

## Ringkasan Pengkajian Keamanan Pangan Jagung PRG event 5307

### I. Pendahuluan

Jagung PRG event 5307 merupakan jagung produk rekayasa genetik dari perusahaan PT. Syngenta Seed Indonesia yang dikembangkan untuk memperoleh jagung yang memiliki sifat ketahanan terhadap hama golongan Coleoptera termasuk *western corn rootworm (Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte; WCRW), *northern corn rootworm (D.longicornis barberi* Smith and Lawrence; NCRW) dan *Mexican corn rootworm (Diabrotica virgifera zea* Kryan and Smith; MCRW). Jagung PRG event 5307 mengandung dua gen interes yaitu gen *ecry3.1Ab* dan gen *pmi*.

Jagung PRG event 5307 telah memperoleh sertifikat aman pangan di 9 (sembilan) negara yaitu Australia (2012), Kanada (2013), Jepang (2013), Korea Selatan (2013), Filipina (2015), Rusia (2014), Taiwan (2012), Amerika Serikat (2012), dan Vietnam (2016). Sertifikat aman pakan telah diperoleh di 8 (delapan) negara yaitu Kanada (2013), Jepang (2013), Korea Selatan (2013), Filipina (2015), Rusia (2014), Taiwan (2017), Amerika Serikat (2012), dan Vietnam (2016). Sedangkan sertifikat aman lingkungan telah diperoleh di Kanada (2013).

Pengkajian keamanan pangan jagung PRG event 5307 dilakukan berdasarkan Peraturan Kepala Badan POM HK.03.1.23.03.12.1563 Tahun 2012 tentang Pedoman Pengkajian Keamanan Pangan Produk Rekayasa Genetik, yang telah diubah oleh Peraturan Kepala Badan POM No. 19 Tahun 2016 dan surat penugasan ketua Komisi Keamanan Hayati kepada Wakil Ketua Bidang Keamanan Pangan KKH PRG Nomor B-57/KKH PRG/10/2017 Tanggal 20 Oktober 2017 Perihal Penugasan Pengkajian Keamanan Pangan Produk Rekayasa Genetik (PRG) Komoditas Jagung PRG Event 5307. TTKH PRG Bidang Keamanan Pangan telah melakukan pengkajian keamanan pangan jagung PRG event 5307 berdasarkan informasi genetik dan informasi keamanan pangan yang terdiri atas kesepadanan substansial, alergenisitas, dan toksisitas sebagaimana diuraikan di bawah ini.

### II. Informasi Genetik

#### II.1. Elemen Genetik

Jagung PRG event 5307 mengandung dua gen interes yaitu:

1. Gen *ecry3.1Ab* menyandi protein eCry3.1Ab untuk ketahanan terhadap hama penggerek akar jagung spesies *Diabrotica sp.* yang diregulasi oleh promotor CMP dan terminator NOS; dan
2. Gen *pmi* menyandi enzim *phosphomannose isomerase* (PMI), sebagai marka seleksi dan diregulasi oleh promotor ZmUbilnt dan terminator NOS.

(New, 2010).

#### II.2. Sumber Gen Interes

Sumber gen interes jagung PRG event 5307, yaitu gen *ecry3.1Ab* merupakan gen gabungan antara gen *mcry3A* (modifikasi *cry3A*) yang berasal dari *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* dengan gen *cry1Ab* yang berasal dari *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD-1 (Walters *et al.*, 2010; Chen dan Stacy,

2007; Geiser *et al.*, 1986; Koziel *et al.*, 1997; Murray *et al.*, 1989). Promoter CMP berasal dari Cestrum Yellow Leaf Curling Virus. Terminator NOS berasal dari *Agrobacterium tumefaciens* (Hohn *et al.*, 2007; Depicker *et al.*, 1982; New, 2010).

Gen *pmi* berasal dari *Escherichia coli* strain K-12, promoter ZmUbiInt berasal dari tanaman jagung, dan terminator NOS berasal dari *A. tumefaciens* (Negrotto *et al.*, 2000 ; Christensen *et al.*, 1992; Depicker *et al.*, 1982).

### II.3. Sistem Transformasi

Jagung PRG *event* 5307 dirakit melalui metode transformasi dimediasi *A.tumefaciens* (Negrotto *et al.*, 2000). Eksplan embrio muda (*immature embryo*) tanaman jagung galur NP2222 diinfeksi dengan *A. tumefaciens* strain LBA4404 yang mengandung plasmid pSYN12774 (Komari *et al.* 1996; Xing *et al.* 2008). Plasmid pSYN12774 tersebut mengandung dua kaset yaitu 1) kaset *ecry3.1Ab* yang berisi gen *ecry3.1Ab* yang diregulasi oleh promoter CMP dan terminator NOS, dan 2) kaset *pmi* berisi gen *pmi* yang diregulasi oleh promoter ZmUbiInt dan terminator NOS.

### II.4. Stabilitas Genetik

Hasil analisis *real-time polymerase chain reaction* (PCR) jagung PRG *event* 5307 menunjukkan bahwa T-DNA stabil sampai lima generasi silang balik (BC5F3). Data dari analisis *Southern Blot* menunjukkan bahwa jagung PRG *event* 5307 mengandung satu kopi gen *ecry3.1Ab* dan *pmi* yang diwariskan mengikuti hukum Mendel (New, 2011a; New, 2011b). Selain itu, melalui analisis *Southern Blot* ditemukan hasil yang penting yaitu tidak dideteksinya sekuen *backbone* dari plasmid transformasi pSYN17629 (New, 2011a).

Berdasarkan hasil kajian informasi genetik dapat disimpulkan bahwa:

1. Jagung PRG *event* 5307 mengandung satu kopi gen *ecry3.1Ab* dan *pmi* yang diwariskan mengikuti hukum Mendel;
2. Jagung PRG *event* 5307 tidak mengandung sekuen *backbone* dari plasmid transformasi pSYN17629; dan
3. Gen *ecry3.1Ab* dan *pmi* dalam jagung PRG *event* 5307 stabil sampai lima generasi silang balik (BC5F3).

## III. Informasi Keamanan Pangan

### III.1 Kesepadanan Substansial

Pengkajian kesepadanan substansial dilakukan berdasarkan dokumen hasil penelitian (Launis, 2011). Bahan yang digunakan untuk uji kesepadanan substansial adalah tanaman jagung PRG *event* 5307 dan jagung non PRG sebagai kontrol. Jagung ditanam selama musim tanam tahun 2008 di enam lokasi di Amerika Serikat, yaitu di (1) Stanton, MN, (2) Janesville, WI, (3) New Haven, IN, (4) Shirley, IL, (5) Marshall, MO, dan (6) Bloomington, IL. Di setiap lokasi, jagung ditanam mengikuti rancangan *randomized complete block design* dengan tiga ulangan per lokasi. Semua tanaman memperoleh perlakuan pestisida yang umum digunakan untuk mempertahankan kesehatan tanaman yang optimum.

Setelah dipanen, biji jagung (*grain*) dan tanaman jagung (*forage*) dikirim ke Covance Laboratories, Inc., 3301 Kinsman Boulevard, Madison, WI 53704 USA untuk dianalisis komposisinya. Covance Laboratories sudah menerapkan *Good Laboratory Practices* (GLP).

Biji jagung dianalisis untuk kadar proksimat (air, protein, lemak, abu, dan karbohidrat *by-difference*), ADF (*acid detergent fiber*), NDF (*neutral detergent fiber*), TDF (*total dietary fiber*), pati, profil asam amino (alanin, arginin, asam aspartat, sistin, asam glutamat, glisin, histidin, isoleusin, leusin, lisin, fenilalanin, metionin, prolin, serin, treonin, triptofan, tirosin, valin), profil asam lemak (palmitat, stearat, oleat, linoleat, linolenat, arakhidat, eikosenoat, dan behenat), mineral (kalsium, tembaga, besi, magnesium, mangan, fosfor, kalium, natrium, selenium dan seng), vitamin (beta-karoten, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, alfa-tokoferol, niasin, dan asam folat), zat antinutrien (asam fitat, rafinosa, inhibitor tripsin), dan metabolit sekunder (furfural, asam ferulat, inositol dan asam p-kumarat).

Tanaman jagung dianalisis untuk kadar proksimat (air, protein, lemak, abu, dan karbohidrat *by-difference*), ADF, NDF, dan mineral (kalsium, dan fosfor).

Hasil analisis komposisi baik untuk biji jagung maupun untuk tanaman jagung menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata di antara jagung PRG *event* 5307 dengan jagung kontrol non PRG, dan masuk ke dalam kisaran komposisi jagung pada umumnya.

Berdasarkan pengkajian kesepadanan substansial dapat disimpulkan bahwa jagung PRG *event* 5307 sepadan secara substansial dengan jagung non PRG.

## III.2 Alergenisitas

Pengkajian alergenisitas terhadap protein eCry3.1Ab dan PMI yang diekspresikan pada jagung PRG *event* 5307 dilakukan melalui analisis bioinformatika, pengukuran konsentrasi protein dan stabilitas protein, yang meliputi stabilitas cerna dan stabilitas panas.

Protein insektisidal eCry3.1Ab diperoleh melalui fusi protein mCry3A dengan Cry1Ab dan memiliki 653 asam amino yang terdiri atas 22 asam amino tambahan pada ujung N, diikuti oleh 459 asam amino dari mCry3A serta 172 asam amino dari Cry1Ab. Protein mCry3A merupakan modifikasi dari protein Cry3A dari *B.thuringiensis* subsp. *tenebrionis* melalui optimisasi penggunaan codon dari gen penyandinya dan penggantian beberapa asam amino dalam sekuen asam aminonya (Sekar et al., 1987 dan Chen dan Stacy, 2007). Gen cry1Ab yang menyandi protein Cry1Ab berasal dari *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* galur HD-1 dan telah dioptimisasi penggunaan codonnya (Koziel et al., 1997).

### III.2.1 Analisis Bioinformatika

Kemiripan sekuen protein eCry3.1Ab dan PMI dengan alergen dianalisis menggunakan database protein alergen yang diperoleh dari *Food Allergy Research and Resource Program* (FARRP) *Allergen Online Database* versi 2016 dengan perangkat FASTA, serta pencarian kesamaan sekuen delapan atau lebih asam amino dengan sekuen protein dalam database. *Allergen Online Database* versi 2015 dengan perangkat FASTA.

Hasil analisis menunjukkan bahwa tidak ada kemiripan sekuen asam amino yang relevan secara biologis (35% atau lebih kesamaan asam amino di dalam sekuen

yang mengandung 80 asam amino) antara protein eCry3.1Ab dan PMI dengan sekuen asam amino protein alergen. Selain itu, tidak ada kesamaan delapan asam amino atau lebih pada protein eCry3.1Ab dan PMI dengan protein alergen dalam database (Bailey, 2016a dan Bailey, 2016b).

### III.2.2 Analisis Konsentrasi Protein eCry3.1Ab dan PMI

Konsentrasi protein eCry3.1Ab dan PMI pada jaringan jagung PRG event 5307 ditentukan menggunakan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (Bednarcik, 2011). Konsentrasi protein eCry3.1Ab dan PMI di dalam biji jagung PRG event 5307 ditemukan masing-masing sebesar 2,37-9,64 µg/g berat kering dan 0,70 - 3,82 µg/g berat kering. Jumlah protein eCry3.1Ab dan PMI, masing-masing hanya sebesar 0,00579% dan 0,00192% dari jumlah total protein dalam biji jagung PRG event 5307.

### III.2.3 Analisis Stabilitas Protein

Protein eCry3.1Ab dan PMI dihasilkan dalam jumlah yang sedikit oleh tanaman jagung PRG event 5307, sehingga untuk keperluan pengujian stabilitas protein digunakan protein yang diproduksi pada bakteri *E. coli*. Kesetaraan protein eCry3.1Ab dan PMI yang dihasilkan oleh tanaman jagung PRG event 5307 dengan yang dihasilkan oleh bakteri *E. coli* diuji dengan metode SDS-PAGE, Western blot, analisis sekuen N-terminal, reaksi glikosilasi, analisis aktivitas, dan analisis pemetaan massa peptida. Hasil analisis menunjukkan bahwa protein eCry3.1Ab dan PMI yang dihasilkan oleh bakteri *E.coli* ekuivalen dengan protein eCry3.1Ab dan PMI yang dihasilkan oleh jagung PRG event 5307 (Nelson, 2009a dan Nelson 2009b).

#### III.2.3.1 Analisis Stabilitas Cerna Protein

Analisis stabilitas protein eCry3.1Ab dilakukan melalui uji daya cerna menggunakan simulasi cairan lambung (*Simulated Gastric Fluid* - SGF) dalam rentang waktu 60 menit pada suhu 37°C, serta simulasi cairan usus (*Simulated Intestinal Fluid* - SIF) dalam rentang waktu selama 48 jam pada suhu 37°C. Hasil hidrolisis protein dalam SGF dievaluasi menggunakan metode SDS PAGE, Western blot, dan analisis densitometri (Song, 2010a). Evaluasi dengan SDS menunjukkan bahwa protein eCry3.1Ab terhidrolisis dalam waktu kurang dari 30 detik dalam SGF. Pengujian lebih lanjut hasil SDS-PAGE dengan densitometri menunjukkan bahwa masih terdapat 3% dari jumlah semula eCry3.1Ab setelah inkubasi selama 15 detik dalam SGF, sedangkan setelah inkubasi selama 30 detik tidak terdapat pita eCry3.1Ab yang terdeteksi. Hasil evaluasi dengan Western blot mengindikasikan pula, bahwa setelah inkubasi selama 30 detik dalam SGF, tidak terdeteksi adanya pita protein eCry3.1Ab maupun fragmen-fragmennya.

Evaluasi hasil hidrolisis protein dalam SIF menggunakan metode SDS PAGE dan Western blot menunjukkan bahwa tidak terdapat lagi protein utuh eCry3.1Ab setelah inkubasi selama 1 menit (Seastrum, 2010). Pita protein berukuran lebih kecil yaitu pada 62, 56, 40, dan 5 kDa yang masih terdeteksi merupakan produk hidrolisis protein eCry3.1Ab sebagaimana teridentifikasi dengan uji antibodi.

Analisis stabilitas cerna protein PMI dilakukan melalui uji daya cerna menggunakan SGF dalam rentang waktu 60 menit pada suhu 37°C (Nelson, 2009c), serta dengan

SIF dalam rentang waktu selama 48 jam pada suhu 37°C (Nelson, 2009c). Hasil hidrolisis protein dievaluasi dengan menggunakan metode SDS PAGE dan Western blot. Hasil evaluasi menunjukkan bahwa setelah inkubasi selama 1 menit dalam SGF, tidak terdeteksi adanya protein PMI maupun fragmen-fragmennya. Demikian pula setelah inkubasi selama 15 menit dalam SIF, tidak terdeteksi adanya pita protein utuh PMI maupun fragmen-fragmennya berdasarkan evaluasi dengan Western blot.

### **III.2.3.2 Analisis Stabilitas Panas Protein**

Analisis efek pemanasan terhadap immunoreaktivitas protein eCry3.1Ab dan PMI yang diproduksi oleh *E. coli* dilakukan dengan ELISA yang menggunakan antibodi yang masing-masing spesifik terhadap protein eCry3.1Ab dan PMI (Song, 2010b; Mims, 2008), serta uji aktivitas insektisidal dari protein eCry3.1Ab (Nelson, 2010) serta uji enzimatis terhadap PMI (Birukou, 2017).

Hasil uji stabilitas panas protein eCry3.1Ab menunjukkan bahwa aktivitas insektisidal dari protein eCry3.1Ab hilang setelah pemanasan pada suhu 95°C selama 30 menit (Nelson, 2010). Berdasarkan hasil ELISA, ditunjukkan pula, bahwa protein eCry3.1Ab kehilangan hampir seluruh immunoreaktivitasnya (<LOD dari ELISA) setelah pemanasan selama 30 menit pada suhu 65°C atau lebih (Song, 2010b).

Hasil uji stabilitas panas protein PMI menunjukkan bahwa protein PMI mengalami penurunan sebesar 94% dari immunoreaktivitasnya setelah pemanasan pada suhu 65°C selama 30 menit dan kehilangan hampir seluruh immunoreaktivitasnya (<LOD dari ELISA) setelah pemanasan pada suhu 95°C selama 30 menit (Mims, 2008).

Hasil SDS-PAGE dan Western blot menunjukkan bahwa pita protein PMI tetap terdeteksi setelah pemanasan pada suhu 90°C selama 60 menit, namun berdasarkan uji enzimatis ditunjukkan pula bahwa PMI kehilangan seluruh aktifitas enzimatisnya setelah pemanasan pada suhu 90°C selama 60 menit (Birukou, 2017).

Berdasarkan pengkajian alergenitas yang meliputi analisis bioinformatika, konsentrasi protein, maupun analisis stabilitas cerna dan stabilitas panas protein, dapat disimpulkan bahwa protein eCry3.1Ab dan PMI tidak menunjukkan adanya potensi menimbulkan alergi.

## **III.3 Toksisitas**

Pengujian toksisitas akut telah dilakukan terhadap protein eCry3.1Ab dan PMI di laboratorium yang menerapkan GLP.

### **III.3.1 Toksisitas Akut Protein eCry3.1Ab**

Jumlah protein yang dihasilkan oleh tanaman jagung PRG event 5307 sangat sedikit, oleh karena itu untuk keperluan pengujian, protein eCry3.1Ab dan PMI diproduksi pada bakteri *E.coli*. Kesetaraan protein eCry3.1Ab dan PMI yang dihasilkan oleh tanaman jagung PRG event 5307 dengan yang dihasilkan oleh bakteri *E. coli* diuji dengan metode SDS-PAGE, Western blot, analisis sekuen N-terminal, reaksi glikosilasi, analisis aktivitas, dan analisis pemetaan massa peptida.

Hasil analisis menunjukkan bahwa protein eCry3.1Ab dan PMI yang dihasilkan oleh bakteri *E.coli* ekuivalen dengan protein eCry3.1Ab dan PMI yang dihasilkan oleh jagung PRG event 5307 (Nelson, 2009a dan Nelson 2009b).

Pengujian toksisitas akut telah dilakukan terhadap protein eCry3.1Ab dan telah dilaporkan (Korgaonkar, 2009a).

Tujuan pengujian adalah untuk melakukan uji toksisitas akut terhadap ECRY3.1AB-0208 yang mengandung protein eCry3.1Ab dengan kemurnian sebesar 89,6% b/b, pada mencit jantan dan betina, dengan cara cekokan tunggal. Sebagai kontrol digunakan 0,5% (b/v) larutan CMC yang juga digunakan sebagai pelarut bahan uji.

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit strain Crl:CD-1 (ICR), berumur sekitar 49 hari sewaktu diterima, yang berasal dari Charles River Laboratories, Inc., Raleigh, NC. Berat badan mencit jantan sekitar 28,5 - 34,1 g, sedangkan mencit betina sekitar 23,3 - 27,2 g, pada hari ke 1 (dimulainya pencekokan). Mencit diaklimatisasi selama 17 hari. Mencit ditempatkan dalam kandang *stainless steel* secara individual yang ditempatkan dalam ruangan bersuhu  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$  dan kelembaban relatif  $50 \pm 20\%$ , dengan pencahayaan selama 12 jam terang 12 jam gelap. Ransum bersertifikat diperoleh dari PMI Nutrition International dan diberikan secara ad libitum, air minum juga diberikan secara ad libitum. Hewan dipelihara sesuai standar *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Fasilitas laboratorium uji sudah terakreditasi oleh AAALAC International. Umur mencit saat dimulainya pencekokan yaitu 9 minggu.

Sebanyak 20 ekor mencit jantan dan betina dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol (5 ekor jantan dan 5 ekor betina) dan kelompok perlakuan (5 ekor jantan dan 5 ekor betina). Mencit dipuasakan selama 3 jam sebelum diberi cekokan. Kelompok kontrol diberi cekokan larutan CMC 0,5 %, dengan dosis sebesar 10 ml/kg BB. Sedangkan kelompok perlakuan diberi cekokan protein eCry3.1Ab dengan dosis sebesar 2000 mg/kg BB. Pemberian bahan uji dan kontrol hanya dilakukan sekali, yaitu pada hari ke 1, sedangkan pengujian berlangsung selama 14 hari.

Semua mencit diamati 2 kali sehari (pagi dan sore) untuk mortalitas dan morbiditasnya. Pemeriksaan klinis dilakukan pada: 1) saat pemberian bahan uji (sekitar 1-2 jam setelah pemberian bahan uji), 2) sekitar 4-5 jam setelah pemberian bahan uji, dan 3) satu kali sehari pada hari-hari berikutnya (hari ke-2 sampai dengan hari ke-13). Pemeriksaan fisik yang lebih mendalam dilakukan 1 minggu sekali. Penimbangan berat badan dan perhitungan jumlah ransum yang dikonsumsi dilakukan setiap hari. Pada akhir pengujian, semua mencit dimatikan dengan cara dieutanasi menggunakan gas karbon-dioksida. Nekropsi lengkap dan pengujian mikroskopis organ jaringan tertentu dilakukan pada seluruh mencit.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa: (1) tidak ada mencit yang mati selama pengujian berlangsung, (2) tidak ditemukan adanya kelainan klinis yang diakibatkan oleh pemberian bahan uji, (3) pemberian bahan uji tidak berpengaruh terhadap berat badan dan konsumsi ransum, dan (4) tidak ada perbedaan secara makroskopis dan mikroskopis organ dalam yang diakibatkan oleh pemberian bahan uji dibandingkan dengan kontrol.

Dari hasil pengkajian toksisitas disimpulkan bahwa pemberian protein eCry3.1Ab sebanyak 2000 mg/kg BB tidak memberikan pengaruh toksik pada mencit.

### III.3.2 Toksisitas Akut Protein PMI

Pengujian toksisitas akut telah dilakukan terhadap protein PMI dan telah dilaporkan (Korgaonkar, 2009b).

Jumlah protein yang dihasilkan oleh tanaman jagung PRG *event* 5307 sangat sedikit, oleh karena itu untuk keperluan pengujian, protein PMI diproduksi pada bakteri *E.coli*. Hasil analisis ekivalensi menunjukkan kesamaan protein eCry3.1Ab yang diproduksi tanaman jagung PRG *event* 5307 dan bakteri *E.coli*, telah diuji dan dilaporkan (Nelson, 2009b).

Berhubung jumlah protein yang dihasilkan oleh tanaman jagung sangat sedikit, maka untuk keperluan pengujian, protein PMI diproduksi pada bakteri *E. coli*. Ekivalensi protein PMI yang dihasilkan oleh tanaman jagung PRG *event* 5307 dengan yang dihasilkan oleh bakteri *E. coli*, telah diuji dan dilaporkan (Nelson, 2009). Hasil pengujian tersebut menyimpulkan bahwa protein PMI yang dihasilkan oleh bakteri *E. coli* ekivalen dengan protein PMI yang dihasilkan oleh tanaman jagung PRG *event* 5703.

Tujuan pengujian adalah untuk melakukan uji toksisitas akut terhadap PMI-0105 yang mengandung protein PMI dengan kemurnian sekitar 89,5 %, pada mencit jantan dan betina, dengan cara cekokan tunggal. Sebagai kontrol digunakan air terdeionisasi, yang juga digunakan sebagai pelarut bahan uji (Korgaonkar, 2009b).

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit, strain Crl:CD-1(ICR), berumur sekitar 7 minggu (50 hari) sewaktu diterima, yang berasal dari Charles River Laboratories, Inc., Raleigh, North Carolina. Berat badan mencit jantan antara 28,7 – 34,1 g untuk jantan dan 22,8 – 24,2 g untuk betina pada hari ke-0. Mencit diaklimatisasi selama 15 hari dan ditempatkan dalam kandang *stainless steel* secara individual. Kandang ditempatkan dalam ruangan bersuhu  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$  dan kelembaban relatif 30 - 70 %, dengan pencahayaan selama 12 jam terang 12 jam gelap. Ransum mencit berupa *Certified Rodent LabDiet® 5002 (meal)* diperoleh dari PMI (Purina Mills, Inc.) Nutrition International, LLC, dan diberikan secara *ad libitum*, air minum juga diberikan secara *ad libitum*. Hewan dipelihara sesuai standar *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Fasilitas laboratorium uji sudah terakreditasi oleh *AAALAC International*.

Sebanyak 20 ekor mencit jantan dan betina dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol (5 ekor jantan dan 5 ekor betina) dan kelompok perlakuan (5 ekor jantan dan 5 ekor betina). Mencit dipuaskan selama 3 jam sebelum diberi cekokan. Kelompok kontrol diberi cekokan air terdeionisasi. Sedangkan kelompok perlakuan diberi cekokan protein PMI dengan dosis sebesar 2000 mg/kg BB. Pemberian bahan uji dan kontrol hanya dilakukan sekali, yaitu pada hari ke-1, sedangkan pengujian berlangsung selama 14 hari.

Semua mencit diamati dua kali sehari untuk mortalitas dan morbiditasnya. Pemeriksaan klinis dilakukan pada hari pertama (1 - 2 jam dan 4 - 5 jam setelah pemberian bahan uji) dan selanjutnya sekali sehari sejak hari ke-2 sampai hari ke-13. Pemeriksaan fisik secara detail dilakukan seminggu sekali. Pengukuran berat badan dan jumlah ransum yang dikonsumsi dilakukan setiap hari. Pada akhir pengujian, semua mencit dimatikan dan nekropsi lengkap serta pengujian mikroskopis organ jaringan tertentu dilakukan pada seluruh mencit.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa: (1) tidak ada mencit yang mati selama pengujian berlangsung, (2) tidak ada tanda-tanda toksistas sistemik akibat pemberian bahan uji, (3) pemberian bahan uji tidak berpengaruh terhadap berat badan dan konsumsi ransum, dan (4) tidak ada perbedaan patologi makroskopis

dan mikroskopis yang diakibatkan pemberian bahan uji dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Dari hasil pengkajian toksisitas disimpulkan bahwa pemberian protein PMI sebanyak 2000 mg/kg BB, tidak memberikan pengaruh toksik pada mencit.

#### IV. Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengkajian tentang informasi genetik, kesepadanan substansial, alergenisitas, dan toksisitas disimpulkan hal-hal sebagai berikut:

1. Jagung PRG *event* 5307 mengandung satu kopi gen *ecry3.1Ab* dan *pmi* yang diwariskan mengikuti hukum Mendel; tidak mengandung sekuen *backbone* dari plasmid transformasi pSYN17629; dan stabil sampai generasi BC5F3.
2. Jagung PRG *event* 5307 sepadan secara substansial dengan jagung non PRG; tidak menunjukkan adanya potensi menimbulkan alergi; dan tidak termasuk ke dalam bahan yang bersifat toksik.
3. TTKH menilai bahwa jagung PRG *event* 5307 yang diajukan adalah aman untuk dikonsumsi sebagai bahan pangan.
4. Apabila kemudian ditemukan data dan informasi baru yang tidak sesuai dengan data keamanan pangan yang diperoleh hingga saat ini, maka status keamanan pangan jagung PRG *event* 5307 perlu dikaji ulang.
5. Apabila setelah ditetapkan aman pangan, kemudian jagung PRG *event* 5307 terbukti menimbulkan dampak negatif terhadap kesehatan manusia maka pemohon wajib melakukan tindakan pengendalian dan penanggulangan, serta menarik jagung PRG *event* 5307 dari peredaran.
6. Jagung PRG *event* 5307 tidak boleh digunakan sebagai pakan sampai memperoleh sertifikat aman pakan.
7. Jagung PRG *event* 5307 tidak boleh dibudidayakan sampai ditetapkan aman lingkungan.

#### V. Daftar Acuan

Bailey, K. 2016a. *eCry3.1Ab: Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Allergens*. Syngenta Report No. SSB-105-16. Syngenta Seeds, Inc. 3054 East Cornwallis Road PO Box 12257 Research Triangle Park, NC 27709-2257, USA. *Report Completed on May 4, 2016*.

Bailey, K. 2016b. *Phosphomannose Isomerase: Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Allergens*. Syngenta Report No. SSB-124-16. Syngenta Seeds, Inc. 3054 East Cornwallis Road PO Box 12257 Research Triangle Park, NC 27709-2257, USA. *Report Completed on April 26, 2016*.

Bednarcik, M. 2011. *Quantification of eCry3.1Ab and Phosphomannose Isomerase in Maize Tissues Derived from Transformation Event 5307*. Syngenta Report No. SSB-016-09 A2. Syngenta Seeds, Inc. 3054 East Cornwallis Road PO Box 12257 Research Triangle Park, NC 27709-2257, USA. *Report Completed on March 2, 2011*.

Birukou, I. 2017. *Effect of temperature on the stability of phosphomannose isomerase (PMI) protein*. Syngenta Report No. TK0329350. Syngenta Seeds, Inc. 9



Davis Drive PO Box 12257 Research Triangle Park, NC 27709-2257, USA. Report Completed on February 27, 2017.

Chen, E. dan Stacy, C. 2007. *Modified Cry3A toxins and nucleic acid sequences coding therefor*. Syngenta Participations Ag, assignee. U.S. Patent No. 7,030,295 B2. Washington, DC: U.S. Patent Office

Chen, E. dan Stacy, C. 2007. *Modified Cry3A toxins and nucleic acid sequences coding therefor*. Syngenta Participations AG, assignee. U.S. Patent No. 7,276,583. Washington, DC: U.S. Patent Office.

Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH. 1992. *Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation*. Plant Mol Biol 18:675–689.

Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. and Goodman, H. M. (1982). *Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence*. Journal of Molecular Applied genetics, 1: 561-573.

Geiser M, Schweizer S, Grimm C. 1986. *The hypervariable region in the genes coding for entomopathogenic crystal proteins of Bacillus thuringiensis: nucleotide sequence of the kurhd1 gene of subsp. kurstaki HD-1* Gene 48:109–118.

Hohn T, Stavolone L, De Haan P, Ligon H, Kononova M. 2007. *Cestrum yellow leaf curling virus promoters*. Syngenta Participations AG, assignee. U.S. Patent No. 7,166,770. Washington DC: U.S. Patent Office.

Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N., and Kumashiro, T. 1996. *Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by Agrobacterium tumefaciens and segregation of transformants free from selection markers*. The Plant Journal, 10, 165-174.

Korgaonkar, CK, 2009a. *eCry3.1ab-0208: Single-Dose Oral (Gavage) Toxicity Study in Mice with a 14-Day Observation Period*. Company Report. Performing Laboratory: WIL Research Laboratories, LLC, 1407 George Road, Ashland, OH 44805-8946 USA. Laboratory Project ID: Report number: WIL-639031, Study number: WIL-639031, Task number: T008660-07. Syngenta Crop Protection, Inc., 410 Swing Road, Greensboro, NC 27409, USA.

Korgaonkar, CK, 2009b. *PMI-0105 - Single-Dose Oral (Gavage) Toxicity Study in Mice with a 14-Day Observation Period*. Company Report. Performing laboratory: WIL Research Laboratories, LLC, 1407 George Road Ashland, OH 44805-8946 USA. Laboratory project ID: Study number: WIL-639011. Syngenta Crop Protection, Inc., 410 Swing Road. Greensboro, NC 27409, USA.

Kozziel, M. G., Desai, N. M., Lewis, K. S., Kramer, V. C., Warren G. W., Evola, S. V., Crossland, L. D., Wright, M. S., Merlin, E. J., Launis, K. L., Rothstein, S. J., Bowman, C. G., Dawson, J. L., Dunder, E. M., Pace, G. M. and Suttie J. L. 1997. *Synthetic DNA sequence having enhanced insecticidal activity in maize*. Ciba-Geigy, assignee. U.S. Patent No. 5,625,136. Washington, DC: U.S. Patent Office.

Launis, K. 2011. *Compositional Analysis of Forage and Grain from Event 5307 Hybrid Maize Grown During 2008 in the USA*. Report No.: SSB-170-09 A3. Syngenta Crop Protection, LLC, 3054 East Cornwallis Road, Research Triangle Park, NC 27709-2257. USA.

Mims, G. 2008. *Effect of Temperature on Phosphomannose Isomerase as contained in test substance PMI-0105 as assessed by immunoreactivity*. Syngenta

Report No. SSB-030-07. Syngenta Biotechnology, Inc. 3054 East Cornwallis Road PO Box 12257 Research Triangle Park, NC 27709-2257, USA. Report Completed on February 14, 2008.

Murray, E.E, Lotzer J, Eberle M. 1989. *Codon usage in plant genes*. Nucleic Acids Res 17:477–498.

Negrotto D, Jolley M, Beer S, Wenck AR, Hansen G. 2000. *The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic corn plants (Zea mays L.) via Agrobacterium transformation*. Plant Cell Reports 19:798–803.

Nelson, A. 2009a. *Comparison of eCry3.1Ab Protein Produced in Event 5307-Derived Maize Plants and eCry3.1Ab Protein Produced in Recombinant Escherichia coli*. Syngenta Report No. SSB-002-09. Syngenta Biotechnology, Inc. 3054 East Cornwallis Road PO Box 12257 Research Triangle Park, NC 27709-2257, USA. Report Completed on April 8, 2009.

Nelson A, 2009b. *Comparison of Phosphomannose Isomerase Produced in Event 5307-Derived Maize Plants and Phosphomannose Isomerase Produced in Recombinant Escherichia coli*. Company Report. Syngenta Study No. 5307-08-07, Report No. SSB-003-09. Performing laboratory: Syngenta Biotechnology, Inc., Regulatory Science, PO Box 12257, 3054 East Cornwallis Rd., Research Triangle Park, NC 27709-2257, USA.

Nelson, A. 2009c. *In Vitro Digestibility of Phosphomannose Isomerase (PMI) as Contained in Test Substance PMI-0105 Under Simulated Mammalian Gastric Conditions*. Syngenta Report No. SSB-034-07 A1. Syngenta Biotechnology, Inc. 3054 East Cornwallis Road PO Box 12257 Research Triangle Park, NC 27709-2257, USA. Report Completed on October 23, 2009.

Nelson, A. 2010. *Effect of Temperature on the Bioactivity of eCry3.1Ab Protein as Contained in Test Substance ECRY3.1AB-0208*. Syngenta Report No. SSB-014-09 A1. Syngenta Biotechnology, Inc. 3054 East Cornwallis Road PO Box 12257 Research Triangle Park, NC 27709-2257, USA. Report Completed on October 8, 2010.

New, S. 2010. *Plasmid pSYN12274: Plasmid Lineage Analysis and Sequence*. Report No. SSB-161-10A1. Performing Laboratory: Syngenta Biotechnology Product Safety 3054 East Cornwallis Road PO BOX 12257 Research Triangle Park, NC 27709-2257, USA.

New, S. 2011a. *Event 5307 maize, Southern Blot Analysis of NP2222 x 5307 Maize*. Report Number: SSB-175-11. Syngenta Crop Protection, LLC 3054 East Cornwallis Road Research Triangle Park, NC 27709-2257 USA.

New, S. 2011b. *Event 5307 maize, Mendelian inheritance analysis*. Report Number: SSB-203-10 A1. Syngenta Crop Protection, LLC 3054 East Cornwallis Road Research Triangle Park, NC 27709-2257 USA.

Seastrum, L. 2010. *In vitro Digestibility of eCry3.1Ab Protein as Contained in Test Substance ECRY3.1AB-0208 Under Simulated Mammalian Intestinal Conditions*. Syngenta Report No. SSB-015-09 A1. Syngenta Biotechnology, Inc. 3054 East Cornwallis Road PO Box 12257 Research Triangle Park, NC 27709-2257, USA. Report Completed on September 29, 2010.

Sekar, V., Thompson, D. V., Maroney, M. J., Bookland, R. G. dan Adang M. J. 1987. *Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of Bacillus thuringiensis var. tenebrionis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7036–7040.

Song, S. 2010a. *In vitro Digestibility of eCry3.1Ab Protein under Simulated Mammalian Gastric Conditions*. Syngenta Study No. TK0028111. Syngenta Biotechnology, Inc. 3054 East Cornwallis Road PO Box 12257 Research Triangle Park, NC 27709-2257, USA. *Report Completed on October 22, 2010*.

Song, S. 2010b. *Effect of Temperature on the Immunoreactivity of eCry3.1Ab Protein*. Syngenta Study No. TK0022186. Syngenta Biotechnology, Inc. 3054 East Cornwallis Road PO Box 12257 Research Triangle Park, NC 27709-2257, USA. *Report Completed on September 10, 2010*.

Walters FS, deFontes CM, Hart H, Warren GW, Chen JS. 2010. *Lepidopteran-active variable-region sequence imparts coleopteran activity in eCry3.1Ab, an engineered Bacillus thuringiensis hybrid insecticidal protein*. Appl Environ Microbiol 76:3082–3088.

Xing, Y-J, Ji, Q., Yang, Q., Luo, Y-M., Li, Q., Wand, X. 2008. *Studies on Agrobacterium-mediated genetic transformation of embryogenic suspension cultures of sweet potato*. Afr J Biotechnol 7: 534-540.

