



Prediksi Struktur 3D L-Asparaginase Bakteri Laut *Vibrio sp.* AND4 dengan Metode Homology Modelling

(Prediction of L-Asparaginase 3D structure of marine bacteria *Vibrio sp.* AND4 using homology modelling method)

Wulan Pertiwi*¹, Luthfia Hastiani Muharram¹, & Farhan Azhwin Maulana²

¹Universitas Muhammadiyah Bandung, Kota Bandung, Jawa Barat

²National Central University, Taoyuan City, Taiwan

ABSTRACT: L-asparaginase is an enzyme that hydrolyzes L-asparagine into L-aspartate and ammonia, which can treat Acute Lymphoblastic Leukemia. Determination of the 3D structure of L-asparaginase from various sources can provide important information in understanding the biochemical properties and functions of L-asparaginase at the molecular level for the search for alternative L-asparaginase as a therapeutic protein. This study aimed to predict the 3D structure of L-asparaginase II from the marine bacterium *Vibrio sp.* AND4 with *E.coli* L-asparaginase II mutant (T12V) in complex with L-Asn at pH 7.0 [*Escherichia coli* K-12] (PDB ID: 6PA9) as structure template using homology modelling method with the SWISS-MODEL program. The research produces a 3D structure model with a Sequence identity of 70.55%, has a QMEANDisCo value of 0.86±0.05, and a GMQE value of 0.86. There are 93.1% residues in the most favoured regions and 0.3% residues in disallowed regions in the Ramachandran plot, with G-Factors of -0.08, which fulfils the requirements of ideal structural quality.

Keywords: L-asparaginase; vibrio; SWISS-MODEL; homology modelling.

ABSTRAK: L-asparaginase merupakan enzim yang menghidrolisis L-asparagin menjadi L-aspartat dan ammonia yang dapat digunakan dalam terapi pengobatan Leukemia Limfoblastik Akut. Penentuan struktur 3D L-asparaginase dari berbagai sumber dapat memberikan informasi penting dalam memahami sifat dan fungsi biokimia L-asparaginase di level molekuler untuk penelusuran L-asparaginase alternatif sebagai protein terapeutik. Tujuan penelitian ini adalah memprediksi struktur 3D enzim L-asparaginase II dari bakteri laut *Vibrio sp.* AND4 dengan *E.coli* L-asparaginase II mutant (T12V) in complex with L-Asn at pH 7.0 [*Escherichia coli* K-12] (PDB ID: 6PA9) sebagai templat struktur, menggunakan metode pemodelan homologi dengan program SWISS-MODEL. Penelitian ini menghasilkan model struktur 3D dengan Sequence identity 70,55%, memiliki nilai QMEANDisCo 0,86±0,05 dan nilai GMQE sebesar 0,86. Terdapat 93,1% residu berada di daerah *the most favored regions* dan 0,3% residu berada di daerah *disallowed regions* pada *Ramachandran plot*, dengan *G-Factors* sebesar -0.08 yang memenuhi syarat-syarat kualitas struktur ideal.

Kata kunci: L-asparaginase; vibrio; SWISS-MODEL; pemodelan homologi.

Pendahuluan

L-asparaginase merupakan enzim yang menghidrolisis L-asparagin menjadi L-aspartat dan ammonia dan ditemukan di berbagai organisme mulai dari mikroba sampai mamalia [1]. Reaksi hidrolisis L-asparaginase ditunjukkan pada Gambar 1 [2].

L-asparaginase menurunkan konsentrasi asparagin dalam plasma sehingga sel kanker mati karena tidak mampu mensintesis protein akibat kekurangan suplai asparagin [3]. L-asparaginase merupakan salah satu agen kemoterapi dalam pengobatan Leukemia Limfoblastik Akut [4]. Pada bakteri gram negative seperti *Escherichia*

coli, memiliki L-asparaginase I dan L-asparaginase II. L-asparaginase I diekspresikan secara konstitutif di sitoplasma dan diperlukan untuk pertumbuhan bakteri dengan asparagin sebagai satu-satunya sumber nitrogen. Sebaliknya, L-asparaginase II diekspresikan dalam kondisi anaerob dalam medium yang berisi asam amino dengan konsentrasi tinggi dan gula dengan konsentrasi rendah, di dalam periplasma dan memiliki aktivitas antikanker [2,5-7].

Ekosistem laut merupakan sumber keanekaragaman hayati yang tinggi, sehingga menjanjikan

Article history

Received: 07 Sep 2022

Accepted: 05 Okt 2022

Published: 24 Okt 2022

Access this article



*Corresponding Author: Wulan Pertiwi

Universitas Muhammadiyah Bandung, Jl. Soekarno Hatta No.752, Cipadung Kidul, Kec. Panyileukan, Kota Bandung, Jawa Barat 40614 | Email: wulanpertiwi@umbandung.ac.id

untuk dijadikan sumber penghasil enzim baru dari bakteri laut yang memiliki keunikan tersendiri [8]. Baru-baru ini, L-asparaginase dari sumber bakteri laut telah diusulkan sebagai kandidat yang menjanjikan untuk aplikasi di bidang klinis dan makanan karena beberapa perbedaan fitur seperti struktur baru, berat molekul yang lebih rendah, dan spesifitas substrat yang tinggi [9,10].

Bakteri dalam genus *Vibrio* sering ditemukan di laut dan lingkungan estuaria atau berasosiasi dengan organisme laut seperti karang, ikan, cumi-cumi atau zooplankton [11]. Namun, beberapa spesies juga ditemukan di air tawar [12]. Beberapa genusnya terkenal patogen terhadap manusia yaitu *V. cholerae* dan *V. parahaemolyticus*, serta pada hewan laut yaitu *V. harveyi* [13,14]. *Vibrio* sp. AND4 wild type (Gammaproteobacteria) merupakan bakteri laut yang dapat bertahan hidup secara substansial saat terkena cahaya walaupun dalam kondisi kurang nutrisi jika dibandingkan di saat gelap [15].

Isozim yang berbeda dari enzim L-asparaginase telah diisolasi dari berbagai organisme, termasuk tumbuhan, mikroorganisme terestial, dan laut. Informasi terkait residu asam amino penting untuk aktivitas katalitik L-asparaginase. Struktur 3D L-asparaginase dari *Escherichia coli* dan *Erwinia* sp. telah diidentifikasi [16]. Struktur 3D L-asparaginase I dari *Vibrio campbellii* telah ditentukan dengan metode pemodelan homologi menggunakan EasyModeller v.4.0. Struktur divalidasi dengan *quality indexing tools* dan disimpan dalam basis data model protein. *Molecular docking* dilakukan antara L-asparaginase I dan substrat yang berupa asparagin untuk mempelajari interaksi enzim-substrat [17].

Prediksi struktur 3D protein dari sekuen asam amino masih menjadi permasalahan saintifik yang fundamental dan menjadi salah satu tantangan terbesar pada bidang biologi komputasi dan kimia. Pengetahuan dan pemahaman struktur 3D protein sangat penting karena dapat memberikan informasi penting dalam memahami sifat dan fungsi biokimia protein di level molekuler secara detail [18].

Struktur 3D protein sangat bernilai untuk dipelajari karena dapat menyediakan informasi terkait fungsi biokimia dan sifat protein tersebut. Saat ini penentuan struktur 3D protein masih relatif sulit untuk dilakukan karena memerlukan instrumen, biaya, waktu, dan usaha yang cukup besar [19]. Jumlah protein yang struktur tiga dimensinya telah ditentukan hasil serangkaian eksperimen saat ini (data terakhir 02 Juni 2022) adalah 191.144 yang disimpan dalam server *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics - Protein Data Bank (RCSB PDB)* [20,21]. Jumlah ini tentunya sangat sedikit dibandingkan dengan jumlah sekuen protein yang telah diketahui dan disimpan

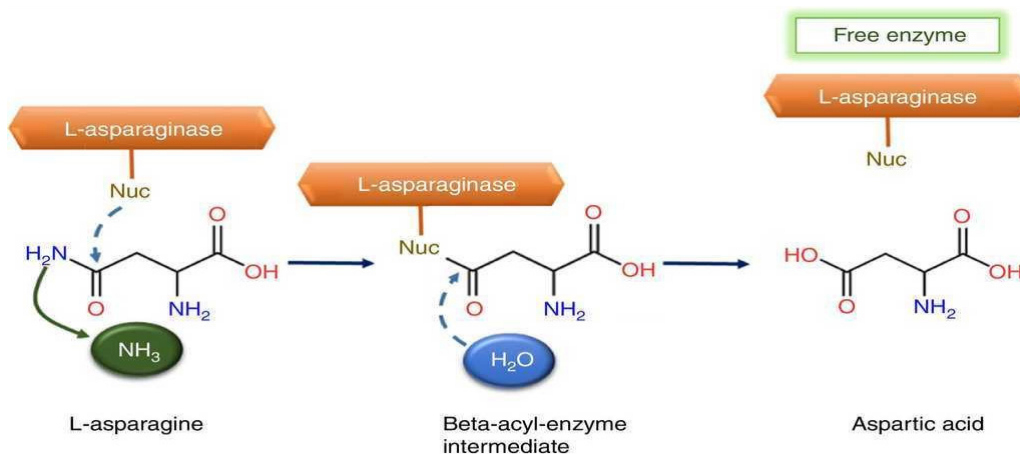
dalam server basis data *The Universal Protein Resource (Uniprot)* yang tercatat sebanyak 568.002 sekuen protein yang dianotasi secara manual dengan informasi yang diambil dari literatur dan analisis komputasi yang dievaluasi oleh kurator (*Reviewed/Swiss-Prot*), dan sebanyak 567.483 sekuen protein yang dianalisis secara komputasi dan menunggu anotasi manual secara penuh (*Unreviewed/TrEMBL*) [22].

Dalam memprediksi struktur 3D asam amino, terdapat empat tipe pendekatan berbeda yang biasa digunakan yaitu yang pertama adalah metode pemodelan komparatif atau pemodelan homologi (*homology modelling*) yang menggunakan struktur yang terelucidasi hasil eksperimen sebagai templat untuk memodelkan struktur 3D protein target. Metode kedua adalah *fold recognition* dan *threading methods* digunakan untuk memodelkan protein yang memiliki similaritas rendah dengan struktur protein yang telah diketahui. Metode ketiga adalah metode *de novo* (atau *ab initio*) yang bertujuan memprediksi struktur protein dari struktur primer sekuen protein menggunakan prinsip-prinsip fisika dalam mengatur pelipatan protein. Metode keempat adalah *integrative* atau *hybrid methods* yang menggabungkan informasi dari data komputasi dan eksperimen [18].

Metode pemodelan homologi menjadi metode paling akurat dalam membangun model struktur 3D protein [18]. Kemajuan terbaru dalam pemodelan homologi terutama dalam mendeteksi jarak homolog, menyelaraskan urutan dengan struktur templat, pemodelan loop dan rantai samping, serta mendeteksi kesalahan pada model struktur [23,24].

SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) adalah server sistem pemodelan yang terintegrasi berbasis web. Server ini memelopori bidang pemodelan otomatis mulai tahun 1993 dan merupakan fasilitas pemodelan otomatis berbasis web gratis yang paling banyak digunakan saat ini. Atas dasar *alignment* antara sekuen protein target dan struktur templat, model 3D untuk protein templat dapat dihasilkan [23,25].

Tujuan penelitian ini adalah memprediksi struktur 3D enzim L-asparaginase II dari bakteri laut *Vibrio* sp. AND4 dengan menggunakan program SWISS-MODEL. Struktur 3D L-asparaginase ini merupakan bahan simulasi *molecular docking* secara *in silico* dengan asparagin sebagai ligan, dalam proses pencarian enzim alternatif L-asparaginase yang dapat digunakan dalam terapi pengobatan Leukemia Limfoblastik Akut.



Gambar 1. Reaksi hidrolisis enzim L-asparaginase

Metode Penelitian

Penelitian dilakukan untuk memprediksi struktur 3D protein L-asparaginase dengan metode pemodelan homologi dengan tahapan menurut [26], yaitu: input data, pencarian templat, seleksi templat, pembuatan model struktur 3D, dan estimasi kualitas model.

Sekuen protein L-asparaginase II *Vibrio* sp. AND4 sebagai sekuen target diperoleh dari basis data sekuen protein Uniprot (<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=L-asparaginase+II+%5BVibrio+sp.+AND4%5D&sort=score>) dengan entry identifier A8T322. Sekuen protein A8T322 kemudian diunduh dalam format FASTA. Melalui RCSB-PDB [27] dipastikan bahwa struktur 3D L-asparaginase II *Vibrio* sp. AND4 belum ditentukan.

Protein A8T322 dimodelkan dengan menggunakan templat yang didapat dari hasil penyelarasan sekuen protein

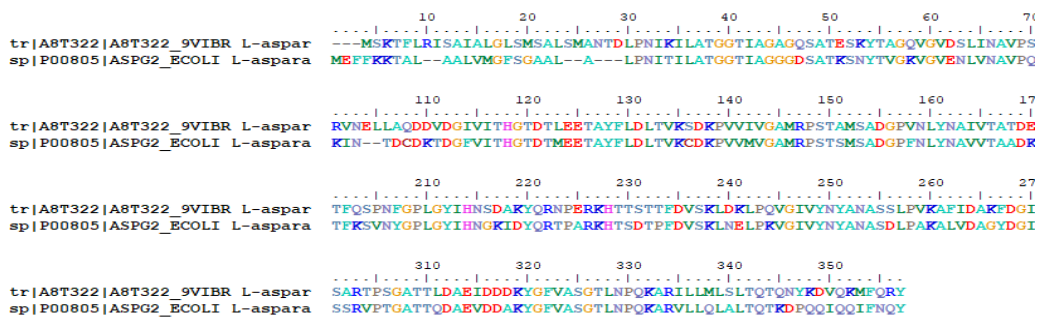
A8T322 dengan sekuen L-asparaginase yang terdapat pada basis data PDB melalui BLASTp di NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

Seleksi templat dilakukan dengan memperhatikan syarat-syarat templat menurut Fiser Andras, 2010 untuk mendapatkan model struktur 3D protein yang berkualitas tinggi, sehingga dapat memfasilitasi proses karakterisasi fungsional suatu protein [28]. Diambil struktur *E.coli* L-asparaginase II mutant (T12V) in complex with L-Asn at pH 7.0 [*Escherichia coli* K-12] (PDB ID: 6PA9/ Uniprot entry identifier: P00805) [29] sebagai struktur templat untuk pemodelan protein A8T322. Pairwise alignment residu sekuen protein A8T322 dengan sekuen protein P00805 dilakukan dengan menggunakan software BioEdit (RRID:SCR_007361) [30].

Pemodelan A8T322 menggunakan metode pemodelan homologi (*homology modelling*) menggunakan

Tabel 1. Karakteristik kandidat templat diakses melalui NCBI, RCSB-PDB dan Uniprot

Kandidat Templat (PDB ID)	Karakteristik			Karakteristik			
	Percent Identity	Query Coverage	E-Value	Ligan	Resolusi	R- Value	di Uniprot
6PA9	70,12%	92%	2e-171	Asparagin (ASN), Gliserol (GOL)	1.88 Å	R-Value Free: 0.216 R-Value Work: 0.162	L-asparaginase 2
7A0U	69,82%	92%	4e-171	-	2.26 Å	R-Value Free: 0.240 R-Value Work: 0.171	Glutathione reductase atau 3-demethoxy-ubiquinol 3-hydroxylase
3ECA	71,04%	92%	7e-166	Aspartat (ASP)	2.40 Å	R-Value Free: - R-Value Work: 0.111	CRISPR-associated nuclease/helicase Cas3 subtype I-F/YPEST



Gambar 2. Pairwise alignment sekuen target (A8T322) dengan sekuen templat (P00805/6PA9)

SWISS-MODEL [31,32], yang merupakan fasilitas *homology modelling* otomatis menggunakan metode prediksi komparatif struktur, berdasarkan pada alignment sekuen asam amino protein target dengan protein homolog yang telah diketahui struktur 3D-nya melalui eksperimen di laboratorium [33]. Estimasi dan evaluasi kualitas model struktur 3D protein A8T322 dilakukan dengan pengamatan persentase residu pada *Ramachandran plot* dan *overall G-Factors* menggunakan PROCHECK PDBSum [34].

Hasil dan Diskusi

Pentingnya keberadaan struktur 3D L-asparaginase bakteri *Vibrio* sp. AND4 hasil *homology modelling* adalah menambah informasi terkait struktur 3D L-asparaginase laut sehingga dapat dijadikan model untuk memahami sifat dan fungsi L-asparaginase laut di tingkat molekuler secara detil.

Pemodelan homologi pada sekuen protein A8T322 dilakukan dengan tahapan yang mengacu pada [26]. Sekuen target dalam pemodelan struktur 3D protein merupakan sekuen protein yang belum teridentifikasi struktur tiga dimensinya secara eksperimental [35]. Struktur protein A8T322 belum tersedia dalam *web server* basis data struktur

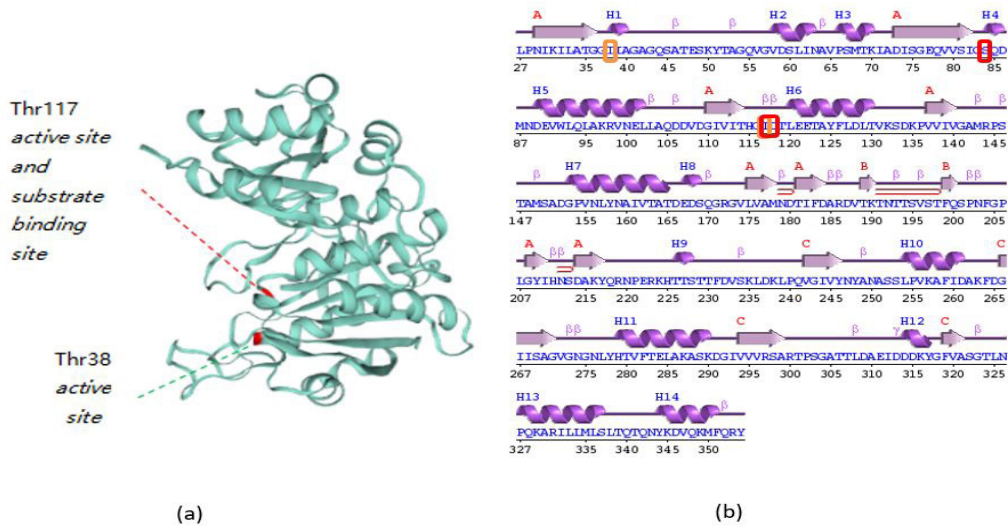
protein RCSB PDB (<https://www.rcsb.org>), sehingga pemodelan struktur 3D protein A8T322 dapat dilakukan.

Pemilihan templat didasarkan pada syarat-syarat templat yang ideal menurut [28], yaitu: memilih struktur dengan similaritas yang tinggi terhadap sekuen target juga memiliki kesamaan sisi pengikatan pada ligan yang sama seperti pada sekuen target. Kualitas struktur templat yang ditentukan secara eksperimental tergantung pada resolusi dan *R-factor* dari struktur kristal proteinnya. Diambil tiga kandidat templat yang merupakan hasil BALSTp protein A8T322 terhadap basis data protein L-asparaginase dengan stuktur tiga dimensi yang sudah teridentifikasi di PDB RCSB. Kandidat pertama adalah struktur *E.coli L-asparaginase II mutant (T12V) in complex with L-Asn at pH 7.0 [Escherichia coli K-12]* (PDB ID: 6PA9) [29], kedua adalah *Chain A, L-asparaginase 2 0 [Escherichia coli K-12]* (PDB ID: 7A0U) [36], dan ketiga adalah *Crystal structure of Escherichia coli L-asparaginase (ELSPAR) [Escherichia coli K-12]* (PDB ID: 3ECA) [37]. Karakteristik ketiga kandidat templat ditunjukkan pada Tabel 1.

R-value (*R-value work* dan *R-value free*) adalah ukuran kualitas model atom yang diperoleh dari data kristalografi [38]. *R-value* mengukur seberapa cocok pola difraksi pada model atom yang disimulasikan dengan pola difraksi yang diamati pada struktur secara eksperimental, dan kecocokan

Tabel 2. Posisi fitur-fitur yang ada pada sekuen A8T322 dan sekuen P00805/6PA9

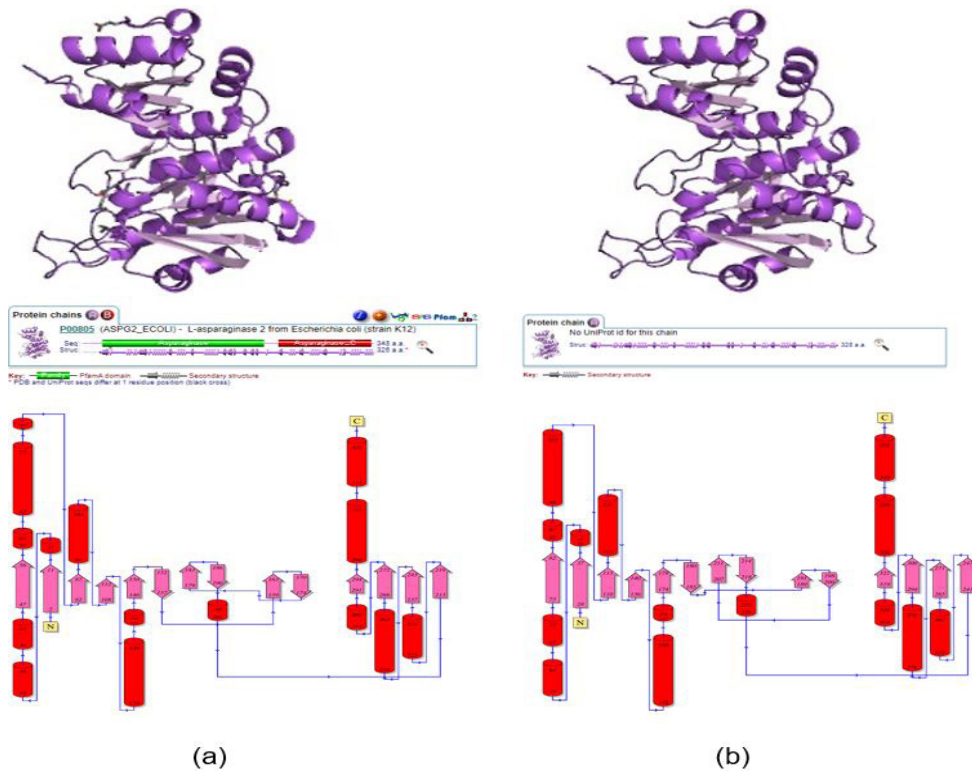
Fitur	Posisi dan deskripsi fitur pada sekuen protein			
	A8T322		P00805/6PA9	
Sinyal Peptida	1-23	MSKTFLRISAIALGLSM-SALSMA	1-22	MEFFKKTALAALVMGFSGAALA
Sisi Aktif	38 dan 117	O-isospartyl threonine intermediate	34	O-isospartyl threonine intermediate
Sisi Pengikatan Substrat	84 dan 117-118		80-81 dan 111-112	
Domain	29-222 dan 241-351	Asparaginase dan Asparaginase C	24-348	Asparaginase/ Glutaminase



Gambar 3. Hasil pemodelan homologi dengan SWISS-MODEL, (a) Struktur hasil pemodelan A8T322 dengan struktur templat P00805/6PA9, (b) Kotak hijau adalah sisi aktif, kotak merah adalah sisi pengikatan substrat

sempurna akan memiliki nilai 0 [39]. Pada resolusi diantara 1,5 dan ~3 Å, *R-factor* identik hampir di semua struktur yaitu ~0.20 [40]. Kualitas struktur yang baik memiliki *R-factor* di bawah 20-25% dengan *R-value free* sebesar di bawah 30% [41]. Dari Tabel 1 ditetapkan bahwa templat yang cocok untuk pemodelan sekuen protein A8T322 adalah struktur *E.coli L-asparaginase II mutant (T12V) in*

complex with L-Asn at pH 7.0 [Escherichia coli K-12] (PDB ID: 6PA9; Uniprot entry id: P00805) karena memiliki *percent identity* yang relatif tinggi (70,12%) dengan *query coverage* yang tinggi (92%), *E-value* yang lebih rendah (2e-171) dibanding dua kandidat lain dan memiliki *R-value free* yang berada di bawah 30% (0,30) yaitu 0,216, lebih rendah dibanding kandidat lain. Struktur ini memiliki ligan



Gambar 4. Perbandingan struktur dan diagram topologi struktur templat (P00805) dan target (A8T322) melalui PDBSum, (a)Templat: P00805/6PA9, chain A, 326 aa, (b)Target: A8T322 chain A, 328 aa

Tabel 3. Statistika PROCHECK struktur templat (P00805/6PA9) dan target (A8T322)

Ramachandran plot dan G-Factors	L-Asparaginase	
	P00805/6PA9	A8T322
Most favoured regions [A,B,L]	91.3%	93.1%
Additional allowed regions [a,b,l,p]	8.1%	6.2%
Generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	0.2%	0.3%
Disallowed regions [XX]	0.4%*	0.3%*
G-Factors	-0,12	-0,08

asparagin (ASN) yang merupakan substrat L-asparaginase, serta teridentifikasi sebagai L-asparaginase 2 pada Uniprot, sementara kandidat lain teridentifikasi sebagai Glutathione reductase atau 3-demethoxyubiquinol 3-hydroxylase dan CRISPR-associated nuclease/helicase Cas3 subtype I-F/ YPEST.

Hasil *pairwise alignment* sekuen protein target (A8T322) terhadap sekuen protein templat (P00805/6PA9) pada [Gambar 2](#) menunjukkan *percent identity* sebesar 67,22% dan *similarity* sebesar 79,83% dengan 22-23 peptida pertama merupakan sinyal peptide.

Posisi fitur-fitur seperti sinyal peptida, sisi aktif, sisi pengikatan substrat dan domain pada masing-masing sekuen memiliki posisi yang hampir sama. Perbandingan posisi fitur yang ada dalam sekuen A8T322 dan P00805/6PA9 pada server Uniprot seperti ditunjukkan pada [Tabel 2](#).

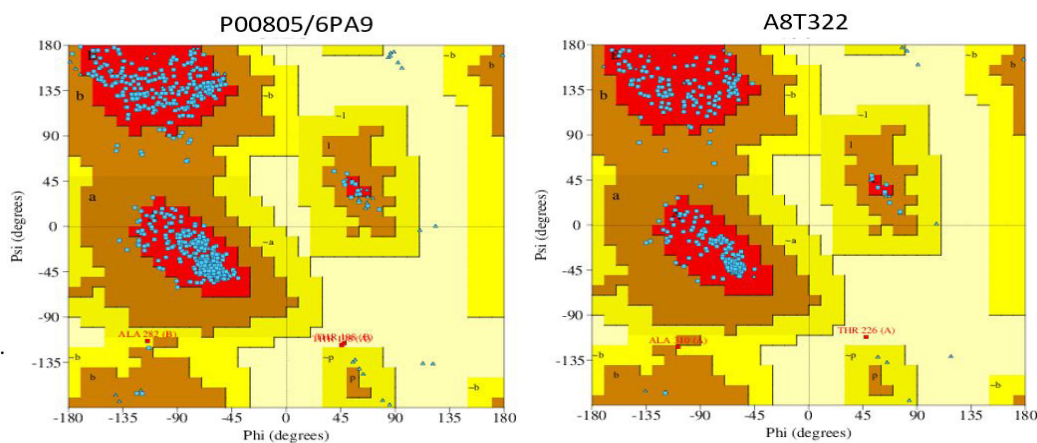
Hasil pemodelan homologi menggunakan SWISS-MODEL sekuen target (A8T322) dengan struktur templat (P00805/6PA9) ditunjukkan pada [Gambar 3](#).

Nilai QMEANDisCo sekarang menjadi prediktor kualitas model global utama di seluruh Layanan SWISS-

MODEL. Bersama dengan GMQE (*Global Model Quality Estimation*), memberikan pengukuran kualitas model keseluruhan dengan skor 0 dan 1. Ambang batas (*threshold*) nilai QMEANDisCo adalah 0,5 yang secara signifikan menyaring model berkualitas rendah bila dibandingkan dengan kriteria berbasis QMEAN Z-score sebelumnya [\[42,43\]](#) yang mengukur derajat keaslian suatu struktur [\[44\]](#). Nilai QMEANDisCo pada model 3D sekuen A8T322 ini adalah $0,86 \pm 0,05$ dan nilai GMQE sebesar 0,86. *Sequence identity* hasil pemodelan adalah 70,55%. *Sequence identity* target-templat di atas 30% merupakan prediktor yang relatif baik dari akurasi yang diharapkan dari model [\[28\]](#). Perbandingan struktur dan diagram topologi struktur templat (P00805/6PA9) dan target (A8T322) yang dihasilkan PDBSum [\[34\]](#) dapat dilihat pada [Gambar 4](#).

Estimasi kualitas struktur dapat diperoleh dari hasil statistika PROCHECK melalui *Ramachandran plot* dan nilai keseluruhan *G-Factors*. *Ramachandran plot* menentukan kualitas struktur protein dengan melihat plot residu [\[45\]](#).

Evaluasi *Ramachandran plot* sangat penting dalam penilaian kualitas struktur 3D protein yang dimodelkan, karena *Ramachandran plot* merupakan *quality metrics* utama



Gambar 5. *Ramachandran plot* struktur templat (P00805/6PA9) dan target (A8T322)

dalam validasi kualitas model atom pada protein [46] *Ramachandran plot* menjelaskan distribusi dua dimensi dari sudut torsi (ϕ , ψ) asam-asam amino, dan telah digunakan untuk memvalidasi konformasi dari *backbone* protein yang terintegrasi dalam PROCHECK [47], validasi tersebut didasarkan pada wilayah yang disukai (*favoured regions*) dan wilayah yang tidak diizinkan (*disallowed regions*) [48], sedangkan *G-Factors* memberikan ukuran seberapa tidak biasa (*unusual*), atau sangat tidak biasa (*highly unusual*) suatu sifat (protein). Struktur dengan kualitas baik diharapkan memiliki lebih dari 90% residu di daerah *the most favoured regions* [A,B,L] dengan nilai *G-factors* di atas -0,5. Nilai di bawah -0,5 *unusual* dan nilai di bawah -1,0 *highly unusual* [49]. *Ramachandran plot* struktur templat (P00805/6PA9) dan target (A8T322) dapat dilihat pada Gambar 5, dan hasil statistika PROCHECK struktur templat (P00805/6PA9) dan target (A8T322) dapat dilihat pada Tabel 3.

Pada struktur templat (P00805/6PA9), terdapat 91,3% residu berada di daerah *the most favored regions* dan 0,4% berada di daerah *disallowed regions* pada *Ramachandran plot*, dengan *G-Factors* sebesar -0.12. Sedangkan pada struktur target (A8T322), terdapat 93,1% residu berada di daerah *the most favored regions* dan 0,3% berada di daerah *disallowed regions* pada *Ramachandran plot*, dengan *G-Factors* sebesar -0.08. Kualitas struktur model 3D protein A8T322 dapat dikatakan baik karena memenuhi syarat-syarat struktur ideal, yaitu memiliki sebaran residu lebih dari 90% di daerah *the most favoured regions*, memiliki sedikit residu di daerah *disallowed regions* dan memiliki nilai keseluruhan *G-Factors* di atas -0,5.

Kesimpulan

Pemodelan homologi protein L-asparaginase II *Vibrio* sp. AND4 (A8T322) menggunakan struktur *E.coli* L-asparaginase II mutant (T12V) in complex with L-Asn at pH 7.0 [*Escherichia coli* K-12] (P00805/6PA9) sebagai templat, menghasilkan model struktur 3D dengan *Sequence identity* 70,55%, memiliki nilai QMEANDisCo $0,86 \pm 0,05$ dan nilai GMQE sebesar 0,86. Terdapat 93,1% residu berada di daerah *the most favored regions* dan 0,3% berada di daerah *disallowed regions* pada *Ramachandran plot*, dengan *G-Factors* sebesar -0.08. Karena memenuhi syarat-syarat struktur ideal, maka kualitas struktur model 3D L-asparaginase II *Vibrio* sp. AND4 dapat dikatakan baik.

Referensi

[1]. S. Zuo, T. Zhang, B. Jiang, and W. Mu, "Recent research progress on microbial L-asparaginases," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 99, no. 3, 2014, [Online]. Available: doi:10.1007/s00253-014-6271-9.

[2]. J. J. M. Cachumba, F. A. F. Antunes, G. F. D. Peres, L. P. Brumano, J. C. Dos Santos, and S. S. Da Silva, "Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production," *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 47, pp. 77–85, 2016, doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.004.

[3]. S. Nagarethinam, A. Nagappa, N. Udupa, V. Rao, and M. Balashanmugam, "M. Microbial L-Asparaginase and its future prospects," *Asian J. Med. Res.*, vol. 1, no. 4, pp. 159–160, 2012.

[4]. A. Emadi, H. Zokaei, and E. Sausville, "Asparaginase in the treatment of non-ALL hematologic malignancies," *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 73, pp. 875–883, 2014.

[5]. M.-K. Yun, A. Nourse, S. White, C. Rock, and J. Heath, "Crystal Structure and Allosteric Regulation of the Cytoplasmic *Escherichia coli* L-Asparaginase I," *J Mol Biol*, vol. 369, no. 3, pp. 794–811.

[6]. T. Del Casale, P. Sollitti, and R. H. Chesney, "Cytoplasmic L-asparaginase: Isolation of a defective strain and mapping of ansA," *J. Bacteriol.*, vol. 154, no. 1, pp. 513–515, 1983, doi: 10.1128/jb.154.1.513-515.1983.

[7]. J. P. Whitecar, G. P. Bodey, J. E. Harris, and E. J. Freireich, "L-Asparaginase," *N. Engl. J. Med.*, vol. 282, no. 13, pp. 732–734, 1970, doi: doi:10.1056/nejm197003262821307.

[8]. D. Zilda, G. Patantis, S. Prawira, M. Sibero, and Y. Fawzya, "Penapisan dan Identifikasi Bakteri Penghasil Agarase dari Sampel Sedimen Laut Bara Caddi Sulawesi Selatan," *J. Pascapapan dan Bioteknol. Kelaut. dan Perikan.*, vol. 16, no. 1, pp. 11–21, 2021.

[9]. M. Sahu, E. Poorani, K. Sivakumar, T. Thangaradjou, and L. Kannan, "Partial purification and anti-leukemic activity of L-asparaginase enzyme of the actinomycete strain LA-29 isolated from the estuarine fish, *Mugil cephalus* (Linn.)," *J. Environ. Biol.*, vol. 28, no. 3, p. 645, 2007.

[10]. Z. Sun et al., "A novel bacterial type II L-asparaginase and evaluation of its enzymatic acrylamide reduction in French fries," *Int. J. Bio. Macromol.*, vol. 92, pp. 232–239, 2016.

[11]. T. Vesth, T. M. Wassenaar, P. F. Hallin, L. Snipen, K. Lagesen, and D. W. Ussery, "On the origins of a *Vibrio* species," *Microbial Ecology*, vol. 59, no. 1, pp. 1–13, Jan. 2010, doi: 10.1007/s00248-009-9596-7.

[12]. C. A. Osunla and A. I. Okoh, "Vibrio pathogens: A public health concern in rural water resources in sub-Saharan Africa," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 14, no. 10, MDPI, Oct. 07, 2017, doi: 10.3390/ijerph14101188.

[13]. F. Thompson, T. Iida, and J. Swings, "Biodiversity of vibrios," *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 63, no. 3, pp. 403–431, 2004.

[14]. B. Austin and X. Zhang, "Vibrio harveyi: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 43, pp. 119–124, 2006.

[15]. N. Akram et al., "Regulation of proteorhodopsin gene expression by nutrient limitation in the marine bacterium *Vibrio* sp. AND4," *Environ. Microbiol.*, vol. 15, no. 5, pp. 1400–1415, May 2013, doi: 10.1111/1462-2920.12085.

[16]. T. Batool, E. Makky, M. Jalal, and M. Yusoff, "A Comprehensive review on L-asparaginase and its applications," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 178, no. 5, pp. 900–923, 2016.

[17]. A. K. S. Mohideen, "Molecular docking study of L-Asparaginase I from *Vibrio campbellii* in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL)," *EuroBiotech J.*, vol. 4, no. 1, pp. 8–16, Jan. 2020, doi: 10.2478/eibtj-2020-0002.

[18]. T. Schwede, A. Sali, N. Esvar, and M. C. Peitsch, "Protein Structure Modeling," 2008. [Online]. Available: www.worldscientific.com.

[19]. H. Wijaya and F. Hasanah, "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)," *Biopropal Ind.*, vol. 7, no. 2, pp. 83–94, 2016, [Online]. Available: <http://www.pdb.org/>.

[20]. H. Berman, K. Henrick, H. Nakamura, and J. L. Markley, "The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): Ensuring a single, uniform archive of PDB data," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. SUPPL. 1, pp. 2006–2008, 2007, doi: 10.1093/nar/gkl971.

[21]. RCSB-PDB, "A Structural View of Biology," 2022.

[22]. Uniprot, "Uniprot Knowledgebase," 2022.

- [23]. L. Bordoli, F. Kiefer, and K. Arnold, "Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace," *Nat Protoc*, vol. 4, pp. 1–13, 2009, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.197>.
- [24]. Z. Xiang, "Advances in Homology Protein Structure Modeling," 2006. [Online]. Available: <http://www.rscb.org>.
- [25]. T. Schwede, J. Kopp, N. Guex, and M. C. Peitsch, "SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server," *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 13, pp. 3381–3385, Jul. 2003, doi: 10.1093/nar/gkg520.
- [26]. A. Waterhouse et al., "SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes," *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. W1, pp. W296–W303, Jul. 2018, doi: 10.1093/nar/gky427.
- [27]. H. Berman et al., "The Protein Data Bank," *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, vol. 58, no. (Pt 6 No 1), pp. 899–907, 2002.
- [28]. A. Fiser, "Template-based protein structure modeling," *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), vol. 673, pp. 73–94, 2010, doi: 10.1007/978-1-60761-842-3_6.
- [29]. J. Lubkowski and A. Wlodawer, "Geometric considerations support the double-displacement catalytic mechanism of L-asparaginase," *Protein Sci.*, vol. 28, no. 10, pp. 1850–1864, 2019, doi: 10.1002/pro.3709.
- [30]. T. Hall, "BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT," *Nucleic Acids Symp. Ser.*, vol. 41, pp. 95–98, 1999.
- [31]. M. Biasini et al., "SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information," *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. W1, pp. 252–258, 2014, doi: 10.1093/nar/gku340.
- [32]. S. Bienert et al., "The SWISS-MODEL Repository-new features and functionality," *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. D1, pp. D313–D319, 2017, doi: 10.1093/nar/gkw1132.
- [33]. A. Šali and T. L. Blundell, "Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints," *J. Mol. Biol.*, vol. 234, no. 3, pp. 779–815, 1993, doi: doi:10.1006/jmbi.1993.1626.
- [34]. R. A. Laskowski, J. Jabłońska, L. Pravda, R. S. Vařeková, and J. M. Thornton, "PDBsum: Structural summaries of PDB entries," *Protein Sci.*, vol. 27, no. 1, pp. 129–134, 2018, doi: 10.1002/pro.3289.
- [35]. N. Komari, S. Hadi, and E. Suhartono, "Pemodelan Protein dengan Homology Modeling menggunakan SWISS-MODEL," *J. Jejaring Mat. dan Sains*, vol. 2, no. 2, pp. 65–70, 2020, doi: 10.36873/jjms.2020.v2.i2.408.
- [36]. M. Maggi and C. Scotti, "LIGAND FREE TYPE II E. COLI ASPARAGINASE T12S/T89S DOUBLE MUTANT," *Protein Data Bank*, 2020, [Online]. Available: https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00007a0u.
- [37]. A. Swain, M. Jaskolski, D. Housset, J. Rao, and A. Wlodawer, "Crystal structure of Escherichia coli L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 90, pp. 1474–1478, 1993.
- [38]. J. Wang, "Estimation of the quality of refined protein crystal structures," *Protein Sci.*, vol. 24, no. 5, pp. 661–669, 2015, doi: 10.1002/pro.2639.
- [39]. P. D. B. (PDB-101), "R-value and R-free," Educational portal PDB. 2022.
- [40]. G. J. Kleywegt and T. A. Jones, "Good Model-building and Refinement Practice," in *Methods in Enzymology*, 1997, pp. 208–230.
- [41]. J.-M. Rondeau and H. Schreuder, "Protein Crystallography and Drug Discovery," in *The Practice of Medicinal Chemistry (Fourth Edition)*, 2015, pp. 511–537.
- [42]. SwissModel, "Model Quality with QMEANDisCo." University of Basel, 2021, [Online]. Available: <https://swissmodel.expasy.org/docs/blog#structureComparison>.
- [43]. S. Seprianto, "Laporan Workshop Bioinformatika ' BIOINFORMATIKA UNTUK PROTEIN MODELLING ' Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia (PPBBI)," no. April, pp. 17–18, 2018.
- [44]. P. Benkert, M. Biasini, and T. Schwede, "Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models," *Bioinformatics*, vol. 27, no. 3, pp. 343–350, 2011, doi: 10.1093/bioinformatics/btq662.
- [45]. R. V. Mannige, J. Kundu, and S. Whitelam, "The Ramachandran Number: An Order Parameter for Protein Geometry," *PLoS One*, vol. 11, no. 8, pp. 1–14, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0160023.
- [46]. G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, and V. Sasisekharan, "Stereochemistry of polypeptide chain configurations," *J. Molecular Biol.*, vol. 7, no. 1, pp. 95–99, 1963.
- [47]. R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss, and J. M. Thornton, "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures," *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 26, no. 2, pp. 283–291, 1993, doi: 10.1107/s0021889892009944.
- [48]. S. Tinggi and F. Muhammadiyah, "Junaidin, Shinta Chae UDQL 1XU¶DILIDK +XVQLDK)DGOD 2019," vol. VI, no. 1, pp. 1–7, 2019.
- [49]. EMBL-EBI, "Procheck Statistics," 2022, [Online]. Available: <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases>.



Copyright © 2021 The author(s). You are free to share (copy and redistribute the material in any medium or format) and adapt (remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially) under the following terms: Attribution — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; ShareAlike — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)