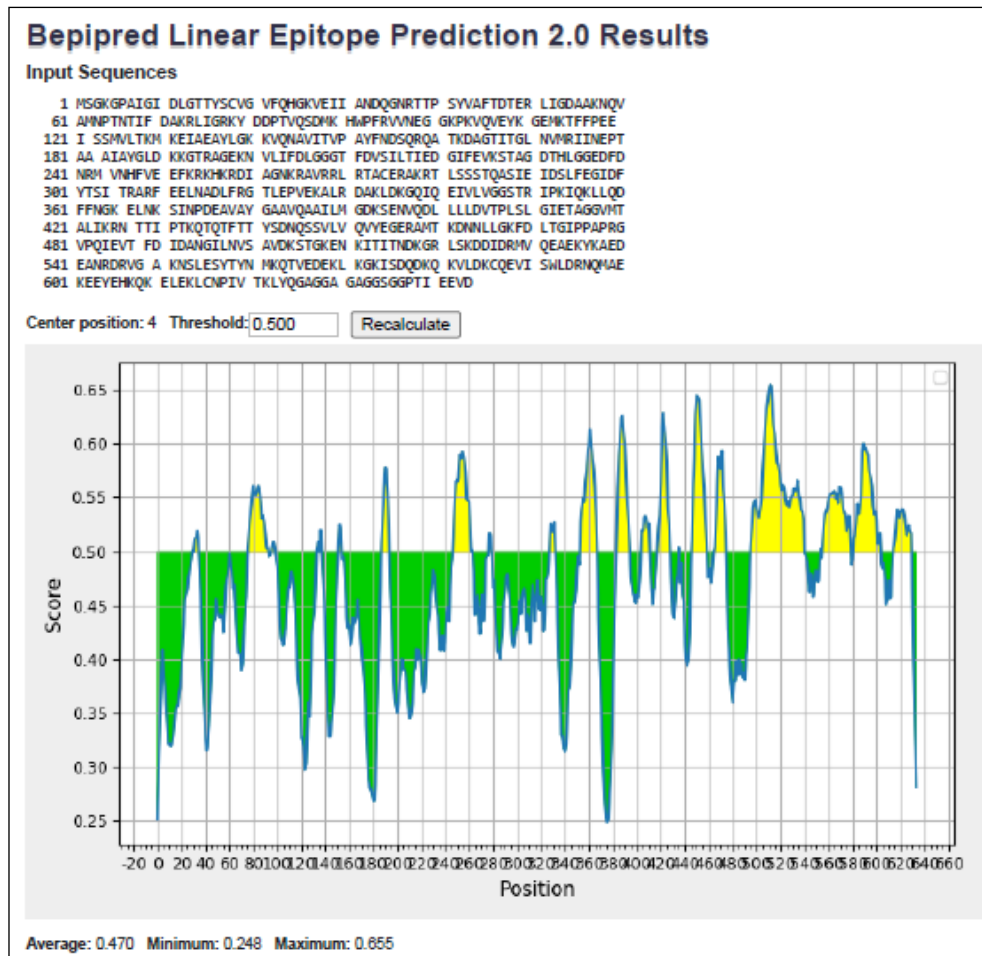
### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sekuen asam amino dari suatu protein memainkan peran penting untuk mengidentifikasi epitop-epitop potensial sebagai target dalam mendesain suatu vaksin, obat, atau biomarka. Dari penelusuran protein HSP70 di Uniprot database, dengan nomor identitas ID Q7SX63, diperoleh sekuen asam amino dengan panjang 634 AA (Gambar 1). Sekuen ini merupakan sekuen asam amino dari *Gallus gallus* yang digunakan untuk rekayasa biomarker secara *in silico* di dalam penelitian ini.

Salah satu pemanfaatan biomarka adalah untuk pengembangan imunodiagnostik. Untuk itu biomarka dengan sekuen asam amino yang memiliki kemampuan mentrigger sel B (imunitas humoral) dan sel T (imunitas seluler) pada system imun sangat penting (Sadam et al. 2021). Biomarka yang demikian memiliki peluang besar sebagai bahan untuk membuat antibody poliklonal maupun monoklonal, yang merupakan salah satu bahan pengembangan imunodiagnostik. Hasil identifikasi dan prediksi epitop sel B dari HSP70 berdasarkan program BepiPred-2.0 disajikan pada Gambar 2. Sementara sekuen asam amino dengan ukuran lebih panjang atau sama dengan 10-AA, berdasarkan Jespersen et al. (2017), disajikan pada Tabel 1. Dari identifikasi dan analisis ini ditemukan setidaknya tujuh sekuen asam amino dari HSP70 *Gallus gallus* yang memiliki potensi sebagai epitop atau biomarka, yakni terutama di antara sekuen AA nomor 383-630 (Tabel 1). Sekuen ini terkait dengan Sel B yang berfungsi menghasilkan antibodi dalam system imun.

10	20	30	40	50
MSGKGPAIGI	DLGTTYSCVG	VFQHGKVEII	ANDQGNRTTP	SYVAFTDTER
60	70	80	90	100
LIGDAAKNQV	AMNPTNTIFD	AKRLIGRKYD	DPTVQSDMKH	WPFRVVEGG
110	120	130	140	150
KPKVQVEYKG	EMKTFPEEI	SSMVLTKMKE	IAEAYLGKKV	QNAVITVPAY
160	170	180	190	200
FNDSQRQATK	DAGTITGLNV	MRIINEPTAA	AIAYGLDKKG	TRAGEKNVLI
210	220	230	240	250
FDLGGGTFDV	SILTIEDGIF	EVKSTAGDTH	LGGEDFDNRM	VNHFVEEFKR
260	270	280	290	300
KHKRDIAGNK	RAVRRRLTAC	ERAKRTLSSS	TQASIEIDSL	FEGIDFYTSI
310	320	330	340	350
TRARFEELNA	DLFRGTLEPV	EKALRDAKLD	KGQIQEIVLV	GGSTRIPKIQ
360	370	380	390	400
KLLQDFFNGK	ELNKSINPDE	AVAYGAAVQA	AILMGDKSEN	VQDLLLLDVT
410	420	430	440	450
PLSLGIETAG	GVMTALIKRN	TTIPTKQTQT	FTTYSNQSS	VLVQVYEGER
460	470	480	490	500
AMTKDNNLLG	KFDLTGIPPA	PRGVPQIEVT	FDIDANGILN	VSAVDKSTGK
510	520	530	540	550
ENKITITNDK	GRLSKDDIDR	MVQEAKEYKA	EDEANRDRVG	AKNSLESYTY
560	570	580	590	600
NMKQTVEDEK	LKGKISDQDK	QKVLDKCQEV	ISWLDNRQMA	EKEEYEHKQK
610	620	630		
ELEKLCNPIV	TKLYQGAGGA	GAGGSGGPTI	EEVD	

Gambar 1. Sequence peptide Heat Shock Protein-70 dari *Gallus gallus* yang diambil dari Uniprot database.



Gambar 2. Grafik hasil analisis epitop linier Sel B yang terdapat pada HSP70 *Gallus gallus* berdasarkan BepiPred 2.0. Area berwarna kuning menunjukkan region epitop, sementara yang berwarna hijau merupakan region non-epitop.

Tabel 1. Epitop sel B dari HSP70 dengan 10 asam amino atau lebih

No.	Nomor sekuen AA	Sekuen Epitop
1.	383 – 393	AILMGDKSEN VQD
2.	417 – 428	IKRNTTIPTKQT
3.	447 – 459	EGERAMTKDNNLL
4.	493 – 540	AVDKSTGKENKITITNDKGRLSKDDIDRMVQEAKEYKAE DEANRDRVG
5.	556 – 579	NMQQTVEDEK LKGKISDQDK QKVLDKCQE
6.	582 – 604	ISWLDNRNQMA EKEEYEHKQKELEK
7.	616 – 630	GAGGA GAGGSGGPTI

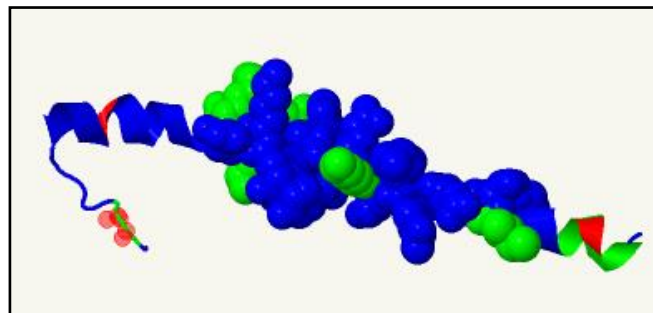
Selain epitop terhadap sel B, epitop terhadap sel T juga memainkan peran penting. Epitop sel T memiliki afinitas ikatan pada allele MHC-I dan MHC-II, masing-masing memicu respon imun berperantara *cytotoxic T-cell* dan *helper T-cell*. Karena masih terbatasnya informasi terkait MHC-I dan II pada unggas, maka prediksi disesuaikan dengan data yang tersedia untuk manusia atau mamalia (Mugunthan and Harish, 2021). Pada penelitian ini hasil analisis “Vaxijen v2” menunjukkan terdapat 272 kandidat epitop sekuen HSP70 yang terkait dengan MHC-I, sementara yang terkait

MHC-II sebanyak 105 epitop (data keseluruhan tidak ditampilkan). Analisis difokuskan pada epitop yang terkait MHC-II, yakni yang berhubungan dengan sel T *helper* (CD-4) yang membantu sel-sel B dalam memproduksi antibodi (Shimoda et al. 2006, Koutsakos et al. 2019, Pishesha et al. 2021). Dari 105 epitop MHC-II, terdapat delapan epitop dengan kategori *strong binding level*, disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Sekuen HSP70 dengan kategori MHC-II *strong binding level*

No.	Posisi sekuen	HLA	Peptida
1.	7	H-2-Qa1	AIGIDLGTTY
2.	60	H-2-Qa1	VAMNPTNTIF
3.	106	H-2-Qa2	VEYKGEMKTF
4.	285	H-2-Qa2	IEIDSLFEGI
5.	291	H-2-Qa2	FEGIDFYTSI
6.	304	H-2-Qa2	RFEELNADLF
7.	388	H-2-Qa2	SENVQDLLLL
8.	593	H-2-Qa2	EEYEYHKQKEL

Hasil analisis model 3 dimensi dari epitop yang diperoleh disajikan pada Gambar 3. Analisis Ramachandran (Gambar 3) menunjukkan beberapa residu (asam amino) dalam model mungkin terletak di daerah yang bagus (biru), cukup bagus (hijau), atau tidak bagus (merah) sebagai target. Pewarnaan ini menunjukkan residu yang mungkin bermasalah dengan sudut phi/psi tulang punggung (Kelley et al. 2015, Wass et al. 2010).



Gambar 3. Hasil analisis Ramachandran model 3 dimensi (3D) epitope potensial sekuen peptide HSP70 yang mengandung sekuen ISWLDRNQMAEKEEYEHKQKELEK. Area berwarna biru dan hijau, masing-masing merupakan area yang bagus dan cukup bagus sebagai target, sementara yang berwarna merah merupakan yang tidak masuk kategori target.

Dari data epitop sel B (Tabel 1) dan sel T (MHC-II) pada Tabel 2, nampak bahwa ada dua sekuen yang merupakan sekuen yang sekaligus mengandung epitop sel B dan sel T, yakni sekuen AA No. 383-393 (AILMGDKSEN VQD), dan AA No. 582-604 (ISWLDRNQMA EKEEYEHKQKELEK). Untuk memastikan apakah kedua sekuen ini bersifat antigenic, maka kedua sekuen ini dianalisis lebih lanjut menggunakan "VaxiJen v2" (Doytchinova and Flower, 2007). Opsi pilihan pada program ini terbatas pada analisis untuk virus, parasit, bakteri, dan tumor, sementara opsi untuk protein seperti HSP70, tidak dijumpai. Pada penelitian ini digunakan opsi antigen virus, dengan hasil *Overall Protective Antigen Prediction* (OPAP) masing-masing 0,8997 untuk AA No.

383-393, dan 0,7719 untuk AA No. 582-604. Nilai OPAP > 0,5 menunjukkan bahwa kedua eptop tersebut bersifat antigenik atau dapat memicu system imun untuk menghasilkan antibodi. Ini berarti bahwa kedua sekuen tersebut berpotensi sebagai kandidat biomarka untuk pengembangan alat pengujian kualitas daging berbasis analisis *heat shock proteins*. Pertanyaannya adalah apakah kedua peptide tersebut memang dapat menghasilkan antibodi secara *in vivo* sehingga dapat digunakan sebagai biomarka? Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan hewan coba.

#### 4. KESIMPULAN

Studi insilico pada penelitian ini menghasilkan dua sekuen fragmen peptide HSP70 *Gallus gallus* yang berpotensi sebagai kandidat biomarka yakni AILMGDKSENVQD, dan ISWLDRNQMAEKEEYEHKQKELEK. Untuk membuktikan potensi kedua biomarka ini secara *in vivo*, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan hewan coba.

#### 5. UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh Universitas Mataram melalui dana DIPA BLU Skema Penelitian Guru Besar Universitas Mataram, Tahun Anggaran 2021, Kontrak Penelitian Nomor: 2842/UN18.L1/PP/2021.

#### 6. DAFTAR PUSTAKA

1. Adzitey, F., and Nurul, H. 2011. Pale soft exudative (PSE) and dark firm dry (DFD) meats: Causes and measures to reduce these incidences-a mini review. *Int. Food Res. J.* 18:11-20.
2. Bharati, J., Dangi, S.S., Chouhan, V.S., Mishra, S.R., Bharti, M.K., et al. 2017. Expression dynamics of HSP70 during chronic heat stress in Tharparkar cattle. *Int J Biometeorol* 61:1017e27.
3. Dangi, S.S., Gutpa, M., Nagar, V., Yadav, V.P., Dangi, S.K., et al. 2017. Impact of short-term heat stress on physiological responses and expression profile of HSPs in Barbari goats. *Int J Biometeorol* 58: 2085e93.
4. Desai, M.A., Jackson, V., Zhai, W., Suman, S.P., Nair, M.N., Beach, C.M., and Schilling, W.S. 2016. Proteome basis of pale, soft, and exudative-like (PSE-like) broiler breast (*Pectoralis major*) meat. *Poultry Science* 0:1-11. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pew213>
5. Doytchinova, I.A., and Flower, D.R. 2007. Vaxijen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics* 8:4. <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/8/4> doi:10.1186/1471-2105-8-4
6. Feder, M.E., and Hofmann, G.E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61:243-282.
7. Hassan F-ul. et al. Nawaz, A., Rehman, M.S., Ali, M.A., Dilshade, M.S.R., Yang, C. 2019. Prospects of HSP70 as a genetic marker for thermo-tolerance and immuno-modulation in animals under climate change scenario. *Animal Nutrition* 5, 340e350. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.06.005>
8. Jespersen, M.C., Peters, B., Nielsen, M., Marcatili, P. 2017. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res* 45(W1):24-29. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx346>
9. Jurtz, V., Paul, S., Andreatta, M., Marcatili, P., Peters, B., and Nielsen, M. 2017. NetMHCpan-4.0: Improved Peptide-MHC Class I Interaction Predictions Integrating Eluted Ligand and Peptide Binding Affinity Data. *J Immunol.* DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700893>
10. Kelley, L.A., et al. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10, 845-858.
11. Kisworo, D., and Depamede, S.N. 2021. Bioinformatics analysis of structures and ligand-bindings of predicted zymogen granule protein observed on Bali cattle (*Bos javanicus*) saliva. *J Adv Vet Anim Res.* 8(2):224-229.
12. Koutsakos, M., McWilliam, H.E.G., Aktepe, T.E., Fritzlar, S., Illing, P.T., et al. 2019. Downregulation of MHC Class I Expression by Influenza A and B Viruses. *Front. Immunol.* 10:1158. [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org) doi: 10.3389/fimmu.2019.01158

13. Mugunthan, S.P., and Harish, M.C. 2021. Multi-epitope-Based Vaccine Designed by Targeting Cytoadherence Proteins of *Mycoplasma gallisepticum*. ACS Omega 2021, 6, 13742–13755. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c01032>.
14. Pishesha, N., Harmand, T.J., Rothlauf, P.W., Praest, P., Alexander, R.K., et al. 2021. A class II MHC-targeted vaccine elicits immunity against SARS-CoV-2 and its variants. PNAS 118 (44): e2116147118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2116147118>
15. Sadam, H., Pihlak, A., Jaago, M., Pupina, N., Rahni, A. et al. 2021. Identification of two highly antigenic epitope markers predicting multiple sclerosis in optic neuritis patients. EBioMedicine 64: 103211. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103211>
16. Shimoda, M. Li, T., Pihkala, J.P.S., and Koni, P.A. 2006. Role of MHC Class II on Memory B Cells in Post-Germinal Center B Cell Homeostasis and Memory Response1. *J Immunol* 2006; 176:2122-2133. doi: 10.4049/jimmunol.176.4.2122
17. Stranzl, T., Larsen, M.V., Lundegaard, C., Nielsen, M. 2010. NetCTLpan - Pan-specific MHC class I epitope predictions. Immunogenetics. PMID: 20379710.
18. Wass, M.N., Kelley, L.A., and Sternberg, M.J. 2010. 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures. Nucleic Acids Research 38, W469-73.
19. Xing, T., Wang, P., Zhao, L., Liu, R., Zhao, X., Xu, X., and Zhou, G. 2016. A comparative study of heat shock protein 70 in normal and PSE (pale, soft, exudative)-like muscle from broiler chickens. Poultry Science 95:2391–2396. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pew181>
20. Xing, T., Xu, X., Zhou, G., Wang, P., and Jiang, N. 2015. The effect of transportation of broilers during summer on the expression of heat shock protein 70, postmortem metabolism and meat quality. J. Anim. Sci. 93:62–70.
21. Zaboli, G., Huang, X., Feng X, Ahn, D.U. 2019. How can heat stress affect chicken meat quality? - a review. Poult Sci. 98(3):1551-1556. doi: 10.3382/ps/pey399.