



PENGUJIAN POTENSI ALERGENITAS COAT PROTEIN OF SUGARCANE MOZAIC VIRUS PADA TANAMAN TEBU TRANSGENIK

Assesment of Potential Allergenicity of Coat Protein of Sugarcane Mozaic Virus in Transgenic Sugarcane

Avif Firdausy Septian^{1,2}, Intan Ria Neliana², Banun Kusumawardani^{1,2,3}, Bambang Sugiharto^{1,2,4*}

¹Prodi Magister Bioteknologi, Program Pascasarjana, Universitas Jember Jl. Kalimantan 37, Jember 68121

²UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi - CDAST, Universitas Jember Jl. Kalimantan 37, Jember 68121

³Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember Jl. Kalimantan 37, Jember 68121

⁴Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember Jl. Kalimantan 37, Jember 68121

*Email: sugiharto.fmipa@unej.ac.id

ABSTRACT

Sugarcane resistant to sugarcane mosaic virus (SCMV) was developed by overexpression of gene for coat protein (CP). Therefore, this study aimed at investigating the potential allergenicity of CP-SCMV in transgenic sugarcane. Allergenicity was assessed by analysis in silico and in vitro. In silico analysis using AllergenOnline FASTA alignment of full-length CP-SCMV amino acid showed that the protein had no similarity with allergen protein. However, the alignment using 80 mer CP-SCMV showed over 35% similarity, but this result was considered as false positive. In silico analysis on digestion capability of protease found the cutting sites of CP-SCMV by pepsin, trypsin and chymotrypsin. This result was further confirmed by in vitro gastrointestinal digestion in that CP-SCMV was digested by pepsin and trypsin. Although CP-SCMV was less degraded by in vitro heat treatment and quantitatively underwent slight decrease after 30-minute heating on 90 °C, the protein might lose its function. These results indicated that CP-SCMV was considered having no potential allergen in transgenic sugarcane resistant to SCMV.

Keywords: *allergenicity, coat protein SCMV, in silico, in vitro, transgenic sugarcane*

ABSTRAK

Tebu tahan *sugarcane mosaic virus* (SCMV) dirakit melalui overekspresi gen untuk *coat protein* (CP). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan menguji alergenitas CP-SCMV pada tebu transgenik. Pengujian alergenitas dilakukan melalui analisis *in silico* dan *in vitro*. Hasil analisis *in silico* dengan pensejajaran *AllergenOnline FASTA full-length* asam amino CP-SCMV menunjukkan tidak ada kesamaan dengan protein alergen. Namun demikian pada pensejajaran 80 mer, CP-SCMV mempunyai kemiripan di atas 35% dengan alergen, tetapi hasil ini memiliki kecenderungan positif palsu. Analisis *in silico* terhadap kemampuan cerna protease ditemukan adanya sisi pemotongan CP-SCMV oleh enzim pensin, *trypsin* dan *chymotrypsin*. Hasil ini dikonfirmasi lebih lanjut dengan analisis *in vitro* pencernaan gastrointestinal yang menunjukkan bahwa CP-SCMV terdegradasi oleh pepsin dan *trypsin*. Walaupun hasil analisis *in vitro* menunjukkan CP-SCMV kurang dipengaruhi oleh perlakuan panas dan hanya sedikit berkurang pada pemanasan 90 °C selama 30 menit, tetapi mungkin fungsi protein telah rusak. Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa CP-SCMV pada tanaman tebu transgenik tahan virus tidak berpotensi sebagai alergen.

Kata Kunci: alergenitas, coat protein SCMV, *in silico*, *in vitro*, tebu transgenik

PENDAHULUAN

Sugarcane mosaic virus (SCMV) merupakan virus yang menginfeksi tanaman tebu dengan gejala berupa bercak kuning sampai klorosis terutama pada daun muda serta menyebabkan produktivitas tebu berkurang hingga 45% (Darsono et al. 2018, Hidayati et al. 2021). SCMV pada tebu menular melalui vektor serangga aphid dan melalui akar tebu yang terinfeksi (Braidwood et al. 2019). SCMV menginfeksi tanaman tebu secara luas di beberapa negara, termasuk Indonesia (Addy et al. 2017, Xu et al. 2019). Penelitian terbaru menunjukkan jumlah tanaman tebu yang terinfeksi SCMV di Jawa Timur mencapai 78% dengan tingkat keparahan penyakit sebesar 65% (Addy et al. 2017). Saat ini, upaya yang telah dilakukan untuk mencegah infeksi SCMV adalah menggunakan teknik *pathogen-derived resistance* (PDR) (Apriasti et al. 2018) dan RNA Interference (Widyaningrum et al. 2021). PDR merupakan teknik memasukkan gen atau DNA virus dengan tujuan terekspresi dan terinduksinya sistem ketahanan pada tanaman transgenik (Apriasti et al. 2018) sedangkan RNA interference merupakan suatu mekanisme ketahanan dengan memblokir ekspresi dari virus pada tahap transkripsi melalui siRNA sehingga materi genetik virus terhambat terekspresi dan virus terhambat bereplikasi (Widyaningrum et al. 2021).

Tanaman tebu tahan SCMV yang dirakit melalui teknik PDR didapat melalui overekspresi gen untuk *coat* protein SCMV (CP-SCMV) (Yao et al. 2017, Apriasti et al. 2018). Ekspresi CP-SCMV pada tebu transgenik PDR dapat memblokir proses replikasi SCMV sehingga proses infeksi terhambat (Lindbo dan Falk 2017). Tebu transgenik PDR menggunakan CP-SCMV terbukti memiliki resistensi terhadap infeksi SCMV hingga 100% (Apriasti et al. 2018) dan memiliki produktivitas agronomi yang lebih tinggi dibanding dengan galur murni/non transgenik (Yao et al. 2017).

Proses pemanfaatan tanaman transgenik sebagai bahan pangan diperlukan pengujian keamanan lingkungan, serta keamanan terhadap kesehatan manusia dan hewan (Liu et al. 2014). Salah satu pengujian terkait keamanan dan kesehatan manusia yaitu pengujian protein baru atau substansi

baru dari tanaman transgenik yang dikhawatirkan dapat bersifat alergen (Pandey et al. 2010). Organisasi keamanan pangan internasional seperti *Codex Alimentarius Commission* (CAC) yang dibentuk oleh organisasi kesehatan dunia (WHO) bersama organisasi pertanian dunia (FAO) melakukan kesepakatan yang bertujuan menstandarisasi uji keamanan pangan produk rekayasa genetik (Alonso 2013, Goodman 2014) dan telah diratifikasi oleh pemerintah Indonesia dalam Peraturan Pemerintah Nomer 21 Tahun 2005. Pengujian keamanan pangan bertujuan untuk menjamin dan melindungi kesehatan manusia (Giraldo et al. 2019).

Salah satu uji keamanan pangan tanaman transgenik menurut CAC adalah uji alergenitas. Pengujian potensi alergenitas protein baru yang diekspresikan pada tanaman transgenik mencakup prediksi *in silico* potensi terjadinya reaksi silang antara protein baru terhadap protein alergen yang telah tercantum dalam *database online*, analisis stabilitas panas dan analisis stabilitas cerna secara *in vitro* serta analisis *in vivo* pada hewan coba untuk validasi dan evaluasi potensi alergi (Privalle et al. 2011, Ladics 2018).

Studi potensi alergenitas CP-SCMV pada tanaman tebu transgenik PDR belum pernah dilakukan sebelumnya. Penelitian ini bertujuan untuk menguji potensi alergenitas CP-SCMV secara *in silico* dan *in vitro* melalui pengujian stabilitas cerna dan stabilitas panas. CP-SCMV yang digunakan pada penelitian ini adalah protein murni rekombinan yang diekspresikan pada bakteri *Escherichia coli* (Darsono et al. 2018) dan CP-SCMV yang diekspresikan pada tebu transgenik (Apriasti et al. 2018).

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Biologi Molekul dan Bioteknologi, UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi, Universitas Jember. Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei hingga Desember 2020.

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu bakteri rekombinan *E. coli* strain BL21 mengandung plasmid pET28a-CP

(Darsono et al. 2018), tanaman tebu transgenik (Apriasti et al. 2018) yang mengekspresikan CP-SCMV dan tanaman tebu kontrol non transgenik yang terinfeksi virus SCMV berumur 6 bulan.

Pengujian *in silico* alergenitas CP-SCMV

Gen pengkode CP-SCMV isolat PS-881 (*Accession number* NCBI MH393888.1) ditranslasi menggunakan ExPasy (<https://web.expasy.org/translate/>). Analisis urutan asam amino CP-SCMV dilakukan menggunakan *website AllergenOnline database* (<http://www.allergenonline.org/>) versi 21 yang diakses pada Mei 2020. Prediksi potensi alergenitas dilakukan dengan pensejajaran sekuen *full-length* dan 80 mer asam amino untuk menentukan prediksi alergi berdasarkan kemiripan urutan asam amino CP-SCMV dengan protein *allergen database*.

Urutan asam amino CP-SCMV juga dianalisis *in silico* menggunakan ExPASy (https://web.expasy.org/peptide_cutter/) untuk memprediksi kemungkinan sisi pemotongan protein oleh protease. Enzim pepsin, trypsin dan chymotrypsin digunakan pada analisis ini untuk memprediksikan kemampuannya mencerna CP-SCMV (Rathinam et al. 2017).

Isolasi DNA

Isolasi DNA plasmid pET28a-CP dari bakteri transforman CP-SCMV diawali dengan menumbuhkan koloni tunggal *E. coli* transforman pada 5 mL media LB mengandung antibiotik kanamisin 50 ppm selama 16 jam. Sel bakteri diperoleh dengan sentrifugasi kultur bakteri pada kecepatan 6000 rpm, 4 °C selama 10 menit. Plasmid diisolasi dari pelet bakteri menggunakan kit isolasi plasmid (Tiangen, Beijing China) dan dikonfirmasi keberadaan gen CP-SCMV menggunakan PCR (Biorad, USA).

Isolasi DNA tebu transgenik CP-SCMV dilakukan menggunakan metode SDS seperti yang dilakukan Apriasti et al (2018). Sebanyak 0,5 g daun tebu digerus dengan menggunakan nitrogen cair dan ditambahkan 1 mL buffer ekstraksi (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% SDS dan 5 mM 2-mercaptoethanol). Sampel disentrifugasi 12.000 rpm, 4 °C selama 10 menit. Pada supernatan ditambahkan PCI (phenol:chloroform:isoamil-alkohol dengan perbandingan 25:24:1) sebanyak 500 µL dan

divortek. Sampel disentrifugasi 12.000 rpm, pada suhu kamar selama 10 menit. Supernatan ditransfer ke mikrotube baru dan DNA dipresipitasi dengan isopropanol. Sampel disentrifugasi pada 12.000 rpm, 4 °C selama 10 menit. DNA dilarutkan menggunakan 20 µL buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA) dan ditambahkan 2 µL RNase 10 mg mL⁻¹ dan diinkubasi pada 37 °C.

PCR DNA

PCR dilakukan dengan menambahkan masing-masing DNA plasmid dan DNA tanaman pada reaksi mix (2x) PCR (Promega, USA) yang telah ditambahkan primer spesifik CP (Forward: 5'-CCCATATGACAGTCGATGCAGGTGCTC-3'; Reverse: 5'-ATGGATCCTAGTGGTGCTGCTGCACTCCC-3') dengan hasil amplifikasi berukuran 950 bp. Reaksi PCR dilakukan dengan program *pre-denaturation* 95 °C, 5 menit; diikuti dengan *denaturation* 95 °C, 30 detik; *anealling* 58 °C, 30 detik; *extension* 72 °C, 1 menit sebanyak 40x siklus dan diakhiri dengan *final extension* 72 °C, 10 menit. Produk PCR divisualisasi dengan elektroforesis menggunakan 1% gel agarose dan ethidium bromide. Pita DNA dilihat menggunakan sinar UV dan didokumentasikan menggunakan *gel documentation system* (Major Science, USA).

Produksi dan purifikasi CP-SCMV

Untuk produksi protein rekombinan CP-SCMV, bakteri transforman *E. coli* strain BL21 dikultur pada media LB sebanyak 500 mL mengandung antibiotik kanamisin 50 µg mL⁻¹ selama 8 jam pada shaker inkubator suhu 37 °C 150 rpm. Sel bakteri dipanen dengan sentrifugasi 6.000 rpm, 4 °C selama 10 menit. Produksi dan ekstraksi protein CP-SCMV dilakukan sesuai prosedur pada penelitian sebelumnya (Darsono et al. 2018). Pelet bakteri dilarutkan dengan buffer sonikasi (50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0 300 mM NaCl) dan sel bakteri dipecahkan dengan menggunakan sonikator (Branson, USA). Protein terlarut (*soluble*) dan bagian tidak terlarut (*insoluble*) dipisahkan dengan sentrifugasi 12.000 rpm, 4 °C selama 10 menit. Pelet *insoluble* dilarutkan dengan buffer solubilisasi (50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0 300 mM NaCl, 8 M urea) dan disentrifugasi 12.000 rpm pada suhu kamar selama 10

menit. Protein rekombinan CP-SCMV diperoleh dari ekstrak protein *insoluble* dan dimurnikan menggunakan resin afinitas Ni-NTA (Roche, USA).

Protein yang telah dilarutkan kemudian dimurnikan menggunakan kolom afinitas kromatografi resin Ni-NTA. Resin disesuaikan kondisinya dengan memasukkan buffer solubilisasi ke dalam kolom. Sampel protein dimasukkan ke dalam kolom dengan perbandingan resin dan protein (1:1). Larutan yang keluar dari kolom (*flow-through*) ditampung dalam microtube untuk dianalisis. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan menambahkan buffer solubilisasi yang telah ditambahkan dengan masing-masing 5, 10 dan 15 mM imidazole. Protein CP-SCMV kemudian dielusi dengan buffer solubilisasi mengandung 250 mM imidazole. Hasil pemurnian dianalisis menggunakan SDS-PAGE pada konsentrasi akrilamid 12,5%.

Protein CP-SCMV diekstraksi dari tebu transgenik tahan SCMV dan tebu tetua yang terinfeksi virus SCMV sesuai prosedur pada penelitian sebelumnya (Apriasti et al., 2018). Sebanyak 5 g daun digerus menggunakan nitrogen cair dan proteinnya diekstrak menggunakan buffer ekstraksi (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 2,5 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM 2-mercaptoethanol, 2% polyvinylpyrrolidone). Ekstrak protein *soluble* diperoleh dari sentrifugasi pada 14.000 rpm, 4 °C selama 10 menit. Fraksi protein *insoluble* yang mengandung CP-SCMV diperoleh dengan melarutkan pelet dengan buffer yang mengandung 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 1 mM EDTA, 2% SDS dan 50% sukrosa. Sampel protein *insoluble* diperoleh dengan sentrifugasi pada 12.000 rpm, suhu kamar selama 10 menit.

Protein *insoluble* diendapkan menggunakan aseton untuk menghilangkan SDS. Satu mL protein *insoluble* dipresipitasi dengan 100% aseton dingin dengan perbandingan 1:3 dan disimpan selama 4–16 jam pada suhu –20 °C. Protein yang terpresipitasi dipisahkan dengan buffer yang mengandung SDS menggunakan sentrifugasi 12.000 rpm, 4 °C selama 10 menit. Pelet protein dicuci sebanyak dua kali menggunakan 80% aseton dan disentrifugasi kembali 12.000 rpm, 4 °C selama 10 menit. Pelet protein dikeringkan menggunakan evaporator (Genevac, UK) dan disuspensi

menggunakan 200 µL buffer resuspensi yang mengandung 9M urea dan 2% triton untuk melarutkan protein.

Pengujian stabilitas panas CP-SCMV

CP-SCMV dari *E. coli*, tanaman tebu transgenik SCMV dan tebu *wild-type* terinfeksi SCMV masing-masing sebanyak 30 µg dianalisis stabilitas panas dengan menginkubasi protein pada suhu 28, 60, dan 90 °C selama 5, 10, dan 30 menit. Perlakuan panas diakhiri dengan memasukkan sampel protein ke dalam es seperti metode yang disebutkan sebelumnya (Neliana et al. 2019). Protein yang telah diperlakukan ditambahkan 2x Laemmli buffer (40% glycerol, 10% SDS, 0,33 M Tris pH 6,8, 5% 2-mercapto-ethanol, 0,05% bromophenol blue) dengan perbandingan (1:1) dan dianalisis dengan SDS-PAGE dan immunoblot.

Pengujian stabilitas cerna CP-SCMV

CP-SCMV diuji stabilitas cerna menggunakan enzim pepsin dan trypsin untuk mensimulasi kemampuan cerna di lambung dan usus halus secara *in vitro*. Simulasi kemampuan cerna di lambung (*simulated gastric fluid*–SGF) dilakukan dengan mereaksikan 250 µg CP-SCMV dalam 250 µL buffer SGF mengandung 0,32% (w/v) enzim pepsin (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) dalam 0,03 M NaCl pH 1,2 yang telah dipre-inkubasi pada suhu 37 °C selama 3 menit dengan perbandingan 1:1. CP-SCMV direaksikan dengan pepsin selama 0,5, 1, 3, 5, 10 dan 30 menit pada suhu 37 °C. Setiap waktu reaksi yang ditentukan, diambil sebanyak 60 µL dari reaksi mix dan ditambahkan sebanyak 25 µL Na₂CO₃ 160 mM untuk mengakhiri reaksi enzimatik (Neliana et al. 2019). Protein kontrol diperlakukan dengan reaksi yang sama, tetapi reaksi diakhiri terlebih dahulu dengan penambahan 25 µL Na₂CO₃ 160 mM sebelum penambahan sampel protein dilakukan. Sampel perlakuan kemudian ditambahkan 4x Laemmli buffer (3:1) dan dianalisis dengan SDS-PAGE dan immunoblot.

Pengujian kemampuan cerna di usus halus (*simulated intestinal fluid*–SIF) secara *in vitro* dilakukan dengan mereaksikan 250 µg CP-SCMV dalam 250 µL buffer SIF mengandung 10 mg mL⁻¹ enzim trypsin (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) dalam 50 mM KH₂PO₄ pH 7,5 yang telah dipre-inkubasi pada suhu 37 °C selama 3 menit dengan

perbandingan 1:1. CP-SCMV direaksikan dengan trypsin selama 0,5, 1, 3, 5, 10 dan 30 menit pada suhu 37 °C (Gan et al. 2016, Neliana et al. 2019). Setiap waktu reaksi yang ditentukan, diambil sebanyak 60 µL dari reaksi mix kemudian reaksi diakhiri dengan menambahkan 4x Laemmli buffer (3:1) dan segera diinkubasi pada suhu 100 °C selama 3 menit. Protein yang telah diperlakukan, kemudian dianalisis menggunakan SDS-PAGE dan immunoblot.

Analisis SDS-PAGE dan immunoblot

Sebanyak 30 µg protein dari tiap perlakuan dipisahkan dengan SDS-PAGE. Sampel protein dipisahkan dengan SDS-PAGE menggunakan gel akrilamid dengan konsentrasi 12,5% dan divisualisasi menggunakan coomassie brilliant blue (CBB).

Analisis immunoblot dilakukan dengan memisahkan protein menggunakan SDS-PAGE (12,5% gel akrilamid) dan ditransfer pada membran PVDF (Merck, Jerman) menggunakan semi-dry trans-blotter (Bio-rad, USA). Protein yang telah tertransfer pada membran dicuci dengan buffer TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,6) sebanyak 3 kali, dan dibloking menggunakan TBS mengandung 0,5% skim-milk selama 30 menit. Selanjutnya membran diinkubasi dengan antibodi CP-SCMV (Darsono et al. 2018) dalam TBS mengandung 0,5% skim-milk dengan perbandingan (1:3000) selama 16 jam. Membran dicuci menggunakan TBS sebanyak 3 kali dan diinkubasi menggunakan *second antibody* goat-anti-rabbit IgG alkaline phosphatase (AP) conjugate (Roche, Germany) dalam TBS dengan perbandingan 1:1500 selama 60 menit. Membran dicuci dengan TBS sebanyak 3 kali dan dideteksi keberadaan CP-SCMV dengan mereaksikan substrat alkaline phosphatase, BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) dan NBT (nitro blue tetrazolium) pada membran sampai terbentuk pita protein (Apriasti et al. 2018, Darsono et al. 2018).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Prediksi potensi alergen coat protein

Pengujian berbasis *database online* dilakukan untuk mengetahui apakah CP-SCMV memiliki kesamaan dengan protein alergen, yang memiliki pengikatan terhadap

Immunoglobulin E (IgE) (Ladics et al. 2011). Uji bioinformatika menggunakan *website Allergenonline* versi 21 sebagai sumber *database online* protein alergen yang dilengkapi dengan 2233 protein alergen.

Analisis bioinformatika pada sekuen asam amino CP-SCMV menggunakan FASTA pensejajaran *full-length* menunjukkan bahwa persentasi kemiripan asam amino CP-SCMV terhadap protein alergen dalam *database* kurang dari 50% (Tabel 1). Hasil analisis menunjukkan persentasi kemiripan tertinggi yaitu sebesar 46,7% terhadap protein defensin (Par H 1) dari polen *Parthenium hysterophorus*. Berdasarkan penelitian sebelumnya, jika pensejajaran *full-length* mempunyai kemiripan protein lebih dari 70% maka mempresentasikan protein putatif alergen, tetapi jika kemiripan antara 50–70% menunjukkan protein beresiko terjadinya reaksi silang terhadap IgE dan jika kemiripan kurang dari 50% protein bersifat tidak alergen (Goodman dan Tetteh 2011, Ladics 2018). Berdasarkan kriteria yang ditetapkan tersebut hasil penelitian menunjukkan bahwa CP-SCMV tidak berpotensi menimbulkan reaksi silang yang memungkinkan terjadinya alergi karena nilai kemiripannya kurang dari 50% terhadap protein alergen. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa jarang ditemui adanya reaksi silang pada protein baru yang memiliki kemiripan kurang dari 50% terhadap protein alergen (Aalberse 2000).

Prediksi alergenitas menggunakan FASTA pensejajaran 80 asam amino menunjukkan kemiripan CP-SCMV terhadap *database* protein alergen lebih dari 35%, yaitu kemiripan tertinggi 41% dengan protein collagen alpha-2(I) chain isoform X1 (Tabel 1). Hasil analisis 80 mers menunjukkan adanya peluang respon alergi atau reaksi-silang protein baru dengan IgE karena kemiripan lebih dari 35% (Ladics 2018). Akan tetapi, hasil penelitian dari Cressman dan Ladics (2009), menunjukkan bahwa ambang batas 35% dari FASTA pensejajaran 80 mers menggunakan *AllergenOnline* lebih banyak menghasilkan hasil analisis yang bernilai positif palsu dibandingkan analisis FASTA konvensional. Namun jika ambang batas dinaikkan sebesar 50% dengan menggunakan pensejajaran *full*

Tabel 1. Analisis *in silico* CP-SCMV menggunakan alergen online V21

Pensejajaran <i>Full-Length</i>				Pensejajaran 80 Mer			
Kemiripan %	Protein Alergen	Gen Interest	Spesies	Kemiripan %	Protein Alergen	Gen Interes	Spesies
46,70	Definsine-like protein	1026259961	<i>Artemisia gmelinii</i>	41,00	Collagen alpha-2(i) chain	1079717942	<i>Lates calcarifer</i>
44,40	Definsine-like protein	1026259965	<i>Artemisia lavandulifolia</i>	38,80	Collagen alpha-2(i) chain	929244458	<i>Salmo salar</i>
44,40	Definsine-like protein	1026259949 1026259951	<i>Artemisia annua</i>	38,76	Collagen alpha-1(i) chain	929097893 929075511	<i>Salmo salar</i>
44,40	Definsine-like protein	1026259959	<i>Artemisia gmelinii</i>	38,10	Collagen alpha-2(i) chain	929312453	<i>Salmo salar</i>
44,40	Definsine-like protein	27818335	<i>Artemisia sieversiana</i>	37,50	Collagen alpha-1(i) chain	1079717864	<i>Lates calcarifer</i>
42,20	Definsine-like protein	573005956	<i>Artemisia tridentata</i>	36,60	Glutenin subunit	288860106	<i>Triticum aestivum</i>
42,20	Definsine-like protein	573005954	<i>Artemisia ludoviciana</i>	35,80	Collagen alpha-2(i)chain precursor	27806257	<i>Bos taurus</i>
42,20	Definsine-like protein	1026259957	<i>Artemisia capillaris</i>	35,40	Glutenin	736319	<i>Triticum aestivum</i>

Tabel 2. Analisis *in silico* sisi pemotongan enzim pencernaan terhadap CP-SCMV

Enzim	Jumlah Sisi Pemotongan	Posisi Situs Pemotongan Pada Asam Amino ke-
Pepsin	29	3 96 105 114 115 116 118 119 120 139 151 152 163 164 193 205 211 235 238 243 244 249 250 251 281 283 284 309 311
Trypsin	31	2 79 90 95 97 101 102 104 107 109 111 133 136 141 147 148 190 206 223 228 232 237 246 257 261 263 270 275 280 297 305
Chymotrypsin	55	6 96 99 103 114 115 116 118 119 120 122 139 142 143 150 152 157 161 164 165 167 181 183 184 194 205 209 210 211 212 219 222 229 233 235 239 242 244 247 249 251 252 254 267 269 281 282 284 298 307 308 310 311 316 317

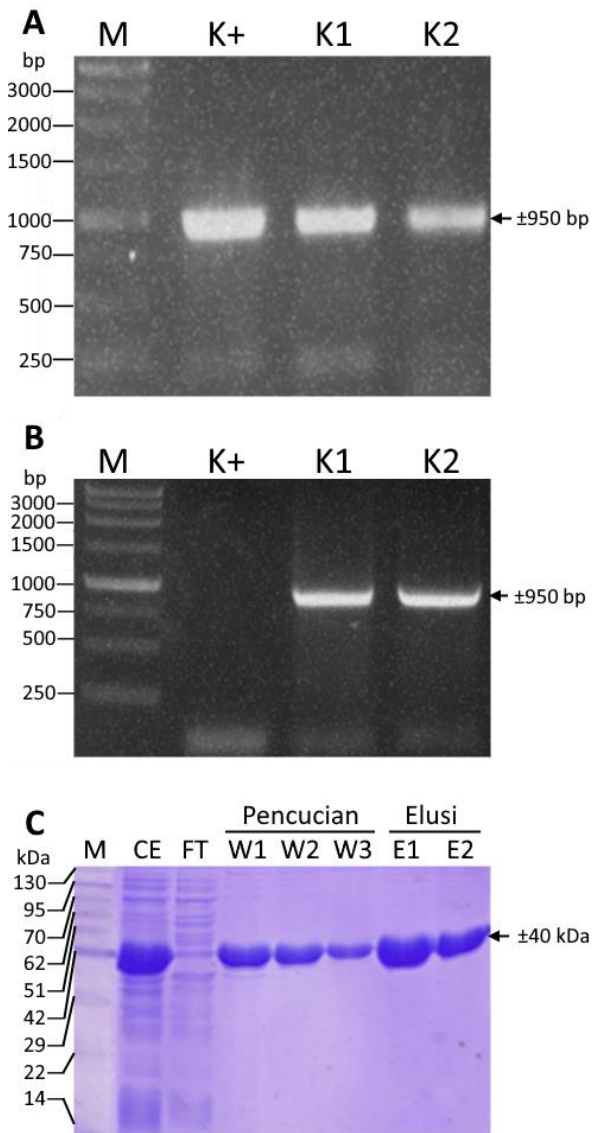
length akan menurunkan hasil analisis yang bernilai positif palsu (Ladics et al. 2007).

Hasil analisis CP-SCMV berdasarkan FASTA pensejajaran full length dan FASTA pensejajaran 80 mers menunjukkan hasil yang berbeda. Hasil analisis FASTA pensejajaran full-length menunjukkan CP-SCMV tidak berpotensi reaksi silang, sedangkan FASTA pensejajaran 80 mers menunjukkan adanya potensi silang walaupun ambang batas 35% masih diperdebatkan menghasilkan positif palsu. Oleh karena itu, hasil analisis *in silico* tidak dapat dijadikan sebagai tolak ukur sepenuhnya untuk menentukan potensi suatu protein bersifat alergen atau tidak. Oleh karena itu, diperlukan pengujian lebih lanjut

secara *in vitro* untuk menyimpulkan hasil yang akurat.

Salah satu karakter protein alergen ditandai dengan kemampuan protein yang stabil terhadap enzim pencernaan (Pali-Schöll et al. 2018). Analisis *in silico* dilakukan untuk mengetahui sisi pemotongan protease pepsin, trypsin dan chymotrypsin pada CP-SCMV. Hasil analisis menunjukkan CP-SCMV terbagi menjadi beberapa bagian sesuai dengan sisi pemotongan. Jumlah sisi pemotongan pada enzim pepsin sebanyak 29 situs, enzim trypsin sebanyak 31 situs dan enzim chymotrypsin sebanyak 55 situs (Tabel 2). Hasil analisis *in silico* menyatakan bahwa enzim pepsin, trypsin dan chymotrypsin mampu memotong atau mencerna CP-

SCMV, sehingga dapat dinyatakan tidak bersifat alergen. Hal ini sesuai dengan pendapat Rathinam et al. (2017) yang menyatakan bahwa keberhasilan enzim pepsin (enzim pencernaan) dalam mencerna protein menunjukkan bahwa protein tersebut



Gambar 1. Analisis PCR dan purifikasi CP-SCMV pada *E.coli* transforman. A). Konfirmasi bakteri *E. coli* transforman pET28a-CP menggunakan PCR, (K+) plasmid pET28a-CP; (K1) koloni bakteri transforman ke-1; (K2) koloni bakteri transforman ke-2; (M) marker 1 kb DNA leader (thermo Scientific). B). PCR plasmid bakteri transforman pET28a-CP, (K-) Kontrol negatif; (1) plasmid dari *E. coli* ke-1; (2) plasmid dari *E. coli* ke-2; (M) marker 1 kb DNA leader (thermo Scientific). C). Purifikasi CP-SCMV dari *crude* ekstrak bakteri transforman, (M) marker protein ladder; (CE) *crude* ekstrak; (FT) *flowthrough*; (W1) washing 5 mM Imidazole; (W2) washing 10 mM Imidazole; (W3) washing 15 mM Imidazole; (E1,E2) Elusi 250 mM Imidazole

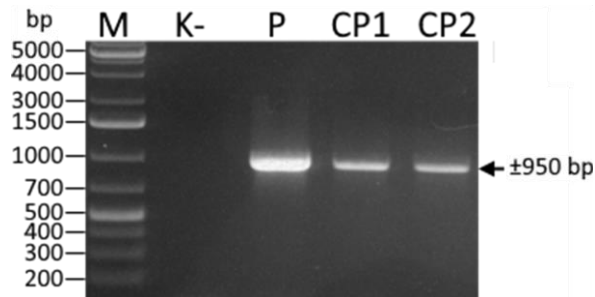
adalah protein nonalergenik. Selain itu, sisi pemotongan dari masing masing enzim pencernaan yang banyak dan berbeda membuat CP-SCMV lebih terfragmentasi menjadi ukuran yang lebih kecil sehingga memperkecil adanya potensi alergen. Enzim pepsin merupakan protease yang memotong residu asam amino hidrofobik dan memotong residu asam amino setelah phenylalanine, leucine, histidine dan lysine (Ahn et al. 2013). Situs pemotongan pada enzim tripsin yaitu setelah residu asam amino yang rantai sampingnya bermuatan positif, sedangkan sisi pemotongan pada chymotrypsin setelah residu asam amino aromatik (Fu et al. 2021).

Pengujian alergenitas CP-SCMV *in vitro*

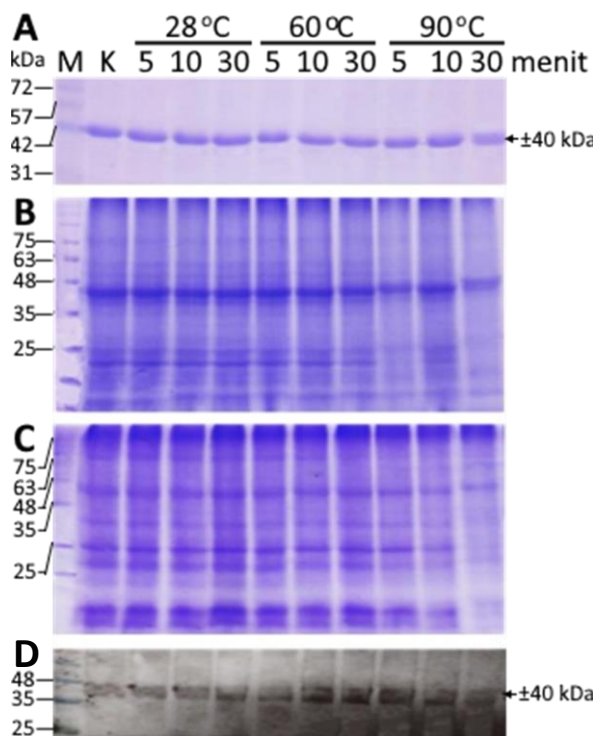
Pengujian alergenitas CP-SCMV secara *in vitro* dilakukan menggunakan protein rekombinan yang diproduksi pada bakteri *E. coli*. Sebelum digunakan untuk produksi protein rekombinan CP-SCMV, dilakukan konfirmasi keberadaan gen CP-SCMV pada sel bakteri. Bakteri *E. coli* hasil transformasi diisolasi plasmid pET28a-CP dan dikonfirmasi kebenaran plasmidnya menggunakan analisis PCR. Hasil PCR koloni dan PCR plasmid menunjukkan bahwa adanya pita DNA CP-SCMV hasil amplifikasi berukuran 950 bp (Gambar 1a dan 1b). Rekombinan CP-SCMV diproduksi dengan menumbuhkan *E. coli* transforman dan dipurifikasi menggunakan kolom afinitas resin Ni-NTA. Hasil analisis dengan SDS-PAGE menunjukkan bahwa pada tahap elusi telah didapatkan protein murni CP-SCMV (Gambar 1c), akan tetapi sebagian protein rekombinan masih lolos tercuci sebelum dielusi menggunakan imidazole (Gambar 1c line W1-W3). Hal ini disebabkan oleh konsentrasi imidazole yang digunakan pada proses pencucian (*washing*) tergolong terlalu tinggi sehingga menyebabkan terlepasnya CP-SCMV dari pengikatan resin. Protein murni hasil produksi dan purifikasi digunakan sebagai bahan pengujian alergenitas *in vitro*.

Konfirmasi keberadaan gen pengkode CP-SCMV pada tanaman transgenik PDR CP-SCMV dilakukan dengan analisis PCR. Hasil analisis PCR menggunakan primer untuk gen CP-SCMV menunjukkan bahwa tanaman transgenik PDR CP-SCMV mengandung fragmen gen CP-SCMV

berukuran 950 bp (Gambar 2). Namun demikian, fragmen gen CP-SCMV tidak ditemukan pada tanaman non-transgenik yang digunakan sebagai kontrol. Konfirmasi tanaman transgenik dapat menggunakan *selectable marker* ataupun gen *insert*.



Gambar 2. Elektroforesis gel agarose untuk pemisahan DNA hasil analisis PCR tebu transgenik dan non-transgenik. (CP1, CP2) adalah tanaman transgenik 1 dan 2; (P) Plasmid pRION-CP; (K-) tanaman non transgenik; (M) marker 1Kb DNA ladder (Thermo Scientific)



Gambar 3. Visualisasi CP-SCMV terhadap perlakuan stabilitas panas protein CP dengan SDS-PAGE dan immunoblot. A). SDS PAGE rekombinan CP, B). SDS PAGE tanaman tebu non-transgenik (*wildtype*) berpenyakit SCMV, C). SDS PAGE tanaman transgenik CP, dan D). Immunoblot CP dari tanaman tebu transgenik (30 µg) menggunakan poliklonal antibody CP-SCMV. (M) marka protein ladder (Jena Bioscience)

Pengujian stabilitas panas CP-SCMV

Analisis stabilitas panas merupakan salah satu parameter yang digunakan untuk menentukan potensi alergen pada suatu protein. Pengujian stabilitas panas CP-SCMV dilakukan dengan inkubasi protein pada suhu 28, 60 dan 90 derajat Celsius selama 5, 10 dan 30 menit. Hasil analisis SDS-PAGE menunjukkan bahwa CP-SCMV masih terdeteksi pada inkubasi sampai dengan suhu 90 °C (Gambar 3A). Namun demikian, terlihat sedikit pengurangan intensitas pita protein selama 30 menit waktu inkubasi. Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa pola pita protein tetap sama pada protein *crude* ekstrak tanaman non-transgenik bergejala SCMV (Gambar 3B) dan tanaman transgenik CP-SCMV (Gambar 3C). Untuk melihat pengaruh pemanasan terhadap stabilitas CP-SCMV pada tanaman transgenik dilakukan analisis immunoblot menggunakan antibodi spesifik untuk CP-SCMV. Hasil immunoblot menunjukkan bahwa pada perlakuan suhu 90 °C keberadaan intensitas CP-SCMV mulai berkurang pada inkubasi 10 menit dan mengalami pengurangan lebih banyak pada waktu inkubasi 30 menit (Gambar 3D). Protein alergen identik dengan sifat resisten terhadap perlakuan panas (Mishra et al. 2012, Farias et al. 2015). Protein yang memiliki ketahanan terhadap perlakuan panas, biasanya memiliki hubungan dengan pengikatan IgE dan dapat berpotensi sebagai protein alergen (Verhoeckx et al. 2015).

Berdasarkan hasil analisis stabilitas panas menunjukkan bahwa CP-SCMV masih terdeteksi pada 90 °C meskipun kandungan protein sedikit berkurang. Hasil demikian mempresentasikan bahwa meskipun protein CP-SCMV tidak terdegradasi oleh panas, namun kemungkinan fungsi protein sudah hilang dan tidak berpotensi sebagai alergen. (Privalle et al. 2011). Penelitian serupa dilakukan terhadap protein *sucrose-phosphate synthase* dan menghasilkan protein tidak terdegradasi pada suhu tinggi, akan tetapi protein tersebut kehilangan fungsi katalitiknya dan tidak berpotensi sebagai alergen (Neliana et al. 2019). Pengujian deteksi aktivitas CP-SCMV tidak dapat dilakukan karena merupakan protein struktural yang tidak memiliki aktivitas katalitik. Hasil serupa juga ditemukan pada protein phosphothricin acetyltransferase (PAT) yang termasuk protein non alergen.

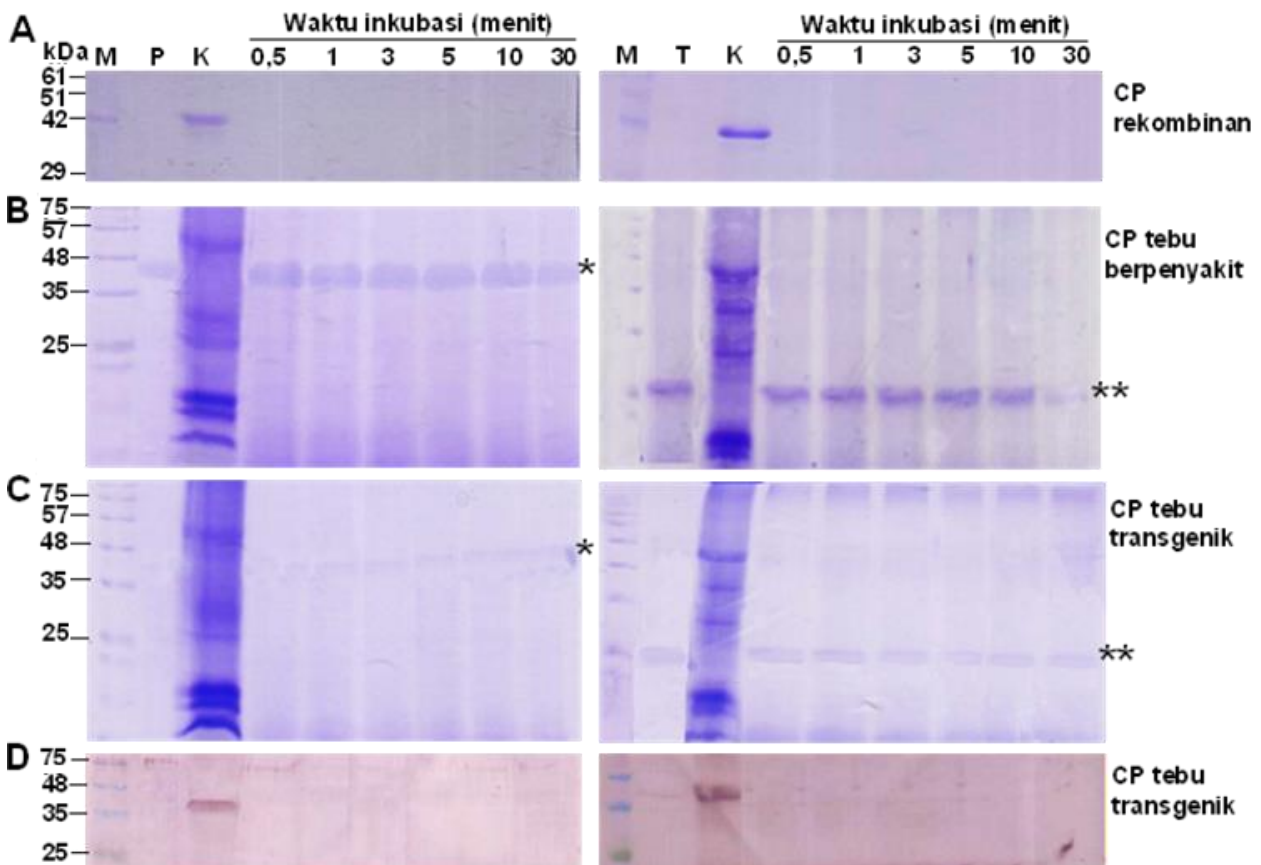
Pada perlakuan panas 100 °C pita protein PAT masih dapat terdeteksi (Privalle et al. 2011). Pengujian stabilitas panas tidak selalu berkorelasi terhadap resiko alergi, sehingga dianggap tidak memberikan pertimbangan alergenitas pada pengujian keamanan pangan tanaman transgenik (Ladics 2018).

Pengujian stabilitas cerna CP-SCMV

Pengujian stabilitas cerna secara *in vitro* bertujuan mengetahui bahwa CP-SCMV dapat tercerna secara enzimatik oleh protease pada sistem pencernaan. Pengujian stabilitas cerna merupakan uji lanjutan yang dilakukan untuk menentukan suatu protein berpotensi alergi atau tidak. Untuk melihat stabilitas cerna dilakukan perlakuan enzim pepsin dan trypsin pada CP-SCMV, serta visualisasi protein dengan SDS-PAGE dan immunoblot. Hasil analisis menunjukkan bahwa CP-SCMV tercerna dalam waktu kurang dari 0,5 menit (30 detik) dalam simulasi cerna pepsin dan trypsin (Gambar 4). Pada analisis protein rekombinan CP-

SCMV terlihat tidak ada sisa pita protein sama sekali sesudah inkubasi 0,5 menit (Gambar 4A). Bahkan hampir semua protein daun tebu berpenyakit dan tebu transgenik terdegradasi sesudah 0,5 menit. Pita protein yang terlihat pada ukuran 43 dan 23,5 kDa pada perlakuan tebu transgenik dan non-transgenik berpenyakit (Gambar 4 B-C) adalah protein pepsin dan trypsin. Konfirmasi keberadaan CP-SCMV pada tanaman transgenik dengan analisis immunoblot jelas menunjukkan bahwa CP-SCMV tidak ditemukan pada ekstrak daun setelah inkubasi 0,5 menit (Gambar 4D).

Hasil analisis *in vitro* menunjukkan bahwa CP-SCMV dapat terdegradasi, tidak stabil dalam kondisi peptik, dan tercerna secara enzimatik oleh enzim pepsin dan trypsin. Protein yang bersifat alergen sebagian besar stabil terhadap enzim pencernaan seperti protein ovalbumin (Ladics et al. 2007, Goodman dan Tetteh 2011). Protein non alergen diketahui tidak stabil dan terdegradasi kurang dari 15 detik dan tidak



Gambar 4. Visualisasi hasil analisis stabilitas cerna terhadap CP dengan SDS-PAGE dan immunoblot. A). perlakuan simulasi cerna rekombinan CP; B). perlakuan simulasi cerna *crude* ekstrak tebu berpenyakit; C). perlakuan simulasi cerna *crude* ekstrak tebu transgenik menggunakan enzim pepsin (P/*) dan enzim trypsin (T/**). D). Western blot deteksi protein CP pada tebu transgenik setelah simulasi cerna

menyisakan fragmen peptida yang stabil. Hasil pengujian stabilitas cerna menyatakan bahwa CP-SCMV mudah dicerna dan tidak bersifat alergen. Stabilitas cerna masih menjadi metode yang relevan untuk menentukan potensi alergi dan non alergi pada protein transgenik.

KESIMPULAN

Studi potensi alergenitas CP-SCMV secara *in silico* menunjukkan bahwa CP-SCMV diprediksi tidak berpotensi menimbulkan reaksi silang dan dapat tercerna oleh enzim pada sistem pencernaan. Analisis *in silico* dibuktikan kebenarannya dengan analisis *in vitro*, yaitu CP-SCMV mengalami degradasi pada simulasi cerna gastrointestinal menggunakan enzim pepsin dan tripsin. Berdasarkan kedua pengujian tersebut dapat disimpulkan bahwa CP-SCMV tidak berpotensi alergen.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi melalui WCR (*World Class Researcher*) dengan surat keputusan nomor 3310/UN25.3.1/LP/2021 atas nama Bambang Sugiharto.

DAFTAR PUSTAKA

- Aalberse RC (2000) Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 106: 228–238. doi: 10.1067/mai.2000.108434
- Addy HS, Nurmalasari, Wahyudi AHS, Sholeh A, Anugrah C, Iriyanto FES, Darmanto W, Sugiharto B (2017) Detection and response of sugarcane against the infection of sugarcane mosaic virus (SCMV) in Indonesia. *Agronomy* 7: 50. doi: 10.3390/agronomy7030050
- Ahn J, Cao MJ, Yu YQ, Engen JR (2013) Accessing the reproducibility and specificity of pepsin and other aspartic proteases. *Biochim Biophys Acta* 1834: 1222–1229. doi: 10.1016/j.bbapap.2012.10.003
- Alonso MG (2013) Safety assessment of food and feed derived from GM crops: using problem formulation to ensure “fit for purpose” risk assessments. *Collection of Biosafety Reviews* 8: 72–101. Corpus ID: 201851937
- Apriasti R, Widyaningrum S, Hidayati WN, Sawitri WD, Darsono N, Hase T, Sugiharto B (2018) Full sequence of the coat protein gene is required for the induction of pathogen-derived resistance against sugarcane mosaic virus in transgenic sugarcane. *Mol Biol Rep* 45: 2749–2758. doi: 10.1007/s11033-018-4326-1
- Braidwood L, Müller SY, Baulcombe D (2019) Extensive recombination challenges the utility of sugarcane mosaic virus phylogeny and strain typing. *Sci Rep* 9: 20067. doi: 10.1038/s41598-019-56227-y
- Cressman RF, Ladics G (2009) Further evaluation of the utility of “Sliding Window” FASTA in predicting cross-reactivity with allergenic proteins. *Regul Toxicol Pharmacol* 54: S20–S25. doi: 10.1016/j.yrtph.2008.11.006
- Darsono N, Azizah NN, Putranty KM, Astuti NT, Addy HS, Darmanto W, Sugiharto B (2018) Production of a polyclonal antibody against the recombinant coat protein of the sugarcane mosaic virus and its application in the immunodiagnostic of sugarcane. *Agronomy* 8: 93. doi: 10.3390/agronomy8060093
- Farias DF, Viana MP, Oliveira GR, Santos VO, Pinto CEM, Viana DA, Vasconcelos IM, Grossi-de-Sa MF, Carvalho AFU (2015) Food safety assessment of Cry8Ka5 mutant protein using Cry1Ac as a control Bt protein. *Food Chem Toxicol* 81: 81–91. doi: 10.1016/j.fct.2015.04.008
- 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. *Biol Chem* 402: 861–867. doi: 10.1515/hsz-2020-0386
- Gan J, Chen H, Liu J, Wang Y, Nirasawa S, Cheng Y (2016) Interactions of β -conglycinin (7S) with different phenolic acids—impact on structural characteristics and proteolytic degradation of proteins. *Int J Mol Sci* 17: 1671. doi: 10.3390/ijms17101671
- Giraldo PA, Shinozuka H, Spangenberg GC, Cogan NOI, Smith KF (2019) Safety

- assessment of genetically modified feed: Is there any difference from food? *Front Plant Sci* 10: 1592. doi: 10.3389/fpls.2019.01592
- Goodman RE, Tetteh AO (2011) Suggested improvements for the allergenicity assessment of genetically modified plants used in foods. *Curr Allergy Asthma Rep* 11: 317–324. doi: 10.1007/s11882-011-0195-6
- Goodman RE (2014) Biosafety: evaluation and regulation of genetically modified (GM) crops in the United States. *J Huazhong Agricultural University* 33: 85–114
- Hidayati WN, Apriasti R, Addy HS, Sugiharto B (2021) Distinguishing resistances of transgenic sugarcane generated from RNA interference and pathogen-derived resistance approaches to combating sugarcane mosaic virus. *Indones J Biotechnol* 26: 107–114. doi: 10.22146/ijbiotech.65256
- Ladics GS, Bannon GA, Silvanovich A, Cressman RF (2007) Comparison of conventional FASTA identity searches with the 80 amino acid sliding window FASTA search for the elucidation of potential identities to known allergens. *Mol Nutr Food Res* 51: 985–998. doi: 10.1002/mnfr.200600231
- Ladics GS, Cressman RF, Herouet-Guicheney C, Herman RA, Privalle L, Song P, Ward JM, McClain S (2011) Bioinformatics and the allergy assessment of agricultural biotechnology products: Industry practices and recommendations. *Regul Toxicol Pharmacol* 60: 46–53. doi: 10.1016/j.yrtph.2011.02.004
- Ladics GS (2018) Assessment of the potential allergenicity of genetically-engineered food crops. *J Immunotoxicol* 16: 43–53. doi: 10.1080/1547691X.2018.1533904
- Lindbo JA, Falk BW (2017) The impact of “coat protein-mediated virus resistance” in applied plant pathology and basic research. *Phytopathol* 107: 624–634. doi: 10.1094/PHYTO-12-16-0442-RVW
- Liu MS, Ko MH, Li HC, Tsai SJ, Lai YM, Chang YM, Wu MT, Chen LFO (2014) Compositional and proteomic analyses of genetically modified broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) harboring an agrobacterial gene. *Int J Mol Sci* 15: 15188–15209. doi: 10.3390/ijms150915188
- Mishra A, Gaur SN, Singh BP, Arora N (2012) In silico assessment of the potential allergenicity of transgenes used for the development of GM food crops. *Food Chem Toxicol* 50: 1334–1339. doi: 10.1016/j.fct.2012.02.005
- Neliana IR, Sawitri WD, Ermawati N, Handoyo T, Sugiharto B (2019) Development of allergenicity and toxicity assessment methods for evaluating transgenic sugarcane overexpressing sucrose–phosphate synthase. *Agronomy* 9: 23. doi: 10.3390/agronomy9010023
- Pali-Schöll I, Untersmayr E, Klems M, Jensen-Jarolim E (2018) The effect of digestion and digestibility on allergenicity of food. *Nutrients* 10: 1129. doi: 10.3390/nu10091129
- Pandey A, Kamle M, Yadava LP, Muthukumar M, Kumar P, Gupta V, Ashfaque M, Pandey BK (2010) Genetically modified food: Its uses, future prospects and safety assessments. *Biotechnology* 9: 444–458. doi: 10.3923/biotech.2010.444.458
- Privalle L, Bannon G, Herman R, Ladics G, McClain S, Stagg N, Ward J, Herouet-Guicheney C (2011) Heat stability, its measurement, and its lack of utility in the assessment of the potential allergenicity of novel proteins. *Regul Toxicol Pharmacol* 61: 292–295. doi: 10.1016/j.yrtph.2011.08.009
- Rathinam M, Singh S, Pattanayak D, Sreevathsa R (2017) Comprehensive in silico allergenicity assessment of novel protein engineered chimeric Cry proteins for safe deployment in crops. *BMC Biotechnology* 17: 64. doi: 10.1186/s12896-017-0384-z
- Verhoeckx KCM, Vissers YM, Baumert JL, Faludi R, Feys M, Flanagan S, Herouet-Guicheney C, Holzhauser T, Shimojo R, van der Bolt N, Wichers H, Kimber I (2015) Food processing and allergenicity. *Food Chem Toxicol* 80: 223–240. doi: 10.1016/j.fct.2015.03.005
- Widyaningrum S, Pujiasih DR, Sholeha W, Harmoko R, Sugiharto B (2021) Induction of resistance to sugarcane mosaic virus by RNA interference targeting coat protein gene silencing in

- transgenic sugarcane. Mol Biol Rep 48: 3047–3054. doi: 10.1007/s11033-021-06325-w
- Xu JS, Deng YQ, Cheng GY, Zhai YS, Peng L, Dong M, Xu Q, Yang YQ (2019) Sugarcane mosaic virus infection of model plants *Brachypodium distachyon* and *Nicotiana benthamiana*. J Integr Agric 18: 2294–2301. doi: 10.1016/S2095-3119(19)62572-4
- Yao W, Ruan M, Qin L, Yang C, Chen R, Chen B, Zhang M (2017) Field performance of transgenic sugarcane lines resistant to sugarcane mosaic virus. Front Plant Sci 8: 104. doi: 10.3389/fpls.2017.00104