

Alergenisitas Sistem Glikasi Isolat Protein Kedelai-Fruktooligosakarida

Allergenicity Properties of Soy Protein Isolate-Fructooligosaccharide Glycation Systems

Rahayu Suseno, Nurheni Sri Palupi, Endang Prangdimurti

Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor,
Jl. Raya Darmaga, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia
Email: rahayususeno@gmail.com

Submisi: 16 Juni 2015; Penerimaan: 17 Desember 2015

ABSTRAK

Alergi pangan merupakan sebuah respon imunologis yang disebabkan oleh alergen yang terdapat pada pangan. Kacang kedelai merupakan satu dari delapan jenis bahan pangan yang sering menyebabkan alergi. Tanaman pangan hasil rekayasa genetika (GMO) yang banyak diproduksi di dunia adalah kacang kedelai yaitu sekitar 47 %. Produk GMO dikhawatirkan dapat meningkatkan alergenitasnya. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari tingkat alergenitas antara Isolat Protein Kedelai (IPK) GMO dan non-GMO serta pengaruh glikasi terhadap alergenitas IPK. IPK GMO dan non-GMO diglikasi dengan fruktooligosakarida melalui reaksi Maillard dengan sistem cair. Alergenitas diukur secara kualitatif menggunakan immunoblotting dan secara kuantitatif menggunakan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Peningkatan derajat glikasi IPK GMO dan non-GMO pada sistem cair masing-masing memperlihatkan hasil 75,03 % dan 73,50 %. Terdapat 9 protein alergen pada kacang kedelai GMO dan 8 protein alergen pada kacang kedelai non-GMO. Reaksi glikasi dapat mengurangi alergen pada kacang kedelai GMO dan non-GMO hingga 91,69 % dan 87,07%.

Kata kunci: Alergi; glikasi; GMO; kacang kedelai

ABSTRACT

Food allergy is an immunological response caused by allergens contained in food. Soybean is one of the eight kinds of food products that can cause allergies. Genetically modified food crops that are most widely produced worldwide is soybean (47 % worldwide). Genetically Modified Organisms (GMO) products is concerned may increase the allergenicity of the product. The aims of the research were to study the allergenicity of GMO and non-GMO Soy Protein Isolates (SPI) and the glycation effect to allergenicity of SPI. GMO and non-GMO SPI were glycated with fructooligosaccharides (FOS) through the Maillard reaction in liquid systems. Allergenicity was determined qualitatively using immunoblotting and quantitatively using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The glycation degree of GMO and non-GMO SPI can increase up to 75.03 % and 73.50 % in the liquid system. There were 9 protein allergens in GMO soybean and 8 protein allergens in non-GMO soybean. The glycation reaction could reduce protein allergens in GMO and non-GMO SPI up to 91.69 % and 87.07 %.

Keywords: Allergy; glycation; GMO; soybean

PENDAHULUAN

Alergi pangan adalah alergi yang disebabkan oleh alergen yang terdapat dalam bahan pangan. Senyawa yang sering bersifat alergen adalah glikoprotein yang larut dalam

air dengan berat molekul antara 10-70 KDa (Cianferoni dan Jonathan, 2009). Alergi dapat memicu gejala ringan seperti gatal-gatal, hidung dan mata berair, dan pembengkakan. Alergi dapat juga menimbulkan reaksi yang cukup berat seperti anafilaksis yang bisa menyebabkan kematian. Alergi

pangan dapat terjadi pada semua golongan usia, bahkan pada bayi berusia beberapa bulan. Ben-Shoshan dkk. (2010) melaporkan bahwa alergi pangan memengaruhi hingga 2,5 % populasi orang dewasa dan 6-8 % dari anak-anak kurang dari 3 tahun.

Terdapat 8 jenis sumber pangan utama yang sering menimbulkan reaksi alergi yaitu berbagai jenis protein yang terdapat dalam kacang tanah, kacang pohon (*tree nuts* seperti kenari, walnut, hazelnut), susu sapi, ikan, kerang, telur, kedelai, dan gandum (Gupta dkk., 2013). Kedelai adalah tanaman kaya protein yang banyak dikonsumsi baik berupa produk olahan kedelai maupun sebagai *ingredient* bahan pangan seperti Isolat Protein Kedelai (IPK). IPK digunakan sebagai *ingredient* pada berbagai produk olahan seperti sosis, nugget, susu formula, hingga biskuit. Keberadaan protein alergen pada kedelai dapat membatasi penderita alergi untuk mengonsumsi produk olahan yang mengandung kedelai.

Pengolahan akan mempengaruhi protein yang dapat menyebabkan alergi pada kacang kedelai. Pengolahan pangan, seperti pemanasan, hidrolisis enzimatis, dan fermentasi, dapat mengurangi alergenitas dari kedelai. Karena peptida dalam kedelai menjadi terurai dan menurunkan reaktivitas dalam mengikat reseptor pada antibodi IgE (Amnuaycheewa dan Elvira, 2010). Reaksi Maillard merupakan proses yang sering terjadi pada proses pengolahan pangan yang bermanfaat untuk meningkatkan kelarutan dan kemampuan emulsi. Dari segi fisikokimia, reaksi ini dapat meningkatkan kemampuan sifat antioksidan dengan cara mengikat radikal dan mencegah oksidasi LDL (Mesa dkk., 2008). Reaksi Maillard juga dapat mengakibatkan perubahan warna dan bau pada produk pangan yang dapat meningkatkan atau mengurangi kesukaan konsumen. Pada tingkat lanjut reaksi Maillard juga dapat menimbulkan senyawa berbahaya yang bersifat karsinogen yang disebut dengan *Advanced Glycation End Products* (AGEs) (Toda dkk., 2014).

Proses pengolahan yang melibatkan reaksi Maillard merupakan salah satu cara untuk menurunkan sifat alergenitas protein kedelai. Banyak bukti yang menunjukkan bahwa reaksi Maillard dapat memengaruhi aktivitas IgE dalam mengenali alergen dalam pangan (Nakamura dkk., 2008). Reaksi Maillard merupakan interaksi antara gula pereduksi dan gugus amino produk yang sering terjadi secara spontan selama pengolahan dan penyimpanan pangan (Huang dkk., 2012). Pengolahan yang melibatkan reaksi Maillard ini juga dapat dilakukan dengan mengonjugasikan protein dengan gula pereduksi (Xue dkk., 2013). Konjugasi ini akan menurunkan sisi pengenalan pada permukaan protein alergen sehingga dapat menurunkan alergenitas (Nakamura dkk., 2013).

Salah satu jenis gula yang banyak digunakan dalam bahan pangan adalah fruktooligosakarida (FOS). Saat ini

FOS semakin banyak digunakan dalam produk pangan dan susu formula karena potensi prebiotik yang dapat merangsang pertumbuhan mikroflora usus (Sabater-Molina dkk., 2009). Van de Lagemaat dkk. (2007) melakukan konjugasi isolat protein kedelai dengan FOS, sehingga protein terglykasi melalui reaksi Maillard. Glykasi adalah reaksi non-enzimatis ikatan kovalen molekul protein atau lipida dengan molekul gula. Melalui perlakuan tersebut, protein alergen utama yang terdapat pada kacang kedelai seperti glisinin (11S) dan β -*conglycinin* akan termodifikasi dan menurunkan alergenitas.

Kedelai adalah salah satu tanaman yang sering dibudidayakan dengan proses rekayasa genetika dan paling banyak diproduksi di seluruh dunia yaitu sekitar 47 % dari total tanaman GMO. Rekayasa genetika adalah teknik yang digunakan untuk memodifikasi genetika guna memperoleh karakteristik tertentu (Arun dkk., 2013) yang lebih dikenal dengan *Genetically Modified Organisms* (GMO). Adapun manfaat produk GMO yaitu dapat mengurangi pencemaran lingkungan karena menekan penggunaan pestisida sehingga dapat meningkatkan hasil panen (Tester dan Langridge, 2010). Meskipun teknologi GMO memberikan beberapa manfaat, terdapat beberapa isu yang diperdebatkan mengenai tanaman GMO. Isu yang potensial adalah mengenai masalah ekonomi, pertimbangan etika dan sosial serta kepercayaan masyarakat dalam prosedur regulasinya. Masalah utama adalah mengenai keamanan pangan dan resiko lingkungan. Resiko kesehatan manusia akibat penggunaan tanaman GMO meliputi toksisitas, alergenitas, ketidakstabilan gen yang digunakan dan efek negatif pada gizi produk (Qaim, 2009). Produk GMO ini dikawatirkan dapat meningkatkan alergenitas pada produk tersebut (Fernandez dkk., 2013). Oleh karena itu, perlu dilakukan uji alergenitas terhadap kedelai GMO dan non-GMO. Pada penelitian ini dilakukan karakterisasi kimia, pengujian respon alergenik IPK non GMO dan GMO serta yang diglykasi secara *in vitro* dengan FOS. Berdasarkan paparan diatas, tujuan penelitian ini adalah untuk melihat alergenitas IPK GMO dan non-GMO serta pengaruh glykasi terhadap alergenitasnya dan menentukan rasio penambahan FOS yang efektif.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah kacang kedelai GMO (Merk dagang: Tiga Roda Super) dan non-GMO (Merk dagang: SB & B Food) impor dari Amerika yang diperoleh dari Koperasi Produsen Tahu Tempe Indonesia (KOPTI). Selain itu, diperlukan FOS (fruktooligosakarida) komersial Orafiti® P95 serta darah yang diambil dari responden penderita alergi kacang

dengan kriteria yang dapat dilihat pada tahapan preparasi serum. Bahan kimia yang digunakan untuk analisis yaitu heksan (Teknis), NaOH (Merck), HCl (Merck, PA), asam tiobarbiturat (Merck), Trikloroasetat (Merck), asam oksalat (Merck), Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder yang mengandung 10 protein dengan berat molekul 10-260 kDa (Thermo Scientific, 26634), *tris buffer saline* (Sigma), DAB (3,3' *Diaminobenzidine*) (Sigma-Aldrich), coomassie brilliant blue G-250 (Merck), antibodi IgG tikus anti IgE manusia yang berlabel enzim HRP (*Horseradish Peroxydase*) (ICL Lab, ME-80P-24A). Alat yang digunakan antara lain alat SDS-PAGE (BIO-RAD), ELISA *reader* (BIO-RAD), lempeng mikrotiter datar polistiren 96 well (Nunc Maxisorb), spektrofotometer (UV-160, Shimadzu Japan), membran nitroselulosa 0,45 μm untuk *immunoblotting*, dan peralatan gelas lainnya.

Tahapan Penelitian

Penelitian terdiri atas empat tahap yaitu: i) isolasi protein, ii) konjugasi IPK-FOS, iii) karakterisasi kimia konjugat IPK-FOS dan iv) pengujian alergenitas. Penelitian ini dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan penambahan FOS (1:4; 1:14; 1:30; 1:52; dan 1:74). Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANOVA. Jika terdapat beda nyata dari data yang diperoleh, maka dilanjutkan dengan uji Duncan.

Isolasi Protein

Kacang kedelai GMO dan non-GMO digiling, kemudian diayak dengan ayakan 60 mesh untuk memperoleh tepung kedelai. Isolasi protein sampel diawali dengan penghilangan lemak menggunakan heksan (Liu dkk., 2007). Selanjutnya dilakukan pengaturan pH dengan menggunakan NaOH 1 N hingga diperoleh pH 8. Tahap berikutnya pengadukan dan sentrifuging untuk memisahkan supernatan. Agar protein mengendap maka pH diturunkan sampai 4,5 dengan menggunakan HCl 1 N. Sentrifugasi dilakukankembali untuk memperoleh endapan yang merupakan protein. Tahap akhir adalah pengeringan menggunakan pengering dengan pengering beku (Speroni dkk., 2010).

Konjugasi IPK – FOS

IPK GMO dan non GMO digunakan sebagai model produk pangan dengan kandungan protein yang terglykasi melalui ikatan dengan gula pereduksi Fruktooligosakarida (FOS) (komersial Orafti® P95). Formulasi IPK-FOS diujicobakan dalam sistem pangan cair (*liquid*) berdasarkan metode Van de Lagemaat dkk. (2007) dengan rasio molar lisin (IPK) terhadap fruktosa (FOS): 1:4; 1:14; 1:30; 1:52; dan 1:74. Campuran dituang ke dalam tabung bertutup rapat

dan dipanaskan dalam *water-bath* bersuhu 95 °C, dengan pengadukan konstan selama 1 jam.

Karakterisasi Kimia Konjugat IPK-FOS

Pengukuran derajat glikasi

Derajat glikasi diukur dengan metode TBA (asam tiobarbiturat) (Sheikh dkk., 2004). Pertama, sebanyak 1 mL asam trikloro asetat (TCA) 20 % ditambahkan ke dalam larutan, kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada 3000 rpm. Pencucian endapan dilakukan sebanyak 3 kali menggunakan TCA. 1 mL buffer fosfat (pH= 7,4) dan 0,5 mL asam oksalat 0,3 N ditambahkan ke dalam sedimen dan disimpan dalam penangas air sampai larutan mendidih. Kemudian didinginkan dan ditambahkan 1 mL TCA 40 % ke dalam setiap sampel, kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada 3000 rpm. Supernatan dipisahkan dengan menambah 0,5 mL TBA 50 mmol/L ke dalam 1 mL larutan supernatan. Supernatan kemudian disimpan dalam penangas air dengan suhu 40 °C selama 30 menit. Absorbansi sampel diukur pada 443 nm. Derajat glikasi diperoleh dengan persen peningkatan absorbansi sampel dengan perlakuan dibandingkan dengan sampel kontrol tanpa perlakuan.

Grup amino bebas

Sampel diambil sebanyak 100 μL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berukuran 1,2 \times 10 cm, lalu ditambahkan 5 mL pereaksi Bradford. Larutan divorteks dan diukur secara spektrofotometri pada $\lambda = 595$ nm setelah 5 menit (Bradford, 1976).

Penentuan profil berat molekul berdasarkan elektroforesis SDS-PAGE

Masing-masing IPK GMO dan non GMO serta IPK kedelai yang terglykasi dianalisis dengan elektroforesis menggunakan gel akrilamid. Gel yang digunakan terdiri atas dua bagian, yaitu gel atas (*stacking gel*) dan gel bawah (*separating gel*) dengan konsentrasi *stacking gel* 5 % dan *separating gel* 12 %. Sampel yang diinjeksikan sejumlah 16 μL . Elektroforesis SDS-PAGE akan memisahkan protein berdasarkan berat molekul. Protein dengan berat molekul kecil akan lebih cepat bergerak menuju anoda dibandingkan dengan protein dengan berat molekul besar. Berat molekul protein sampel dapat dihitung dari persamaan regresi yang diperoleh dari kurva hubungan antara mobilitas relatif protein marker (Rf) dan logaritma berat molekul protein marker (Bollag dan Edelstein, 1991).

Pengujian Alergenisitas

Preparasi serum penderita alergi

Serum diambil dari seorang responden penderita alergi kacang kedelai yang telah diseleksi dari tiga penderita alergi pada penelitian sebelumnya. Kriteria respinden yakni umur 30 tahun dan berjenis kelamin perempuan dengan berat badan 55 kg. Serum kontrol diambil dari seorang responden yang tidak menderita alergi, dengan kriteria berjenis kelamin perempuan berumur 24 tahun dengan berat badan 50 kg. Responden penderita alergi sebelumnya telah melakukan pengujian *skin prick test* untuk mengetahui responden positif menderita alergi kedelai. Responden diambil darahnya oleh tenaga medis sebanyak 20 mL. Darah segera diinkubasi pada 37 °C selama 30 menit, lalu disentrifusi 1250 g selama 20 menit. Dari proses tersebut maka akan diperoleh serum yang diduga banyak mengandung IgE. Serum ini selanjutnya disimpan pada suhu -20 °C.

Pengujian Respon Alergenik Menggunakan Immunoblotting

Gel hasil elektroforesis yang tidak diwarnai ditransfer ke membran nitroselulosa (0,45 µm). Gel dan membran nitroselulosa disusun dalam alat *transblotting* (metode *sandwich*), lalu diisi dengan *buffer*. *Blotting* dilakukan 1,5 jam pada arus konstan 0,25 A. Membran dicuci dengan TBS (*Tris Buffer Saline*) selama 10 menit, lalu diblok dengan BSA (*Bovine Serum Albumin*) 2 % dalam TBS selama 2 jam pada suhu kamar. Membran nitroselulosa dicuci dengan TBS dan ditambah serum subyek alergi yang diencerkan 5 kali dalam TBS. Selanjutnya diinkubasi 1 jam pada suhu kamar. Pencucian dilakukan lagi dengan TBS, lalu diberi antibodi IgG tikus anti IgE manusia yang berlabel enzim HRP (pengenceran 1:3000 dalam TBS). Kemudian diinkubasi 1 jam sambil digoyang. Hasil deteksi kompleks protein alergen dengan serum subyek akan terlihat setelah diberikan substrat DAB (3,3' *Diaminobenzidine*). Deteksi positif ditandai dengan terjadinya kompleks berwarna coklat pada kertas nitroselulosa (Bollag dan Edelstein, 1991).

Pengujian reaktivitas imunologi menggunakan ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*)

Sebanyak 100 µL/sumur protein sampel (100 µg/mL) yang terlarut dalam *buffer* karbonat (0,05 M; pH 9,8) dilapiskan pada lempeng mikrotiter datar polistiren 96 well (*Nunc Maxisorb*). Kemudian diinkubasi pada 4 °C selama 18 jam, dicuci 3 kali dengan PBST (*phosphate buffer saline* 0,05 % *tween-20*) sebanyak 200 µL/sumur. Jumlah sampel yang ditambahkan per sumur sudah memenuhi batas minimal untuk dikenali oleh antibodi. Selanjutnya, lempeng mikrotiter diblok dengan 200 µL/sumur larutan BSA 3 % dalam PBS,

dan diinkubasi 1,5 jam pada 37 °C. Setelah itu, lempeng mikrotiter dicuci dengan PBST (200 µL/sumur) sebanyak 3 kali. Serum (antibodi primer) yang telah diencerkan 1:5 dalam PBS ditambahkan pada lempeng mikrotiter sebanyak 100 µL/sumur, selanjutnya diinkubasi 2 jam pada 37 °C. Setelah inkubasi, lempeng mikrotiter dicuci dengan PBST (200 µL/sumur) sebanyak 3 kali. Penambahan antibodi sekunder (IgG tikus anti IgE manusia yang berlabel *Horseradish Peroxydase*) (ICL Lab, ME-80P-24A) dilakukan setelah mengencerkannya (1:3000) dalam PBS pH 7,2. Antibodi sekunder yang ditambahkan ke dalam lempeng mikrotiter sebanyak 100 µL/sumur, lalu diinkubasi 1 jam pada 37 °C, kemudian dicuci dengan PBST (200 µL/sumur) sebanyak 3 kali, dan ditambah substrat DAB sebanyak 100 µL/sumur. Selanjutnya lempeng mikrotiter diinkubasi lagi selama 20 menit pada 37 °C, dan *optical density* (OD) diukur dengan ELISA reader pada 450 nm. Kontrol negatif alergenitas protein alergen dilakukan dengan cara mengganti serum responden penderita alergi kedelai dengan serum bukan penderita alergi menggunakan sampel isolat protein kedelai GMO (Rupa dkk., 2008).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat Protein Kacang Kedelai (IPK)

IPK adalah produk protein kedelai yang memiliki protein paling sedikit 90 % (berat kering) dan banyak diaplikasikan pada industri pangan. IPK ini penting bagi industri pangan karena memiliki nilai gizi dan sifat fungsional yang diinginkan (Chen dkk., 2011). Kadar IPK GMO dan non-GMO yang diperoleh berturut-turut sebesar 90,13 % dan 90,37 %. Wu dkk. (2009) melakukan isolasi protein kacang tanah dengan beberapa cara presipitasi yang berbeda. Hasil menunjukkan bahwa gabungan alkali dan isoelektrik presipitasi seperti yang dilakukan pada penelitian ini menghasilkan kadar protein yang tinggi serta memiliki kelarutan protein, kapasitas pembuat busa dan stabilitas protein yang terbaik. Dengan demikian, IPK yang diperoleh pada penelitian ini dapat dikategorikan sebagai isolat protein karena mengandung lebih dari 90 % kadar protein.

Tabel 1. Rendemen dan kadar protein isolat protein kedelai

Parameter	Kedelai GMO	Kedelai non-GMO
Rendemen Isolat Protein (%)	18,51 ± 1,19a	20,74 ± 1,02a
Kadar protein kedelai (% BK)	36,06 ± 0,89a	39,71 ± 0,39b
Kadar protein isolat (% BK)	90,13 ± 0,13a	90,37 ± 0,18a

^a Angka-angka pada baris yang sama yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata pada (p < 0,05)

Glikasi Isolat Protein Kacang Kedelai

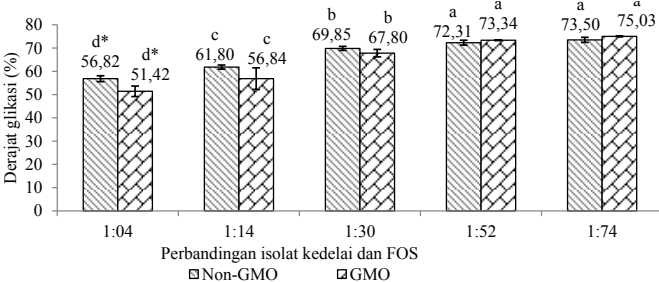
Alergenisitas protein kedelai dapat diturunkan dengan melakukan beberapa proses untuk mengubah struktur alergen dan membuat alergen lebih tidak dikenali antibodi. Perlakuan panas, fermentasi, hidrolisis enzimatik, modifikasi genetik, ekstrusi dan konjugasi gula telah dipelajari sebagai strategi untuk menurunkan alergenitas protein kedelai (Wilson dkk., 2005).

Derajat glikasi yang terjadi dengan FOS dapat dilihat pada Gambar 1. Lisin merupakan asam amino pembatas yang memiliki dua amino grup selain histidin dan arginin sehingga dapat beraksi lebih cepat serta banyak terdapat pada kacang-kacangan. Pada Gambar 1 dapat dilihat hasil pengukuran besaran glikasi yang terjadi. Pada perlakuan terendah yaitu rasio 1:4 derajat glikasi yang dihasilkan adalah 56,82 % pada IPK non-GMO dan 51,42 % pada IPK GMO. Pada perlakuan tertinggi dengan rasio 1:74 didapat nilai 75,03 % dan 73,50 % masing-masing untuk IPK GMO dan non-GMO. Dari data yang diperoleh dapat dilihat bahwa penambahan rasio FOS berbanding lurus dengan derajat glikasi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Van de Lagemaat dkk. (2007) bahwa jumlah gula pereduksi yang dapat digunakan semakin banyak, namun apabila telah mencapai titik tertentu maka peningkatan tersebut akan berhenti.

Pengikatan atau konjugasi protein dengan gula pereduksi merupakan salah satu cara yang dapat digunakan guna menurunkan tingkat alergenitas suatu produk pangan. Bielkiewicz dkk. (2010) yang melakukan glikasi pada protein gandum dapat menurunkan tingkat reaktivitas terhadap IgE dan IgG. Dengan terjadinya glikasi maka akan merubah struktur epitop pada protein alergen kacang kedelai sehingga dapat menurunkan alergenitasnya.

Grup Amino Bebas

Dari pengujian Bradford (Gambar 2) bahwa terjadi penurunan konsentrasi asam amino bebas pada sampel

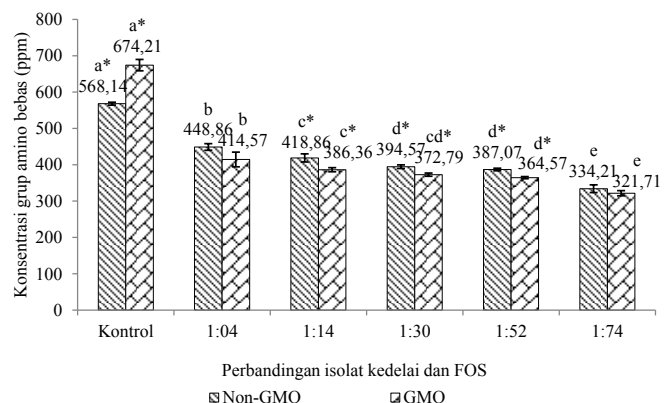


Gambar 1. Derajat glikasi isolat protein kedelai GMO dan non-GMO setelah ditambahkan FOS. *Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata pada (p < 0,05) pada jenis kedelai yang sama. *menunjukkan perbedaan nyata pada jenis perlakuan yang sama

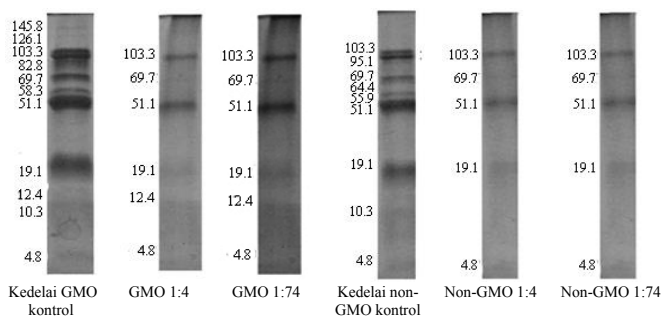
yang telah diberi perlakuan FOS. Hal ini disebabkan FOS telah berikatan dengan residu asam amino (misalnya lisin), sehingga terjadi penurunan lisin bebas yang dapat diikat oleh *Coomassie brilliant blue* G-250 saat pengujian. Dengan berkurangnya residu lisin bebas tersebut maka konsentrasi protein pada sampel akan berkurang. Hal ini sesuai dengan hasil pengujian derajat glikasi sampel dimana semakin peningkatan derajat glikasi akan menurunkan konsentrasi protein sampel. Jiang dkk. (2013) yang melakukan konjugasi tripeptida dengan ribosa melaporkan jumlah asam amino bebas terus menurun selama waktu pemanasan. Penurunan keseluruhan sebesar 84,30% gugus amino bebas setelah 8 jam perlakuan pemanasan. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok α -amino dari tripeptida semakin terikat pada gugus karbonil.

Profil Berat Molekul Protein Berdasarkan Elektrofesis SDS-PAGE

Hasil elektrofesis SDS-PAGE kacang kedelai GMO terdapat 11 pita protein yang memiliki berat molekul antara 145,80 – 4,80 kDa. Kacang kedelai non-GMO memiliki 9 pita protein (Gambar 3) dengan berat molekul antara 103,3 – 4,8 kDa. Sitorus (2014) melaporkan hasil elektrofesis SDS-PAGE isolat kacang kedelai memiliki 8 pita protein dengan berat molekul antara 9,6 kDa – 114,7 kDa. Astuti (2012) mendapatkan 7 protein pada kacang kedelai dengan berat molekul antara 20 kDa – 83,7 kDa. Amnuaycheewa dan Elvira (2010) memperoleh 20 pita protein dengan berat molekul antara 7 kDa-67 kDa. Perbedaan sampel kacang kedelai yang digunakan seperti varietas hingga tempat tumbuh menjadi dasar perbedaan jumlah pita protein. Ketebalan pita protein menunjukkan semakin tebal maka konsentrasi protein semakin tinggi. Namun belum tentu menunjukkan bahwa pita tersebut merupakan protein alergen.



Gambar 2. Kadar asam amino bebas isolat protein kedelai GMO dan non-GMO setelah ditambahkan FOS. *Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata pada (p < 0,05) pada jenis kedelai yang sama. *menunjukkan perbedaan nyata pada jenis perlakuan yang sama



Gambar 3. Profil berat molekul protein kacang kedelai sebelum dan sesudah glikasi (kDa)

Proses glikasi dengan FOS yang dilakukan merubah profil berat molekul protein kedelai baik GMO maupun non-GMO yang dapat dilihat pada Gambar 3. Pengujian elektroforesis dilakukan pada perlakuan terendah dan tertinggi karena sudah mewakili keseluruhan perlakuan. Pada kedelai GMO dan non-GMO yang telah terglykasi terdapat beberapa protein yang tidak ditemui seperti pada kedelai kontrol. Dari hasil elektroforesis dapat dilihat bahwa jumlah FOS yang ditambahkan tidak berpengaruh terhadap pita protein. Hal ini dapat dilihat bahwa pada konsentrasi yang paling kecil telah dapat merubah pita protein kedelai.

Sitorus (2014) melaporkan bahwa proses pemanasan kedelai dengan perebusan, pengukusan, penyangraian dan pengovenan selama 60 menit menyebabkan profil berat molekul protein berkurang. Proses pemanasan menyebabkan terdenaturasinya protein sehingga tidak dapat terdeteksi pada pengujian SDS-PAGE. Kacang kedelai yang tidak dipanaskan memiliki 8 pita protein dengan berat molekul 9,6-114,7 kDa, sedangkan kacang kedelai yang diberi perlakuan pemanasan hanya memiliki 2 sampai 6 pita protein.

Glikasi dapat meningkatkan berat molekul protein namun dapat juga menghilangkan beberapa pita protein. Van de Lagemaat dkk. (2007) melaporkan bahwa pada IPK yang terglykasi hanya terdapat dua pita protein dengan berat molekul sekitar 45 dan 66 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa sebagian besar protein kedelai bereaksi dengan FOS. Selain itu proses panas pada saat konjugasi akan mendenaturasi protein sehingga tidak terdeteksi pada SDS-PAGE. Hal serupa juga disampaikan oleh Usui dkk. (2004) bahwa konjugasi isolat protein kedelai dengan galaktomanan dan kitosan yang menghasilkan pola elektroforesis yang lemah pada protein yang terglykasi.

Respon Alergenik Isolat Protein Terglykasi

Hasil imunoblotting kacang kedelai GMO (Gambar 4) dapat dilihat terdapat 9 protein alergen. Pada hasil elektroforesis terdapat 11 pita protein. Dengan demikian 2

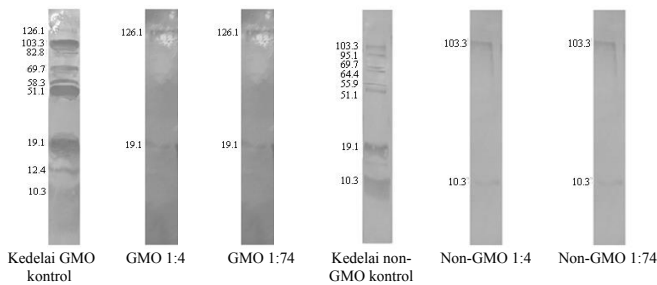
protein tidak terdeteksi sebagai protein alergen yaitu dengan berat molekul 145,8 dan 4,8 kDa. Pada kacang kedelai non-GMO terdapat 8 protein alergen dari 9 protein. Protein yang tidak terdeteksi sebagai protein alergen pada kedelai non-GMO sama seperti protein kedelai GMO yaitu dengan berat molekul 4,8 kDa.

Hasil pengujian immunoblotting ini juga menunjukkan hal yang sama dengan pita yang terdapat pada elektroforesis yaitu tidak ada perbedaan antara perlakuan terkecil hingga terbesar. Bielikowicz dkk. (2010) melaporkan hasil immunoblotting dengan serum penderita alergi didapatkan 9 fraksi mayor dan 5 fraksi minor pada sampel gandum mentah mentah dan kontrol pemanasan tanpa gula pereduksi namun terjadi penurunan reaktivitas pada sampel yang terglykasi dengan penambahan gula pereduksi.

Setelah glikasi, pada kedua protein kedelai ditemukan 2 pita protein alergen namun dengan berat molekul berbeda. Pada kedelai GMO protein yang masih dapat berikatan dengan serum adalah protein dengan berat molekul 19,1 kDa dan 126,1 kDa. Alergen 19,1 kDa (Amnuaycheewa dan Elvira, 2010) merupakan fraksi whey pada protein kedelai sedangkan protein dengan 126,1 kDa merupakan protein gabungan beberapa subunit alergen. Protein ini sama seperti protein alergen yang masih terdeteksi pada protein kedelai non-GMO yang telah terglykasi yaitu 103,3 kDa. Sedangkan protein lainnya yang juga terdeteksi pada protein kedelai non-GMO yang telah terglykasi adalah dengan berat molekul 10,3 kDa yang merupakan protein alergen dengan kandungan metionin yang tinggi (Amnuaycheewa dan Elvira, 2010).

Proses pengolahan pangan yang melibatkan reaksi glikasi dapat menurunkan tingkat alergenitas suatu bahan pangan. Hal ini terbukti dari hasil penelitian ini yang dapat dilihat pada Gambar 4 untuk kedelai GMO maupun kedelai non-GMO. Proses glikasi dapat mengurangi protein alergen pada kedelai GMO dan non-GMO. Dari hasil dapat dilihat bahwa perlakuan terkecil yaitu 1:4 sudah dapat menurunkan alergenitas kacang kedelai, karena dapat dilihat bahwa tidak terdapat perbedaan hasil dari berat molekul pita yang mengandung alergen. Hasil pengujian imunoblotting ini juga menunjukkan hal yang sama dengan pita yang terdapat pada elektroforesis yaitu tidak ada perbedaan antara perlakuan terkecil hingga terbesar. Pengujian dilakukan pada perlakuan terendah dan tertinggi karena sudah mewakili keseluruhan perlakuan

Protein yang masih terdeteksi setelah dikonjugasi dengan FOS menunjukkan bahwa protein ini merupakan jenis protein yang stabil terhadap pengolahan sehingga protein tersebut masih dapat menimbulkan reaksi alergi. Wilson dkk. (2005) menyebutkan bahwa denaturasi, hidrolisis atau konjugasi dapat menurunkan alergenitas kedelai secara keseluruhan maupun alergen P34 pada kedelai. Tidak ada satu prosedur



Gambar 4. Profil protein alergen kacang kedelai sebelum dan sesudah glikasi yang dideteksi dengan imunoblotting (kDa)

yang benar-benar dapat dihilangkan alergenitas P34, namun kombinasi perlakuan mungkin dapat menunjukkan hasil yang lebih baik dari pada hanya satu perlakuan.

Reaktivitas Immunologi Kacang Kedelai Berdasarkan Uji ELISA

Pada penelitian ini dapat dilihat perbedaan reaksi IgE terhadap kedelai GMO dan non-GMO (Gambar 5) bahwa terdapat perbedaan OD antara keduanya. Kedelai GMO memiliki OD yang lebih tinggi dibandingkan kedelai non-GMO. Hal ini menunjukkan bahwa kedelai GMO memiliki alergenitas yang lebih tinggi. Dari hasil pengujian ELISA juga dapat dilihat bahwa perlakuan tingkatan FOS yang diberikan tidak memberikan hasil yang berbeda. Hasil ini sesuai dengan pengujian imunoblotting yang menunjukkan pita alergi yang sama pada perlakuan terendah dan tertinggi yang mewakili semua perlakuan.

Perbedaan di atas belum dapat membuktikan bahwa kedelai GMO memiliki alergenitas yang lebih tinggi daripada kedelai non-GMO. Karena sampel yang digunakan pada penelitian bukan merupakan kedelai yang memiliki varietas yang sama, sehingga perbedaan ini juga dapat disebabkan oleh perbedaan varietas dari sampel yang digunakan. Pada penelitian dilakukan pendekatan dengan menggunakan sampel kedelai yang banyak beredar di pasaran dikarenakan sulit mendapatkan sampel kedelai GMO dan non-GMO dengan varietas yang sama.

Mekanisme penurunan alergenitas akibat glikasi telah banyak dikemukakan oleh penelitian Yoshida dkk. (2005) menjelaskan bahwa konjugasi β -Lactoglobulin dan oligosakarida dapat mengurangi imunogenitas dengan melindungi epitop sel B. *Antigen-Processing Cell* (APC) memproses alergen setelah dimasukkan oleh endosome dan kemudian dipresentasikan. Oleh karena itu, ketahanan alergen terhadap protease endosomal akan sangat penting untuk menentukan imunogenitas alergen. Proses glikasi dapat menurunkan ketahanan alergen terhadap protease endosomal, yaitu apabila semakin rendah ketahanannya maka memiliki alergenitas yang rendah. Yoshida dkk. (2005)

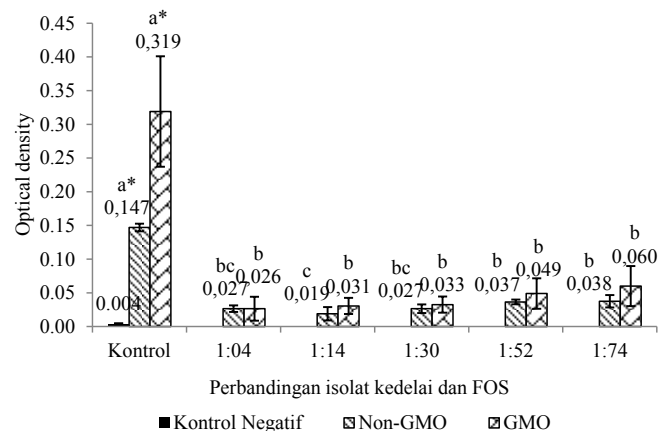
mempertegas bahwa kemungkinan mekanisme lainnya yang dapat menurunkan alergenitas pada alergen dengan keberadaan konjugat. APC biasanya memakan alergen pada fagositosis, sehingga sakarida pada konjugasi protein mungkin mengganggu proses yang dapat menyebabkan berkurangnya alergenitas. Hal serupa juga disampaikan oleh Bielikowicz dkk. (2010) bahwa konjugasi gula dengan gugus protein dapat menutupi (*masking*) beberapa epitop sehingga mengurangi imunoreaktivitas sampel yang terglykasi, meskipun pengenalan epitop baru tidak dapat diabaikan.

Tabel 2. Persen penurunan reaktivitas (OD) serum penderita alergi terhadap isolat protein kacang kedelai GMO dan non-GMO setelah proses glikasi

Perlakuan	GMO	Non-GMO
IPK:FOS (1:4)	92,15 ± 3,52a	82,02 ± 2,68a
IPK:FOS (1:14)	90,61 ± 1,35ab	86,94 ± 7,24ab
IPK:FOS (1:30)	89,96 ± 1,19ab	81,88 ± 5,03ab
IPK:FOS (1:52)	85,06 ± 3,25bc	75,11 ± 2,36b
IPK:FOS (1:74)	81,79 ± 4,63c	74,35 ± 7,24b

^a Angka-angka pada baris yang sama yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata pada (p < 0,05)

Pada Tabel 2 dapat dilihat persen penurunan alergenitas dari kacang kedelai GMO dan non-GMO setelah glikasi. Pada kedelai GMO penurunan terbesar dapat dilihat pada perlakuan 1:4 yaitu sebesar 92,15 % sedangkan pada kedelai non-GMO pada perlakuan 1:14 sebesar 86,94 % namun tidak terdapat perbedaan signifikan antara kedua perlakuan pada masing-masing jenis kedelai. Jika hasil ini dibandingkan dengan hasil imunoblotting dapat dikatakan bahwa pada perlakuan 1:4



Gambar 5. Reaktivitas imunologi kacang kedelai GMO dan non-GMO. ^aAngka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata pada (p < 0,05) pada jenis kedelai yang sama. *menunjukkan perbedaan nyata pada jenis perlakuan yang sama

sudah dapat menurunkan reaktivitas kacang kedelai baik itu GMO maupun non-GMO.

KESIMPULAN

Isolat protein kedelai GMO memiliki perbedaan alergenitas/reaktivitas dibandingkan kedelai non-GMO yang ditunjukkan dengan perbedaan reaktivitas dan jumlah pita protein alergen. Proses konjugasi dengan FOS secara signifikan dapat menyebabkan terjadinya glikasi, menurunkan grup asam amino bebas, mempengaruhi berat molekul protein isolat protein kedelai serta menurunkan reaktivitas kedua kacang kedelai pada pengujian ELISA. Pada parameter berat molekul menggunakan SDS-PAGE dan immunoblotting terdapat perbedaan antara kontrol dan perlakuan namun tidak terdapat perbedaan antar perlakuan. Perlakuan 1:4 sudah efektif dalam menurunkan alergenitas dari protein kedelai GMO dan non-GMO.

DAFTAR PUSTAKA

- Amnuaycheewa, P. dan Elvira, G.dM. (2010). Purification, characterisation, and quantification of the soy allergen profiling (Gly m 3) in soy products. *Food Chemistry* **119**: 1671-1680.
- Arun, Ö.Ö., Funda, Y. dan Karlo, M. (2013). PCR detection of genetically modified maize and soy in mildly and highly processed foods. *Food Control* **32**: 525-531.
- Astuti, RM. (2012). *Isolasi dan Karakterisasi Protein Kacang Kedelai, Kacang Tanah, dan KacangBogor untuk Pembuatan Isolat Alergen*. Tesis. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Ben-Shoshan, M., Daniel, W.H., Lianne, S., Joseph, F., Lawrence, J., Yvan, St. P., Samuel, B.G., Susan, J.E. dan Ann, E.C. (2010). A population-based study on peanut, tree nut, fish, shellfish, and sesame allergy prevalence in Canada. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**(6): 1327-1335.
- Bielikowicz, K., Pawel, W., Elzbieta, K., Maigorzata, I., Beata, J. dan Henryk, K. (2010). Influence of glycation of wheat albumins and globulins on their immune reactivity and physicochemical properties. *Polish Journal of Food and Nutrition Science* **60**(4): 335-340.
- Ben-Shoshan, M., Daniel, W.H., Lianne, S., Joseph, F., Lawrence, J., Yvan, St.P., Samuel, B.G., Susan, J.E. dan Ann, E.C. (2010). A population-based study on peanut, tree nut, fish, shellfish, and sesame allergy prevalence in Canada. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**(6): 1327-1335.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Bollag, D.M. dan Edelman, S.J. (1991). *Protein Method*. Willey-Liss Inc., New York.
- Chen, L., Chen, J., Ren, J. dan Zhao, M. (2011). Modifications of soy protein isolates using combined extrusion pre-treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improved emulsifying properties. *Food Hydrocolloids* **25**(5): 887-897.
- Cianferoni, A. dan Jonathan, M.S. (2009). Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergology International* **58**: 457-466.
- Fernandez, A., Mills, E.N.C., Lovik, M., Spoek, A., Germini, A., Mikalsen, A. dan Wal, J.M. (2013). Endogenous allergens and compositional analysis in the allergenicity assessment of genetically modified plants. *Food and Chemical Toxicology* **62**: 1-6.
- Gupta, R.S., Ashley, A.D., Namrita, J. dan Matthew, J.G. (2013). Childhood food allergies: current diagnosis, treatment, and management strategies. *Mayo Clinic Proceeding* **88**(5): 512-526.
- Huang, X., Tu, Z., Xiao, H., Wang, H., Zhang, L., Hu, Y., Zhang, Q. dan Niu, P. (2012). Characteristics and antioxidant activities of ovalbumin glycated with different saccharides under heat moisture treatment. *Food Research International* **48**: 866-872.
- Jiang, Z., Rai, D.K., O'Connor, P.M. dan Brodtkorb, A. (2013). Heat-induced Maillard reaction of the tripeptide IPP and ribose: Structural characterization and implication on bioactivity. *Food Research International* **50**: 266-274.
- Liu, C., Wang, H., Cui, Z., He, X., Wang, X., Zeng, X. dan Ma, H. (2007). Optimization of extraction and isolation for 11S and 7S globulins of soybean seed storage protein. *Food Chemistry* **102**: 1310-1316.
- Mesa, M.D., Jose, M.S., Josune, O., Ángel, G. dan María, D. del C. (2008). Antioxidant properties of soy protein-fructooligosaccharide glycation systems and its hydrolyzates. *Food Research International* **41**: 606-615.
- Nakamura, S., Yasuhiro, S., Eri, I., Toshiharu, Y., Hao, J., Takahide, M. dan Kiyoshi, H. (2008). Reduction of in vitro allergenicity of buckwheat Fag e 1 through the Maillard-type glycosylation with polysaccharides. *Food Chemistry* **109**: 538-545.

- Nakamura, R., Adachi, R., Itagaki, Y., Fukutomi, Y. dan Teshima, R. (2013). Evaluation of allergenicity of acid-hydrolyzed wheat protein using an in vitro elicitation test. *International Archive of Allergy and Immunology* **160**: 259-264.
- Qaim, M. (2009). The economics of genetically modified crops. *Annual Review of Resource Economics* **1**: 665-694.
- Rupa, P., Hamilton, K., Cirinna, M. dan Wilkie, B.N. (2008). Porcine IgE in the context of experimental food allergy: purification and isotype-specific antibodies. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **125**(3-4): 303-314.
- Sabater-Molina, M., Larqué, E., Torrella, F. dan Zamora, S. (2009). Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *Journal of Physiology and Biochemistry* **65**(3): 315-28.
- Sheikh, N., Safari, M.R., Kashani, K.H.M., Araghchian, M. dan Zeraati, F. (2004). Study on the effect of garlic on the in vitro albumin glycation reaction. *Acta Medica Iranica* **42**(1): 16-18.
- Sitorus, S.R. (2014). *Perubahan Alergenisitas Protein Kacang Kedelai (Glycine max) dan Kacang Bogor (Vigna subterranea) Akibat Pengolahan dengan Panas*. Tesis. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Speroni, F., Milesi, V. dan Anon, MC. (2010). Interactions between isoflavones and soybean proteins: application in soybean protein isolate production. *Food Science Technology* **43**: 1265-1270.
- Tester, M. dan Langridge, P. (2010). Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science* **327**: 818-222.
- Toda, M., Heilmann, M., Ilchmann, A. dan Vieths S. (2014). The maillard reaction and food allergies: is there a link?. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **52**(1): 61-67.
- Usui, M., Tamura, H., Nakamura, K., Ogawa, T., Muroshita, M., Azakami, H., Kanuma, S. dan Kato, A. (2004). Enhanced bactericidal action and masking of allergen structure of soy protein by attachment of chitosan through Maillard-type protein-polysaccharide conjugation. *Nahrung-Food* **48**(1): 69-72.
- Wilson, S., Blaschek, K. dan de Mejia, G.E. (2005). Allergenic proteins in soybean: processing and reduction of P34 Allergenicity. *Nutrition Reviews* **63**(2): 47-58.
- Wu, H., Wang, Q., Ma, T. dan Ren, J. (2009). Comparative studies on the functional properties of various protein concentrate preparations of peanut protein. *Food Research International* **42**(3): 343-348.
- Van de Lagemaat, J., Manuel, S.J., Javier, M.F., Agustin, O. dan Dolores, M.C. (2007). In vitro glycation and antigenicity of soy proteins. *Food Research International* **40**: 153-160.
- Xue, F., Chen, L., Xiangwei, Z., Lufeng, W. dan Siyi, P. (2013). Comparative studies on the physicochemical properties of soy protein isolate-maltodextrin and soy protein isolate-gum acacia conjugate prepared through Maillard reaction. *Food Research International* **51**: 490-495.
- Yoshida, T., Sasahara, Y., Miyakawa, S. dan Hattori, M. (2005). Reduced T cell response to β -Lactoglobulin by conjugation with acidic oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 6851-6857.