

SIMULASI *IN SILICO* INTEGRASI EGF KE *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG* MELALUI CRISPR-Cas9 SEBAGAI PROBIOTIK TERAPEUTIK ULKUS KRONIS

In Silico Simulation of EGF Integration Into *Lactobacillus rhamnosus GG* Via CRISPR-Cas9 For Therapeutic Probiotics For Chronic Ulcers

Arini Rizkiya^{1a}, Alifah Rahma¹, Medina Fiamanella¹, Mutimmah¹, Afryansyah¹, Aji Jumiono², Erna Puspasari²

¹Madrasah Aliyah Negeri Insan Cendekia, Ogan Komering Ilir

²Magister Teknologi Pangan, Universitas Djuanda

^aKorespondensi : Arini Rizkiya, E-mail: arinirizkiyakasmadi@gmail.com

Diterima: 24 – 01 – 2026 , Disetujui: 01 – 03 - 2026

ABSTRACT

Chronic mucosal ulcers in the gastrointestinal tract are characterized by persistent epithelial damage, prolonged inflammation, and impaired tissue regeneration. This study aimed to evaluate the feasibility of integrating the epidermal growth factor (EGF) gene into the genome of *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG) using an *in silico* CRISPR-Cas9 approach as a proof of concept for developing a functional probiotic to support mucosal healing. The study involved target locus identification, genetic construct and CRISPR-Cas9 system design, mRNA secondary structure prediction, physicochemical analysis of the predicted protein using ProtParam, and three-dimensional modeling of EGF. The results indicated that the designed gene integration had initial feasibility, supported by an appropriate gRNA design, adequate mRNA transcript stability, and physicochemical characteristics of EGF compatible with bacterial expression systems. The three-dimensional protein model also showed a stable conformation, with key residues exposed on the protein surface, suggesting a potential interaction with EGFR. Overall, this study demonstrates that EGF gene integration into LGG has promising potential as an initial strategy for the development of a food- and nutrition-based functional probiotic to support mucosal recovery, although further validation through *in vitro* and *in vivo* studies is still required.

Keywords: CRISPR-Cas9; epidermal growth factor; functional probiotic; *Lactobacillus rhamnosus GG*; mucosal healing

ABSTRAK

Ulkus kronis pada mukosa saluran cerna merupakan kondisi yang ditandai oleh kerusakan epitel persisten, inflamasi berkepanjangan, dan gangguan proses regenerasi jaringan. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi kelayakan integrasi gen epidermal growth factor (EGF) ke dalam genom *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG) menggunakan pendekatan CRISPR-Cas9 secara *in silico* sebagai bukti konsep pengembangan probiotik fungsional untuk mendukung penyembuhan mukosa. Penelitian dilakukan melalui identifikasi lokus integrasi target, perancangan konstruk genetik dan sistem CRISPR-Cas9, prediksi struktur sekunder mRNA, analisis sifat fisikokimia protein menggunakan ProtParam, serta pemodelan struktur tiga dimensi protein EGF. Hasil analisis menunjukkan bahwa rancangan integrasi gen memiliki kelayakan awal, didukung oleh desain gRNA yang memadai, kestabilan transkrip mRNA, serta karakteristik protein EGF yang sesuai untuk ekspresi pada sistem bakteri. Model struktur tiga dimensi protein EGF juga menunjukkan konformasi yang stabil dengan residu penting berada di permukaan protein, sehingga berpotensi mendukung interaksi dengan EGFR. Secara keseluruhan, studi ini menunjukkan bahwa integrasi gen EGF ke dalam LGG memiliki prospek sebagai strategi awal pengembangan probiotik fungsional berbasis pangan dan gizi untuk mendukung pemulihan mukosa, meskipun validasi lebih lanjut melalui uji *in vitro* dan *in vivo* masih diperlukan.

Kata kunci: CRISPR-Cas9, *Lactobacillus rhamnosus GG*, EGF, simulasi *in silico*, ulkus kronis

PENDAHULUAN

Ulkus kronis pada mukosa saluran cerna merupakan kondisi yang ditandai oleh kerusakan epitel yang persisten, inflamasi berkepanjangan, gangguan integritas *barrier* mukosa, serta keterlambatan re-epitelisasi. Dalam proses penyembuhan, pemulihan mukosa tidak hanya bergantung pada resolusi inflamasi, tetapi juga pada perbaikan *barrier*, proliferasi dan migrasi sel epitel, serta aktivasi sinyal pertumbuhan yang mendukung regenerasi jaringan. Dalam konteks ini, modulasi mikrobiota menjadi semakin relevan sebagai pendekatan untuk mendukung kesehatan gastrointestinal (Duan et al., 2022). Selain itu, dalam bidang pangan dan gizi, probiotik semakin mendapat perhatian sebagai komponen pangan fungsional yang mampu memengaruhi interaksi nutrisi–mikrobiota–host pada mukosa saluran cerna (O'Hara & Shanahan, 2007; Ashaolu et al., 2025).

Salah satu probiotik yang paling banyak dikaji adalah *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), yang dikenal memiliki kemampuan bertahan pada lingkungan gastrointestinal, memodulasi respons imun, dan mendukung integritas epitel. Berbagai studi menunjukkan bahwa probiotik berpotensi membantu pengelolaan ulkus gastrik melalui penguatan *barrier* mukosa, penekanan inflamasi, dan dukungan terhadap regenerasi epitel (Khoder et al., 2016; Chakravarty & Gaur, 2019; Dubey et al., 2024). Secara lebih spesifik, LGG dan probiotik lain juga dilaporkan berkontribusi terhadap perbaikan kerusakan mukosa, pengurangan permeabilitas, dan peningkatan indikator penyembuhan jaringan pada model eksperimental gastrointestinal (Lyra et al., 2012; Xu et al., 2024; , Youssef et al., 2020).

Secara mekanistik, kemampuan LGG dalam mendukung pemulihan mukosa berkaitan dengan modulasi sinyal epitel dan imun. Protein p40 turunan LGG diketahui mampu mentransaktivasi *epidermal growth factor receptor* (EGFR), sehingga berkontribusi terhadap perlindungan epitel, pencegahan apoptosis, dan percepatan perbaikan mukosa (Fang et al., 2013). Selain itu, protein turunan LGG juga dilaporkan meningkatkan produksi IgA melalui peningkatan ekspresi APRIL pada sel epitel, yang menunjukkan adanya penguatan imunitas mukosa melalui jalur yang bergantung pada EGFR (Wang et al., 2017). Pada tingkat imunomodulasi, LGG juga diketahui memengaruhi ekspresi gen *Toll-like receptor* dan menekan mediator proinflamasi tertentu, sehingga mendukung keseimbangan respons imun mukosa (Peña & Versalovic, 2003; Miettinen et al., 2008).

Efektivitas probiotik juga dipengaruhi oleh lingkungan nutrisi. Literatur menunjukkan bahwa zat gizi dapat memodulasi komposisi dan aktivitas mikrobiota, ketersediaan substrat metabolik, pembentukan metabolit seperti *short-chain fatty acids* (SCFA), serta regulasi inflamasi dan fungsi *barrier* mukosa (Skrypnik & Suliburska, 2017; , Deleemans et al., 2021; , Qumsani, 2025). Oleh karena itu, pengembangan probiotik dalam bidang pangan dan gizi perlu mempertimbangkan interaksi nutrisi–mikrobiota–host, termasuk kemungkinan penggunaan sistem sinbiotik dan matriks pangan untuk mendukung stabilitas serta efektivitas probiotik (Yano et al., 2016; Kistaubayeva et al., 2023; Qiu et al., 2023).

Meskipun potensi LGG dalam mendukung kesehatan mukosa telah banyak dilaporkan, bukti langsung mengenai rekayasa genetik LGG untuk membawa dan mengekspresikan faktor pertumbuhan manusia, khususnya *epidermal growth factor* (EGF), masih sangat terbatas. Padahal, secara konseptual, EGF berperan penting dalam proliferasi, migrasi epitel, dan regenerasi jaringan. Perkembangan teknologi CRISPR-Cas9 membuka peluang untuk merancang integrasi gen secara presisi pada bakteri asam laktat, termasuk *Lactobacillus* (Mu et al., 2022). Namun, pendekatan ini tetap memerlukan perhatian terhadap stabilitas genom, kontrol ekspresi, dan keamanan biologis, termasuk risiko bakteriemia pada populasi rentan (Stage et al., 2020; Nobre et al., 2022). Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mensimulasikan integrasi gen EGF ke dalam genom *Lactobacillus rhamnosus* GG menggunakan pendekatan CRISPR-Cas9 sebagai bukti konsep awal pengembangan probiotik fungsional untuk mendukung penyembuhan ulkus kronis.

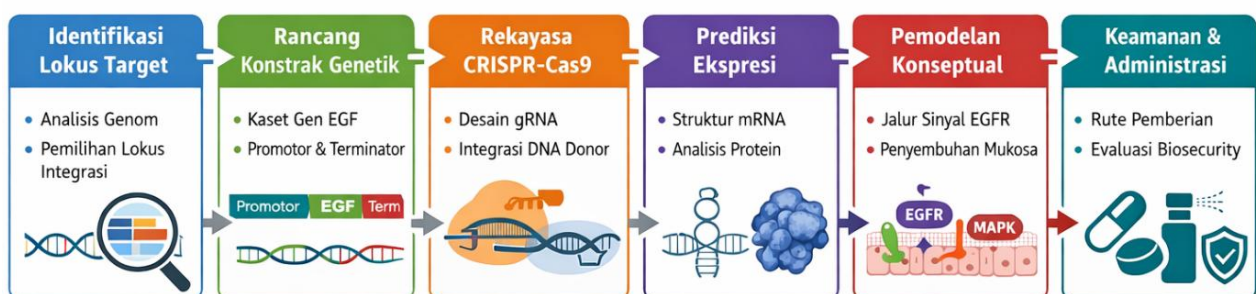
METODE

Penelitian ini merupakan studi deskriptif-komputasional berbasis *in silico* yang bertujuan mengevaluasi kelayakan integrasi gen epidermal growth factor (EGF) ke dalam genom *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) menggunakan sistem CRISPR-Cas9. Rancangan penelitian meliputi identifikasi lokus integrasi yang stabil, desain kontrak genetik, simulasi penyuntingan genom, prediksi ekspresi transkrip, analisis karakteristik protein, serta evaluasi konseptual terhadap relevansi biologis hasil desain. Pendekatan ini dipilih untuk membangun bukti konsep awal mengenai pengembangan probiotik fungsional yang mendukung pemulihan mukosa melalui penguatan sinyal regeneratif epitel (Fang et al., 2013; , Wang et al., 2017).

Tahap awal dilakukan dengan mengumpulkan sekuens genom LGG dan gen EGF dari basis data publik, kemudian mengidentifikasi lokus integrasi yang tidak mengganggu gen esensial, stabil secara genomik, dan memungkinkan ekspresi gen target setelah integrasi. Berdasarkan lokus terpilih, dirancang kontrak genetik yang mencakup gen EGF, promoter, *ribosome binding site*, terminator, dan bila diperlukan sinyal sekresi untuk mendukung pelepasan protein ke lingkungan mukosa. Pemilihan lokus mempertimbangkan stabilitas genom LGG dalam proses produksi, sedangkan perancangan ekspresi EGF didasarkan pada rasional biologis bahwa sinyal pertumbuhan epitel dapat memperkuat kemampuan protektif mukosa yang telah dimiliki LGG (Stage et al., 2020; , Fang et al., 2013).

Selanjutnya dilakukan desain sistem CRISPR-Cas9 melalui penyusunan *guide RNA* (*gRNA*) yang menargetkan lokus spesifik pada genom LGG, serta donor DNA yang membawa gen EGF dan lengan homologi untuk mendukung rekombinasi homolog. Setiap *gRNA* dievaluasi berdasarkan kesesuaian target dan potensi *off-target*. Setelah itu, dilakukan prediksi struktur sekunder mRNA dan analisis sifat fisikokimia protein hasil rancangan, termasuk berat molekul, titik isoelektrik, indeks kestabilan, indeks alifatik, dan hidropatisitas, guna memperkirakan kelayakan ekspresi biomolekul target. Desain penyuntingan genom ini mengacu pada perkembangan aplikasi CRISPR pada *Lactobacillus* sebagai dasar rekayasa presisi pada bakteri asam laktat (Mu et al., 2022; Zhong et al., 2023).

Tahap akhir mencakup pemodelan konseptual hubungan antara ekspresi EGF dan jalur EGFR–MAPK, proliferasi sel epitel, migrasi tepi luka, serta pemulihan mukosa, dengan mempertimbangkan pula pengaruh lingkungan nutrisi terhadap fungsi mikroba dan *barrier* mukosa. Selain itu, dilakukan evaluasi keamanan secara konseptual melalui pertimbangan rute administrasi, kontrol ekspresi gen, dan potensi risiko bakteremia apabila pendekatan ini dikembangkan lebih lanjut ke tahap eksperimental. Seluruh hasil dianalisis secara deskriptif dan diinterpretasikan berdasarkan kesesuaiannya dengan literatur utama mengenai mekanisme LGG, nutrisi, dan keamanan probiotik (Skrypnik & Suliburska, 2017; Zawistowska-Rojek & Tyski, 2018).



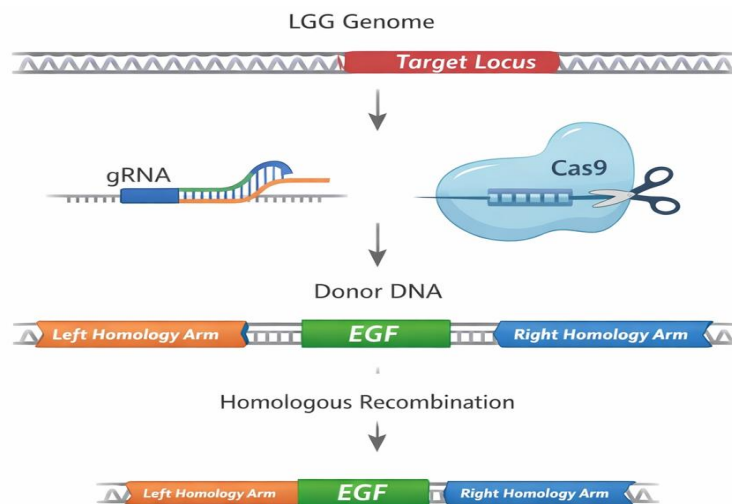
Gambar 1. Diagram alir tahapan penelitian *in silico* integrasi gen EGF ke dalam genom *Lactobacillus rhamnosus* GG menggunakan sistem CRISPR-Cas9

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Desain Integrasi Gen *EGF* ke dalam Genom *Lactobacillus rhamnosus* GG

Analisis desain integrasi menunjukkan bahwa pemilihan lokus target pada genom *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) harus diarahkan pada daerah yang stabil secara genomik dan tidak mengganggu fungsi gen esensial. Pertimbangan ini penting agar integrasi gen *epidermal growth factor* (*EGF*) tidak menurunkan viabilitas inang maupun mengubah karakter probiotiknya secara bermakna. Dalam konteks LGG, stabilitas genom selama proses produksi dan pemeliharaan strain menjadi dasar yang relevan untuk memilih lokus integrasi yang aman dan fungsional, sehingga rancangan integrasi tidak hanya presisi secara molekuler, tetapi juga rasional dari perspektif pengembangan probiotik fungsional (Stage et al., 2020). Dengan demikian, hasil identifikasi lokus integrasi pada penelitian ini dapat dipahami sebagai tahap krusial untuk memastikan bahwa penyisipan gen *EGF* tetap kompatibel dengan sifat biologis LGG sebagai inang.

Berdasarkan lokus yang telah dipilih, rancangan kontrak genetik disusun untuk mendukung ekspresi *EGF* secara terarah di dalam sistem LGG. Kontrak tersebut mencakup gen target, elemen promotor, *ribosome binding site*, terminator, dan donor DNA dengan *homology arms* yang sesuai untuk mendukung rekombinasi homolog. Dari sudut pandang desain, keberadaan elemen-elemen ini menunjukkan bahwa integrasi gen tidak hanya diarahkan pada keberhasilan penyisipan, tetapi juga pada kemungkinan ekspresi gen hasil integrasi secara stabil dan terkontrol. Hal ini selaras dengan perkembangan penerapan CRISPR-Cas9 pada *Lactobacillus*, yang menekankan pentingnya desain *guide RNA* (*gRNA*) yang spesifik, donor DNA yang kompatibel, serta kontrol terhadap potensi *off-target* dalam rekayasa genom bakteri asam laktat (Mu et al., 2022). Oleh karena itu, kualitas rancangan kontrak genetik dan sistem CRISPR-Cas9 menjadi penentu utama kelayakan integrasi gen *EGF* pada tahap *in silico*.



Gambar 2. Skema integrasi gen *EGF* ke dalam genom LGG menggunakan sistem CRISPR-Cas9

Evaluasi terhadap desain sistem CRISPR-Cas9 juga menegaskan bahwa pemilihan *gRNA* harus mempertimbangkan spesifisitas target, efisiensi pemotongan, dan minimisasi kemungkinan *off-target*. Dalam penelitian ini, rancangan *gRNA* dan donor DNA berfungsi sebagai fondasi teknis untuk integrasi gen *EGF* secara presisi pada lokus yang telah ditetapkan. Secara konseptual, hasil ini menunjukkan bahwa pendekatan CRISPR-Cas9 memiliki potensi yang memadai untuk digunakan dalam pengembangan LGG rekayasa sebagai platform probiotik fungsional. Namun, keberhasilan desain *in silico* tetap harus dipahami sebagai bukti konsep awal yang memerlukan validasi lanjutan pada tingkat eksperimental, terutama untuk memastikan efisiensi integrasi, stabilitas ekspresi, dan keamanan biologis strain rekombinan.

(Mu et al., 2022; Stage et al., 2020). Untuk meningkatkan transparansi metodologi dan menunjukkan kualitas rancangan sistem CRISPR-Cas9, parameter utama desain gRNA yang digunakan untuk integrasi gen EGF ke dalam genom LGG disajikan pada Tabel 1.

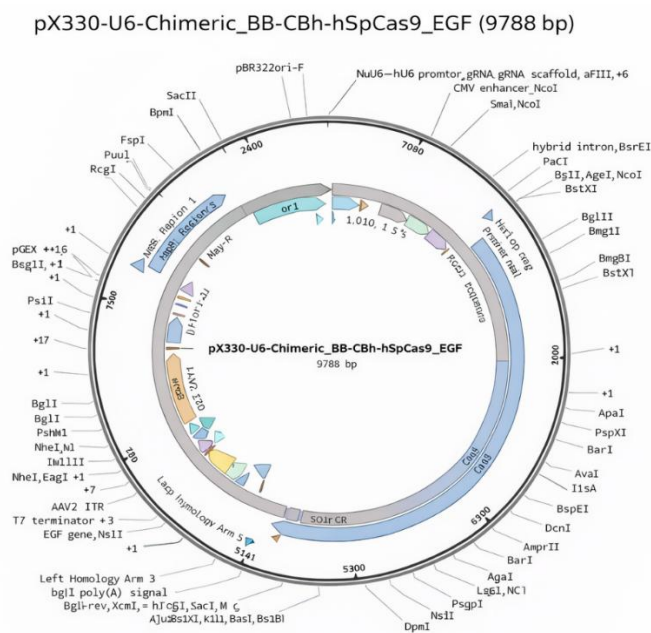
Tabel 1. Parameter fisikokimia protein EGF berdasarkan analisis ProtParam

Jenis Parameter	Nilai P
Number of amino acids	53
Theoretical pI	4.78
Molecular weight	6222.01
GRAVY	-0.425
Aliphatic Index	71.70

Sumber: ProtParam Analysis, 2025

Analisis pada Tabel 1 menunjukkan bahwa protein EGF hasil prediksi memiliki karakteristik fisikokimia yang mendukung ekspresi pada sistem LGG. Protein ini tersusun atas 53 asam amino dengan bobot molekul 6222,01 Da, sehingga tergolong protein berukuran kecil dan relatif ringan untuk diekspresikan pada sistem prokariotik. Nilai pI sebesar 4,78 menunjukkan bahwa EGF bersifat asam, sedangkan nilai GRAVY $-0,425$ mengindikasikan sifat hidrofilik yang mendukung kelarutan protein dalam lingkungan sel. Selain itu, indeks alifatik sebesar 71,70 menunjukkan bahwa protein ini memiliki potensi kestabilan yang cukup baik terhadap perubahan suhu.

Sebelum analisis sifat protein dilakukan, struktur sekunder mRNA EGF diprediksi menggunakan RNAfold dan menghasilkan nilai energi bebas minimum sebesar $-19,20$ kcal/mol, yang menunjukkan bahwa transkrip memiliki kestabilan sedang dan masih mendukung proses translasi (Gaspar et al., 2016). Dengan demikian, hasil prediksi mRNA dan parameter ProtParam secara bersama-sama menunjukkan bahwa EGF berpotensi diekspresikan dalam LGG. Meskipun demikian, kestabilan protein tetap perlu dicermati lebih lanjut karena protein dengan karakteristik tertentu dapat memiliki umur paruh yang terbatas di dalam sel, walaupun secara umum sifat hidrofilik dan ukuran protein yang kecil mendukung peluang ekspresi yang baik (Gasteiger et al., 2005).



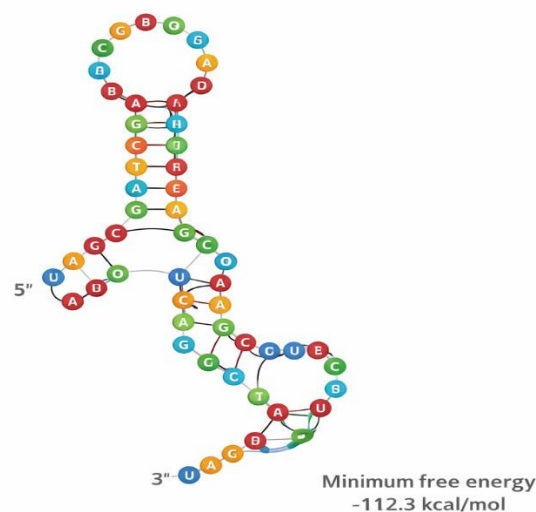
Gambar 3. Peta plasmid rekombinan pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9_EGF (9788 bp) dengan organisasi elemen genetik utama

Pada Gambar 3 menunjukkan peta plasmid rekombinan pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9_EGF berukuran 9788 bp yang dirancang untuk membawa komponen utama sistem CRISPR-Cas9 dan gen EGF dalam satu konstruksi. Pada peta sirkular ini terlihat elemen-elemen penting, seperti promotor U6 untuk ekspresi gRNA, sekuens Cas9, gen EGF, serta lengan homologi yang mendukung proses integrasi melalui rekombinasi homolog. Selain itu, berbagai situs restriksi juga ditampilkan untuk menunjukkan posisi pemotongan enzim yang berguna dalam proses konstruksi dan verifikasi plasmid. Secara keseluruhan, gambar ini memperjelas organisasi struktural plasmid rekombinan yang digunakan sebagai vektor integrasi gen EGF ke dalam genom LGG melalui sistem CRISPR-Cas9.

Prediksi Ekspresi Gen dan Karakteristik Biomolekul Hasil Rancangan

Prediksi ekspresi gen dilakukan melalui analisis struktur sekunder mRNA yang dihasilkan dari kontrak gen EGF setelah integrasi ke dalam genom LGG. Analisis ini bertujuan untuk menilai kestabilan transkrip dan kemungkinan keberlangsungan proses translasi pada sistem ekspresi bakteri. Struktur mRNA yang menunjukkan konfigurasi stabil dengan energi bebas minimum yang relatif rendah mengindikasikan bahwa transkrip cenderung lebih tahan terhadap degradasi, sehingga memiliki peluang lebih besar untuk mendukung ekspresi gen secara efektif. Oleh karena itu, hasil analisis mRNA menjadi dasar awal untuk menilai apakah rancangan genetik yang disusun layak diekspresikan pada LGG.

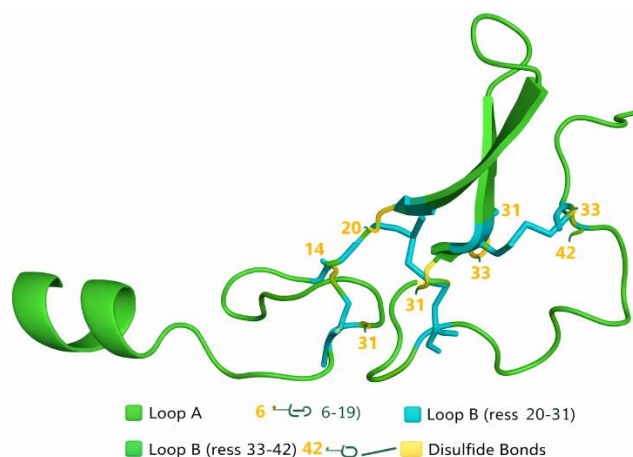
Kestabilan transkrip merupakan aspek penting karena keberhasilan ekspresi gen tidak hanya ditentukan oleh keberadaan gen target, tetapi juga oleh kemampuan mRNA untuk bertahan dalam lingkungan seluler sebelum diterjemahkan menjadi protein. Dalam konteks ini, mRNA yang terlalu tidak stabil dapat menurunkan efisiensi translasi, sedangkan struktur yang terlalu kompleks juga dapat menghambat akses ribosom. Gambar 3 menunjukkan prediksi struktur sekunder mRNA gen EGF hasil analisis *in silico*, yang menampilkan pembentukan *hairpin loop* dan *stem-loop* sebagai elemen utama lipatan transkrip. Struktur ini menggambarkan adanya pasangan basa pada beberapa bagian rantai mRNA yang membentuk daerah batang (*stem*) dan lengkungan (*loop*), yang berkontribusi terhadap kestabilan molekul. Nilai minimum free energy yang tercantum pada gambar menunjukkan tingkat kestabilan termodinamik struktur mRNA, di mana nilai yang lebih rendah mengindikasikan struktur yang lebih stabil. Dengan demikian, keseimbangan struktur sekunder mRNA menjadi parameter penting dalam menilai kelayakan ekspresi gen hasil integrasi, dan berdasarkan hasil prediksi tersebut, rancangan transkrip EGF pada penelitian ini menunjukkan karakteristik yang mendukung kemungkinan ekspresi yang memadai pada sistem LGG.



Gambar 4. Prediksi struktur sekunder mRNA gen EGF

Selain pada tingkat transkrip, analisis juga dilakukan terhadap karakteristik fisikokimia protein EGF hasil prediksi translasi. Parameter yang dievaluasi meliputi berat molekul, titik isoelektrik, *instability index*, *aliphatic index*, serta GRAVY. Analisis ini digunakan untuk memperkirakan stabilitas, kelarutan, dan sifat umum protein dalam lingkungan biologis. Protein dengan nilai GRAVY yang cenderung negatif menunjukkan sifat hidrofilik yang mendukung kelarutan, sedangkan *aliphatic index* yang memadai dapat mengindikasikan stabilitas yang lebih baik. Di sisi lain, *instability index* memberikan gambaran awal mengenai kemungkinan kestabilan protein setelah diekspresikan, sehingga seluruh parameter tersebut penting untuk menilai apakah biomolekul hasil rancangan berpotensi mempertahankan fungsi biologisnya.

Secara keseluruhan, hasil prediksi ekspresi gen dan analisis biomolekul menunjukkan bahwa rancangan EGF memiliki kelayakan awal untuk diekspresikan pada LGG dan berpotensi menghasilkan protein yang tetap aktif secara biologis. Hal ini penting karena fungsi utama EGF berkaitan dengan aktivasi jalur EGFR, yang berperan dalam proliferasi sel epitel, migrasi sel, dan regenerasi mukosa. Dengan demikian, keberhasilan prediksi pada tahap *in silico* memberikan dasar konseptual bahwa integrasi gen EGF pada LGG tidak hanya layak secara molekuler, tetapi juga relevan secara biologis dalam mendukung pemulihan mukosa melalui sinyal pertumbuhan epitel (Fang et al., 2013; Wang et al., 2017).



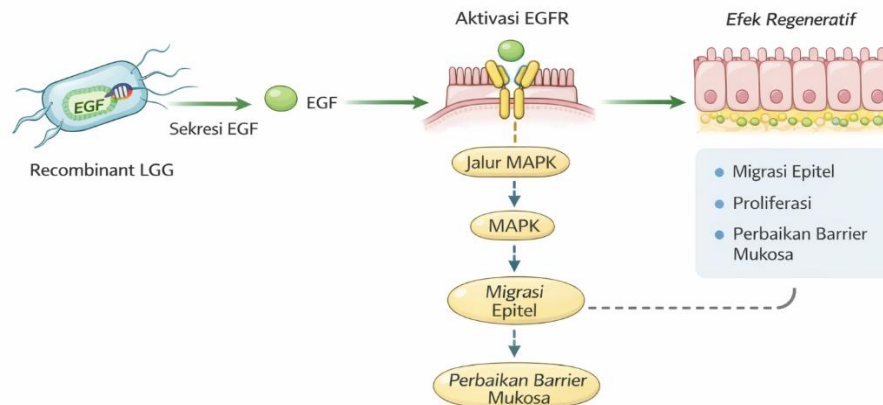
Gambar 5. Struktur tiga dimensi protein EGF hasil pemodelan *in silico* yang menunjukkan keberadaan jembatan disulfida (warna biru)

Pada Gambar 5 ditampilkan visualisasi struktur tiga dimensi protein EGF hasil pemodelan *in silico* dalam bentuk struktur 3D menggunakan perangkat SWISS-MODEL. Model ini menunjukkan kualitas yang baik dan reliabilitas yang tinggi, sebagaimana tercermin dari nilai *Global Model Quality Estimation* (GMQE) sebesar 0,81, sehingga layak digunakan untuk analisis struktural lebih lanjut (Biasini et al., 2014). Struktur EGF tampak tersusun atas tiga loop utama, yaitu loop A, loop B, dan loop C, yang distabilkan oleh ikatan disulfida intramolekuler antarresidu sistein pada posisi 6, 14, 20, 31, 33, dan 42. Pada struktur tersebut, jembatan disulfida yang ditandai dengan warna biru berperan penting dalam menjaga kestabilan konformasi protein dan mendukung integritas struktur tiga dimensi EGF. Selain itu, residu-residu penting pada masing-masing loop tampak berada di permukaan protein, sehingga mendukung aksesibilitas terhadap EGFR dan memperkuat peran loop dalam proses pengikatan reseptor (Ogiso et al., 2002). Dengan demikian, struktur protein EGF yang dimodelkan menunjukkan kestabilan dan konformasi yang mendukung potensi interaksi yang baik dengan EGFR, sehingga dapat mempertahankan fungsi biologisnya dalam proses proliferasi dan regenerasi sel epitel.

Implikasi Biologis terhadap Penyembuhan Mukosa dan Peran Lingkungan Nutrisi

Eksresi EGF pada sistem LGG secara konseptual berpotensi memengaruhi proses penyembuhan mukosa melalui aktivasi jalur EGFR pada sel epitel. Aktivasi reseptor ini diketahui memainkan peran penting dalam regulasi proliferasi sel, diferensiasi, serta perlindungan terhadap apoptosis pada jaringan epitel. Dalam kondisi kerusakan mukosa, aktivasi EGFR dapat memicu serangkaian jalur pensinyalan intraseluler, termasuk jalur MAPK, yang berkontribusi terhadap percepatan regenerasi jaringan dan pemulihan integritas epitel. Mekanisme ini telah dilaporkan sebagai salah satu proses penting dalam perlindungan dan perbaikan mukosa yang dimediasi oleh komponen probiotik tertentu (Fang et al., 2013).

Selain memicu proliferasi sel epitel, aktivasi jalur EGFR juga berperan dalam meningkatkan migrasi sel pada tepi luka (epithelial restitution). Gambar 6 menunjukkan skema mekanisme biologis bahwa LGG rekombinan mensekresikan EGF, kemudian EGF berikatan dengan EGFR pada permukaan sel epitel dan mengaktifkan jalur MAPK. Aktivasi jalur ini selanjutnya memicu efek regeneratif berupa peningkatan proliferasi sel epitel, migrasi epitel, dan perbaikan barrier mukosa. Migrasi sel epitel merupakan tahap awal yang sangat penting dalam proses penyembuhan luka mukosa karena memungkinkan penutupan area kerusakan secara cepat sebelum diferensiasi jaringan berlangsung. Dalam konteks ini, keberadaan sinyal pertumbuhan seperti EGF dapat mempercepat proses migrasi sel epitel sehingga mendukung re-epitelisasi jaringan mukosa yang mengalami kerusakan. Dengan demikian, ekspresi EGF pada LGG secara teoritis dapat meningkatkan kemampuan regeneratif mukosa melalui penguatan sinyal pertumbuhan yang berperan dalam proses penyembuhan jaringan (Wang et al., 2017).

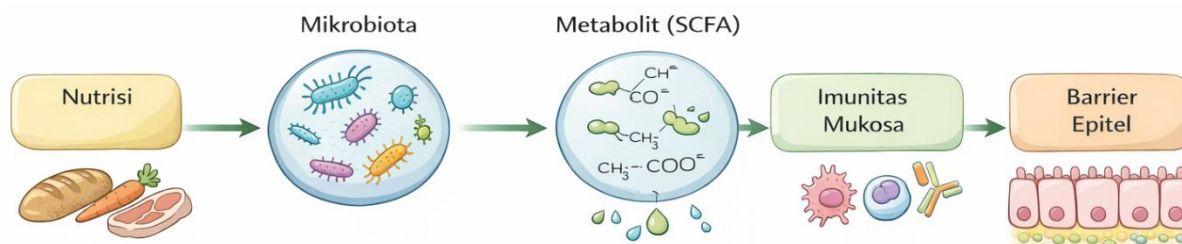


Gambar 6. Skema mekanisme EGF–EGFR dalam penyembuhan mukosa

Aktivasi EGFR juga berkaitan dengan pemeliharaan dan pemulihan *barrier* mukosa. *Barrier* mukosa yang utuh sangat penting untuk mencegah penetrasi patogen, toksin, dan molekul inflamasi ke dalam jaringan yang lebih dalam. Jalur EGFR diketahui berkontribusi terhadap regulasi ekspresi protein *tight junction*, produksi mukus, serta perlindungan sel epitel dari kerusakan inflamasi. Oleh karena itu, ekspresi EGF yang dihasilkan oleh LGG rekombinan berpotensi mendukung pemulihan fungsi *barrier* mukosa melalui mekanisme perlindungan epitel dan peningkatan integritas jaringan.

Efektivitas probiotik dalam mendukung penyembuhan mukosa juga dipengaruhi oleh lingkungan nutrisi. Zat gizi tertentu dapat memodulasi komposisi dan aktivitas mikrobiota usus, menyediakan substrat metabolik bagi mikroorganisme, serta menghasilkan metabolit seperti SCFA yang berperan dalam regulasi inflamasi dan pemeliharaan integritas epitel. Interaksi antara nutrisi, mikrobiota, dan sistem imun mukosa membentuk suatu jaringan regulasi kompleks yang dapat memperkuat atau melemahkan efek probiotik pada jaringan mukosa. Oleh karena itu, keberadaan lingkungan nutrisi yang mendukung dapat

meningkatkan potensi biologis LGG dalam memberikan efek protektif terhadap mukosa (Skrypnik & Suliburska, 2017).



Gambar 7. Interaksi nutrisi–mikrobiota–host dalam modulasi penyembuhan mukosa

Secara keseluruhan, interaksi antara ekspresi EGF, aktivasi jalur EGFR, serta modulasi oleh faktor nutrisi dan mikrobiota menunjukkan bahwa pendekatan probiotik rekayasa memiliki potensi untuk memberikan efek sinergis dalam mendukung pemulihan mukosa. LGG tidak hanya berperan sebagai pembawa gen rekombinan, tetapi juga sebagai bagian dari ekosistem mikrobiota yang dapat berinteraksi dengan faktor nutrisi dan sistem imun mukosa. Oleh karena itu, pengembangan LGG rekayasa yang mengekspresikan EGF dapat dipandang sebagai strategi yang mengintegrasikan aspek bioteknologi mikroba dan ilmu pangan dalam upaya mendukung kesehatan mukosa gastrointestinal (Skrypnik & Suliburska, 2017; Wang et al., 2017).

Keamanan, Keterbatasan Studi, dan Prospek Pengembangan Probiotik Fungsional

Pengembangan LGG rekayasa yang mengekspresikan EGF perlu mempertimbangkan aspek biosafety secara komprehensif, terutama karena melibatkan modifikasi genetik pada mikroorganisme yang berpotensi digunakan dalam konteks kesehatan atau pangan fungsional. Meskipun LGG secara umum dikenal memiliki profil keamanan yang baik dan telah banyak digunakan sebagai probiotik, beberapa laporan menunjukkan bahwa bakteri dari genus *Lactobacillus* dapat menyebabkan bakteremia pada individu dengan kondisi imun yang lemah atau penyakit tertentu. Oleh karena itu, evaluasi keamanan biologis menjadi komponen penting dalam pengembangan probiotik rekayasa, termasuk pengendalian ekspresi gen target, stabilitas genom, serta pemantauan potensi efek samping pada sistem host (Zawistowska-Rojek & Tyski, 2018; Rossi et al., 2019).

Tabel 3. Analisis risiko dan strategi biosafety pada LGG rekayasa

Risiko potensial	Mekanisme	Strategi mitigasi
Bakteriemia	Translokasi bakteri	Kontrol ekspresi
Ekspresi gen berlebih	Promoter kuat	Promoter inducible
Transfer gen	Horizontal gene transfer	Desain plasmid stabil

Aspek biosafety dalam pengembangan LGG rekayasa telah dipertimbangkan secara sistematis, mencakup risiko utama seperti bakteremia, ekspresi gen yang berlebihan, dan transfer gen horizontal beserta mekanisme terjadinya dan strategi mitigasinya, sebagaimana dirangkum pada Tabel 3. Selain itu, risiko bakteremia dan translokasi bakteri dari lumen gastrointestinal ke jaringan sistemik tetap perlu diperhatikan dalam desain probiotik rekombinan, karena meskipun kejadian tersebut relatif jarang pada individu sehat, kondisi seperti kerusakan mukosa berat atau immunosupresi dapat meningkatkan peluang terjadinya infeksi oportunistik. Oleh karena itu, penerapan strategi pengamanan seperti penggunaan promoter terkontrol, sistem regulasi ekspresi gen, dan konsep kill-switch pada

mikroorganisme rekayasa menjadi pendekatan yang relevan untuk menekan risiko biologis selama aplikasi probiotik rekombinan (Nobre et al., 2022; Zhong et al., 2023).

Penelitian ini juga memiliki keterbatasan yang berkaitan dengan penggunaan pendekatan *in silico* sebagai metode utama analisis. Pendekatan komputasional memungkinkan evaluasi awal terhadap desain integrasi gen dan prediksi ekspresi biomolekul, namun tidak sepenuhnya dapat merepresentasikan kompleksitas sistem biologis yang sebenarnya. Faktor-faktor seperti dinamika interaksi mikrobiota, respons imun host, stabilitas ekspresi gen dalam lingkungan biologis, serta kondisi fisiologis saluran cerna tidak dapat sepenuhnya disimulasikan dalam model komputasional. Oleh karena itu, hasil yang diperoleh dalam penelitian ini harus dipahami sebagai bukti konsep awal yang memerlukan verifikasi melalui pendekatan eksperimental yang lebih lanjut.

Tahap lanjutan yang diperlukan adalah validasi eksperimental melalui studi *in vitro* dan *in vivo* untuk memastikan keberhasilan integrasi gen, stabilitas ekspresi EGF, serta efek biologis terhadap jaringan mukosa. Uji *in vitro* dapat digunakan untuk mengevaluasi ekspresi protein, viabilitas LGG rekombinan, dan interaksi awal dengan sel epitel. Selanjutnya, studi *in vivo* diperlukan untuk menilai efektivitas biologis, respons imun, serta keamanan penggunaan probiotik rekayasa dalam sistem biologis yang lebih kompleks. Pendekatan bertahap ini penting untuk memastikan bahwa desain yang telah dikembangkan secara komputasional dapat diterapkan secara nyata dalam konteks biologis.

Dalam perspektif yang lebih luas, pengembangan LGG rekayasa yang mengekspresikan EGF memiliki prospek sebagai platform probiotik fungsional yang relevan bagi bidang kesehatan dan gizi. Integrasi pendekatan bioteknologi mikroba dengan konsep pangan fungsional membuka peluang untuk menghasilkan produk berbasis probiotik yang tidak hanya berperan dalam menjaga keseimbangan mikrobiota, tetapi juga memberikan manfaat tambahan melalui ekspresi biomolekul bioaktif. Namun, sebelum pendekatan ini dapat diterapkan secara luas, diperlukan evaluasi keamanan, efektivitas biologis, serta pertimbangan regulasi yang memadai untuk memastikan bahwa probiotik rekayasa tersebut aman dan bermanfaat bagi kesehatan manusia.

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa integrasi gen EGF ke dalam genom LGG menggunakan pendekatan CRISPR-Cas9 secara *in silico* memiliki kelayakan awal sebagai bukti konsep pengembangan probiotik fungsional untuk mendukung penyembuhan ulkus kronis. Hasil analisis menunjukkan bahwa gen EGF tidak memiliki similaritas signifikan dengan genom LGG, rancangan gRNA memiliki spesifisitas yang memadai, dan konstruksi genetik yang disusun berpotensi mendukung integrasi serta ekspresi gen target. Prediksi struktur sekunder mRNA menunjukkan kestabilan transkrip yang cukup baik, sedangkan analisis fisikokimia dan pemodelan tiga dimensi menunjukkan bahwa protein EGF hasil rancangan memiliki karakteristik yang mendukung fungsi biologisnya, termasuk keberadaan residu penting yang terekspos dan potensi interaksi dengan EGFR. Secara biologis, ekspresi EGF pada LGG berpotensi memperkuat aktivasi jalur EGFR–MAPK, sehingga dapat mendukung proliferasi dan migrasi sel epitel serta perbaikan barrier mukosa. Meskipun demikian, pendekatan ini masih terbatas pada simulasi komputasional, sehingga validasi lebih lanjut melalui uji *in vitro* dan *in vivo* tetap diperlukan untuk memastikan efisiensi integrasi, kestabilan ekspresi, keamanan biologis, dan relevansinya dalam pengembangan probiotik berbasis pangan dan gizi.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashaolu, T. J., Greff, B., & Varga, L. (2025). Action and immunomodulatory mechanisms, formulations, and safety concerns of probiotics. *Bioscience of Microbiota Food and Health*, 44(1), 4-15. <https://doi.org/10.12938/bmfh.2024-006>
- Biasni, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., . . . Lorenza, B. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, 252-258.
- Boob, A., Zhu, Z., Intasian, P., Jain, M., Vassily Andrew, P., Lane, S., . . . Zhao, H. (2024). CRISPR-COPIES: an in silico platform for discovery of neutral integration sites for CRISPR/Cas-facilitated gene integration. *Nucleic Acids Res.*
- CCHCS. (2024). Chronic Wound Management Care Guide. *Chronic Wound Management Care Guide Summary*.
- Chang, Y., Hwang, J., Chung, T.-Y., & Shin, Y. (2018). SOX2 Activation Using CRISPR/dCas9 Promotes Wound Healing in Corneal Endothelial Cells. *STEM CELLS*, 1851-1862.
- Chakravarty, K. and Gaur, S. (2019). Role of Probiotics in Prophylaxis of Helicobacter pylori Infection. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 20(2), 137-145. <https://doi.org/10.2174/1389201020666190227203107>
- Dissemond, J., Chadwick, P., Weir, D., Alves, P., Isoherranen, K., Martínez, J., . . . Malone, M. (2024). M.O.I.S.T. Concept for the Local Therapy of. *The International Journal of Lower*, 1-9.
- Duan, X., Chen, P., Xu, X., Han, M., & Li, J. (2022). Role of Gastric Microorganisms Other than Helicobacter pylori in the Development and Treatment of Gastric Diseases. *Biomed Research International*, 2022(1). <https://doi.org/10.1155/2022/6263423>
- Fang, Y., Liu, L., Dempsey, P. J., Tsai, Y., Raines, E. W., Wilson, C. L., ... & Polk, D. B. (2013). A Lactobacillus rhamnosus GG-derived Soluble Protein, p40, Stimulates Ligand Release from Intestinal Epithelial Cells to Transactivate Epidermal Growth Factor Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 288(42), 30742-30751. <https://doi.org/10.1074/jbc.m113.492397>
- Febrianti, N. R., Tahir, T., & Yusuf, S. (2019). Study Literature Peran Epidermal Growth Factor dalam Proses Penyembuhan Luka. *Jurnal Keperawatan Muhammadiyah*, 7-13.
- Freudl, R. (2018). Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems. *Microbial Cell Factories*.
- Gaspar, P., Moura, G., Santos, M., & Oliveira, J. (2016). mRNA secondary structure optimization using a correlated stem-loop prediction. *Nucleic Acids Research*, 5490.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M., Appel, R., & Bairoch, A. (2005). *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*. Humana Press.
- Henn, D., Zhao, D., Sivaraj, D., Trotsyuk, A., Bonham, C., Fischer, K., & Kehl, T. (2023). Cas9-mediated knockout of NdrG2 enhances the regenerative potential of dendritic cells for wound healing. *Nat Commun.*, 4729.
- Kolanu, N. (2024). CRISPR-Cas9 Gene Editing: Curing Genetic Diseases by Inherited Epigenetic Modifications. *Global Medical Genetics*, 113-122.

- Konstantakos, V., Nentidis, A., Krithara, A., & Paliouras, G. (2022). CRISPR–Cas9 gRNA efficiency prediction: an overview of predictive tools and the role of deep learning. *Nucleic Acids Research*, 3616-3637.
- Lyra, A., Saarinen, M., Putaala, H., Olli, K., Lahtinen, S. J., Ouwehand, A. C., ... & Tiihonen, K. (2012). Bifidobacterium animalissp.lactis420 Protects against Indomethacin-Induced Gastric Permeability in Rats. *Gastroenterology Research and Practice*, 2012, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2012/615051>
- Martinengo, L., Olsson, M., Bajpai, R., Soljak, M., Upton, Z., Schmidtchen, A., ... Krister, J. (2019). Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Ann Epidemiol*, 8-15.
- Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J.-H., . . . Shirouzu, M. (2002). Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*, 775-787.
- O'Hara, A. M. and Shanahan, F. (2007). Mechanisms of Action of Probiotics in Intestinal Diseases. *The Scientific World Journal*, 7, 31-46. <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.26>
- Perera, D., Perera, K., & Peiris, D. (2021). A Novel In Silico Benchmarked Pipeline Capable of Complete Protein Analysis: A Possible Tool for Potential Drug Discovery. *Biology (Basel)*, 1113.
- Redmond, M. C., Gethin, G., & Finn, D. P. (2025). A Review of Chronic Wounds and Their Impact on Negative Affect, Cognition, and Quality of Life. *International Wound Journal*.
- Schilrreff, P., & Alexiev, U. (2022). Chronic Inflammation in Non-Healing Skin Wounds and Promising Natural Bioactive Compounds Treatment. *Int. J. Mol. Sci.*, 4928.
- Ugbaja, S., Mushebenge, A.-A., Kumalo, H., Ngcobo, M., & Galeni, N. (2025). Potential Benefits of In Silico Methods: A Promising Alternative in Natural Compound's Drug Discovery and Repurposing for HBV Therapy. *Pharmaceuticals*.
- Yin, Z., Wang, Y., Fang, X., Liu, C., Xiaoyang, G., Liu, S., . . . Li, K. (2024). Lactobacillus rhamnosus GG and Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 promote infected wound healing via regulation of the wound microenvironment. *Microb Biotechnol*.
- Youssef, H., Elsenosi, Y., Mahfouz, M., & Hussein, S. (2020). Novel role of probiotics in improving cell proliferation and regulating proinflammatory cytokine-mediated oxidative damage of ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Benha Veterinary Medical Journal*, 38(1), 9-16. <https://doi.org/10.21608/bvmj.2020.21378.1146>
- Zhu, D., Liu, F., Xu, H., Bai, Y., Zhang, X., Saris, P., & Qiao, M. (2015). Isolation of strong constitutive promoters from Lactococcus lactis subsp. lactis N8. *FEMS Microbiology Letters*.