

Ringkasan Pengkajian Keamanan Pangan Kanola PRG *Event* DP73496

I. Pendahuluan

Kanola PRG *event* DP73496 merupakan kanola produk rekayasa genetik dari PT. DuPont Indonesia yang memproduksi protein glifosat N-asetiltransferase (GAT4621) yang memberikan sifat ketahanan terhadap herbisida glifosat. Kanola PRG *event* DP73496 telah memperoleh sertifikat aman pangan di Kanada (2012), Meksiko (2012), Amerika Serikat (2012), Australia dan Selandia Baru (2014), Jepang (2014), Korea (2015), Afrika Selatan (2016), Taiwan (2016), dan Malaysia (2018).

Kanola PRG *event* DP73496 juga telah memperoleh sertifikat aman pakan di Kanada (2012), Meksiko (2012), Amerika Serikat (2012), Jepang (2015), Korea (2015), Afrika Selatan (2016), dan Malaysia (2018). Sertifikat aman lingkungan untuk kanola PRG *event* DP73496 telah diperoleh di Kanada (2012), Amerika Serikat (2013), Jepang (2015), dan Australia (2016).

Pengkajian keamanan pangan kanola PRG *event* DP73496 dilakukan berdasarkan Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 6 Tahun 2018 tentang Pengawasan Pangan Produk Rekayasa Genetik dan surat penugasan Ketua KKH PRG kepada Wakil Ketua Bidang Keamanan Pangan KKH PRG Nomor B-65/KKH-PRG/11/2017 tanggal 30 November 2017 perihal Penugasan Pengkajian Keamanan Pangan Produk Rekayasa Genetik (PRG) Komoditas Kanola PRG *event* DP73496. TTKH telah melakukan pengkajian keamanan pangan kanola PRG *event* DP73496 berdasarkan informasi genetik dan informasi keamanan pangan yang terdiri atas kesepadanan substansial, alergenitas, dan toksisitas sebagaimana diuraikan di bawah ini.

II. Informasi Genetik

II.1. Elemen Genetik

Kanola PRG *event* DP73496 mengandung gen target *gat4621*, promotor UBQ10 (*polyubiquitin*) dan terminator *pin* II (inhibitor proteinase). Gen *gat4621* menyandi protein glifosat N-asetiltransferase (GAT4621) yang bertanggung jawab dalam toleransi terhadap herbisida glifosat (Keil *et al.*, 1986; An *et al.*, 1989; Norris *et al.*, 1993; Castle *et al.*, 2004; Siehl *et al.*, 2007).

II.2. Sumber Elemen Genetik

Sumber gen target kanola PRG *event* DP73496, yaitu gen *gat4621* berasal dari *Bacillus licheniformis*. Promotor UBQ10 berasal dari *Arabidopsis thaliana*, dan terminator *pin* II berasal dari *Solanum tuberosum* (Keil *et al.*, 1986; An *et al.*, 1989; Norris *et al.*, 1993; Castle *et al.*, 2004; Siehl *et al.*, 2007)

II.3. Sistem Transformasi

Kanola PRG *event* DP73496 dirakit melalui metode transformasi penembakan partikel dengan plasmid PHP28181 pada mikrospora kanola galur 1822B.

Plasmid PHP28181 tersebut membawa kaset yang berisi gen *gat4621* dengan promotor UBQ10 dan terminator *pin II* (Chen dan Tulsieram, 2007; Lauer *et al.*, 2009).

II.4 Stabilitas Genetik

Hasil analisis *Southern Blot* menunjukkan bahwa kanola PRG *event* DP73496 mengandung satu kopi sisipan gen *gat4621* yang stabil sampai lima generasi, dan diwariskan mengikuti hukum Mendel. Selain itu, melalui analisis *Southern Blot* dan PCR ditemukan bahwa fragmen *backbone* plasmid PHP28181 tidak terdeteksi (Brink dan Igo, 2013).

Berdasarkan hasil kajian informasi genetik dapat disimpulkan bahwa:

1. Kanola PRG *event* DP73496 mengandung satu kopi sisipan gen *gat4621*;
2. Gen *gat4621* dalam kanola PRG *event* DP73496 stabil sampai lima generasi dan diwariskan mengikuti hukum Mendel; dan
3. Kanola PRG *event* DP73496 tidak mengandung fragmen *backbone* plasmid PHP28181.

III. Informasi Keamanan Pangan

III.1 Kesepadanan Substansial

Pengkajian kesepadanan substansial dari biji kanola PRG *event* DP73496 dilakukan berdasarkan dokumen hasil penelitian Nichols dan Taylor (2011). Bahan yang digunakan untuk uji kesepadanan substansial adalah biji kanola PRG *event* DP73496 dan biji kanola non-PRG konvensional sebagai kontrol. Kanola ditanam pada musim tanam tahun 2009 dalam rancangan *randomized complete block* di 6 (enam) lokasi daerah kanola komersial di Amerika Utara, yaitu: Elm Creek, Manitoba, Kanada; Minto, Manitoba, Kanada; Portage la Prairie, Manitoba, Kanada; Velva, ND, USA; Saskatoon, Saskatchewan, Kanada; dan Ephrata, WA, USA.

Setelah dipanen, biji kanola dianalisis di laboratorium EPL Bio-Analytical Services, Illinois, Amerika Serikat, yang sudah menerapkan *Good Laboratory Practice* (GLP).

Biji kanola dianalisis komposisinya termasuk kadar protein, lemak, abu, air, karbohidrat (dihitung *by-difference*), serat (*acid detergent fiber* (ADF) dan *neutral detergent fiber* (NDF)), profil asam amino (alanin, arginin, asam aspartat, sistin, asam glutamat, glisin, histidin, isoleusin, leusin, lisin, metionin, fenilalanin, prolin, serin, treonin, triptofan, tirosin, dan valin), profil asam lemak (kaprilat, kapriat, laurat, miristat, miristoleat, pentadekanoat, palmitat, palmitoleat, heptadekanoat, heptadekanoat, heptadekadinoat, stearat, oleat, linoleat, isomer linoleat, linolenat, gama-linolenat, nonadekanoat, arakhidat, eikosenoat, eikosadienoat, eikosatrienoat, arakidonat, heneikosanoat, behenat, erukat, trikosanoat, lignoserat, dan nervonat), vitamin (B1, B2, B3, asam pantotenat, piridoksin, asam folat, alfa-tokoferol, beta-tokoferol, delta-tokoferol, dan gama-tokoferol), mineral

(kalsium, fosfor, magnesium, mangan, tembaga, besi, kalium, natrium, dan seng), senyawa antigizi asam fitat, glukosinat (glukoiberin, progoitrin, epi-progoitrin, glukorafanin, glukonapoleiferin, glukonapin, glukoisin, 4-hidroksiglukograsisin, glukobrasisin, glukobrasikinapin, glukonasturtiin, 4-metoksiglukobrasisin, dan neoglukobrasisin) serta metabolit sekunder lain (tanin larut, tanin tidak larut, sinapin, kolesterol, brasikasterol, kampesterol, stigmasterol, dan beta-sitosterol).

Hasil analisis komposisi menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang nyata antara biji kanola PRG *event* DP73496 dengan kanola non-PRG, dan masuk ke dalam kisaran komposisi kanola komersial pada umumnya.

Berdasarkan hasil pengkajian kesepadanan substansial dapat disimpulkan bahwa kanola PRG *event* DP73496 sepadan secara substansial dengan kanola non PRG.

III.2 Alergenisitas

Pengkajian alergenitas terhadap protein GAT4621 yang diekspresikan pada kanola PRG *event* DP73496 dilakukan melalui analisis bioinformatika, analisis konsentrasi protein, dan pengujian stabilitas protein yang meliputi stabilitas cerna dan stabilitas panas.

III.2.1 Analisis Bioinformatika

Analisis kemiripan sekuen protein GAT4621 dengan protein alergen dilakukan dengan menggunakan *database* protein alergen yang diperoleh dari *Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) Allergen Online Database* versi 2014 dengan perangkat FASTA, serta pencarian kesamaan sekuen delapan atau lebih asam amino dengan sekuen protein dalam *database*.

Hasil analisis menunjukkan bahwa tidak ada kemiripan sekuen asam amino yang relevan secara biologis (35% atau lebih kesamaan asam amino di dalam fragmen 80 asam amino) antara protein GAT4621 dengan sekuen asam amino protein alergen. Selain itu, tidak ada kesamaan delapan asam amino atau lebih pada protein GAT4621 dengan protein alergen dalam *database* (Mirsky dan Chang, 2014).

III.2.2 Analisis Konsentrasi Protein GAT4621

Konsentrasi protein GAT4621 pada kanola PRG *event* DP73496 ditentukan menggunakan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Konsentrasi protein GAT4621 di dalam biji kanola PRG *event* DP73496 ditemukan sebesar 6,2 µg/g berat kering. Jumlah protein GAT4621 sebesar 0,0024% dari jumlah total protein dalam biji kanola PRG *event* DP73496 (Hettinger dan Deege, 2010; Linderblood *et al.*, 2010).

III.2.3 Analisis Stabilitas Protein

Protein GAT4621 dihasilkan dalam jumlah sedikit oleh tanaman kanola PRG *event* DP73496, sehingga untuk pengujian stabilitas protein digunakan protein GAT4621 yang diproduksi pada bakteri *Escherichia coli*. Pengujian kesetaraan protein GAT4621 yang diekspresikan di dalam tanaman kanola PRG *event* DP73496 dengan yang dihasilkan oleh *E. coli* menggunakan analisis SDS-PAGE, *Western blot*, glikosilasi, sekuen asam amino *N-terminal*, dan spektroskopi massa MALDI-MS. Hasil pengujian menunjukkan bahwa protein GAT4621 yang dihasilkan oleh *E. coli* ekuivalen dengan protein GAT4621 yang dihasilkan oleh kanola PRG *event* DP73496 (Buffington dan Zhang, 2010).

III.2.3.1 Analisis Stabilitas Cerna Protein

Analisis stabilitas cerna protein GAT4621 dilakukan menggunakan simulasi cairan lambung (*Simulated Gastric Fluid* - SGF) pH 1,2 yang mengandung pepsin dan simulasi cairan usus (*Simulated Intestinal Fluid* - SIF) pH 7,5 yang mengandung pankreatin selama 60 menit pada suhu 37°C. Hasil hidrolisis protein dievaluasi dengan SDS-PAGE dan *Western blot*. Hasil evaluasi menunjukkan bahwa setelah inkubasi selama 30 detik dalam SGF, tidak terdeteksi adanya protein utuh GAT4621 maupun fragmen-fragmennya. Setelah inkubasi selama 5 menit dalam SIF juga tidak terdeteksi protein utuh GAT4621 maupun fragmen-fragmennya (Comstock, 2007a dan 2007b).

III.2.3.2 Analisis Stabilitas Panas Protein

Analisis efek pemanasan terhadap stabilitas protein GAT4621 dilakukan melalui evaluasi aktivitas enzimatis. Hasil evaluasi menunjukkan bahwa aktivitas enzimatis dari protein GAT4621 mengalami penurunan lebih dari 90% setelah pemanasan selama 15 menit pada suhu 53°C atau lebih (Siehl dan Locke, 2007).

Berdasarkan pengkajian alergenitas yang meliputi analisis bioinformatika, konsentrasi dan stabilitas protein, dapat disimpulkan bahwa protein GAT4621 tidak berpotensi menimbulkan alergi.

III.3 Toksisitas

Pengujian toksisitas akut dilakukan terhadap protein GAT4621 kanola PRG *event* DP73496 di laboratorium E.I. du Pont de Nemours and Company, Delaware, Amerika Serikat yang menerapkan GLP.

III.3.1 Toksisitas Akut Protein GAT4621

Pengujian toksisitas akut telah dilakukan terhadap protein GAT4621 dan hasilnya telah dilaporkan (Finlay, 2012). Protein GAT4621 yang dihasilkan oleh tanaman kanola PRG *event* DP73496 dalam jumlah sedikit, sehingga untuk pengujian toksisitas akut digunakan protein GAT4621 yang diproduksi pada bakteri *E. coli*. Hasil analisis ekuivalensi menunjukkan kesamaan protein GAT4621 yang diproduksi pada tanaman kanola PRG *event* DP73496 dengan protein GAT4621 yang diproduksi di *E. coli* (Buffington dan Zhang, 2010).

Toksisitas akut protein GAT4621 diuji dengan cara cekokan tunggal. Dalam pengujian ini digunakan mencit jantan dan betina strain Crl:CD-1 (ICR) BR yang berumur 9 minggu, dengan berat badan antara 32,6 - 38,3 g (mencit jantan) dan 23,4 - 27,3 g (mencit betina) yang berasal dari Charles River Laboratories, Inc., Raleigh, North Carolina. Setiap ekor mencit ditempatkan dalam kandang polikarbonat dengan suhu ruangan 18 – 26°C, kelembaban nisbi 30 - 70 %, dan pencahayaan selama 12 jam terang 12 jam gelap. Ransum bersertifikat #5002 (PMI Nutrition International, St. Louis, Missouri) yang berupa pelet dan air minum (*tap water*) diberikan secara *ad libitum*.

Sebanyak 30 ekor mencit jantan dan betina dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu (1) kelompok kontrol yang dicekok pelarut (air bebas ion/ *deionized water*); (2) kelompok kontrol protein BSA (*bovine serum albumin*) dengan dosis 2000 mg/kg BB; dan (3) kelompok perlakuan protein GAT4621 dengan dosis 2000 mg/kg BB (setara 1640 mg/kg protein GAT4621). Setiap kelompok terdiri dari 5 ekor mencit jantan dan 5 ekor mencit betina. Pemberian bahan uji atau kontrol hanya dilakukan sekali pada awal pengujian (hari ke-0) dan pengujian berlangsung selama 14 hari. Mencit dipuasakan sebelum diberi cekokan.

Penimbangan berat badan dilakukan pada hari ke-0, 1, 2, 4, 7 dan 14. Pengamatan klinis dilakukan 2 kali sehari, setiap hari selama pengujian berlangsung. Pada hari terakhir pengujian semua mencit dimatikan dengan karbondioksida, kemudian dilakukan nekropsi lengkap dan pengujian makroskopis terhadap organ dan jaringan tertentu.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa: (1) selama pengujian berlangsung tidak terdapat mencit yang mati; (2) tidak ditemukan adanya kelainan klinis pada mencit akibat pemberian bahan uji; dan (3) pemberian bahan uji tidak berpengaruh terhadap berat badan mencit.

Berdasarkan pengkajian toksisitas dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat efek toksik pada mencit akibat pemberian protein GAT4621 sampai dosis 1640 mg/kg BB.

IV. Kesimpulan

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

1. Kanola PRG *event* DP73496 mengandung satu kopi sisipan gen *gat4621* yang stabil sampai lima generasi, diwariskan mengikuti hukum Mendel, dan tidak mengandung fragmen *backbone* plasmid transformasi PHP28181.
2. Kanola PRG *event* DP73496 sepadan secara substansial dengan kanola non PRG; tidak berpotensi menimbulkan alergi; dan termasuk ke dalam bahan yang tidak toksik.
3. TTKH menilai bahwa kanola PRG *event* DP73496 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 kanola PRG *event* DP73496 perlu dikaji ulang.
5. Apabila setelah ditetapkan aman pangan, kemudian kanola PRG *event* DP73496 tersebut terbukti menimbulkan dampak negatif terhadap kesehatan manusia maka pemohon wajib melakukan tindakan pengendalian dan penanggulangan, serta menarik kanola PRG *event* DP73496 dari peredaran.
6. Kanola PRG *event* DP73496 tidak boleh digunakan sebagai pakan ternak sampai memperoleh sertifikat aman pakan.
7. Kanola PRG *event* DP73496 tidak boleh dibudidayakan sampai ditetapkan aman lingkungan.

V. Daftar Acuan

An G, Mitra A, Choi HK, Costa MA, An K, Thornburg RW, Ryan CA. 1989. *Functional Analysis of the 3' Control Region of the Potato Wound-Inducible Proteinase Inhibitor II Gene*. *The Plant Cell* 1: 115-122.

Brink, K. dan Igo, E. 2013. *Characterization of DP-Ø73496-4 Canola: Insertion Integrity, Stability, Copy Number, and Backbone Analysis*. Amended Final Report. Laboratory Study ID: PHI-2009-134. E. I. du Pont de Nemours and Company DuPont Agricultural Biotechnology Regulatory Group DuPont Experimental Station Wilmington, Delaware 19880-0353.

Buffington, J dan Zhang, J. 2010. *Characterisation of GAT4621 Protein Derived from Canola Containing Event DP-073496-4 and Equivalency Assessment with the GAT4621 Protein Derived from a Microbial Expression System*. *Pioneer Report* PHI-2010-020. Pioneer Hi-Bred International, Inc. 7300 NW 62nd Avenue, Johnston, IA 50131, USA. *Report Completed on June 8, 2010*.

Castle LA, Siehl DL, Gorton R, Patten PA, Chen YH, Bertain S, Cho H-J, Duck N, Wong J, Liu D, Lassner MW. 2004. *Discovery and Directed Evolution of a Glyphosate Tolerance Gene*. *Science* 304: 1151-1154.

Chen W dan Tulsieram L. 2007. *Microprojectile Bombardment Transformation of Brassica*. United States Patent Application No. 11/270,996.

Comstock, B. 2007a. *Characterization of the In Vitro Pepsin Resistance of Glyphosate Nacetyltransferase 4621 Protein (GAT4621)*. *Pioneer Report* PHI-2006-120. Pioneer Hi-Bred International, Inc. 7300 NW 62nd Avenue, Johnston, IA 50131, USA. *Report Completed on August 1, 2007*.

Comstock, B. 2007b. *Characterization of the In Vitro Pancreatin Resistance of Glyphosate Nacetyltransferase 4621 Protein (GAT4621)*. *Pioneer Report* PHI-2006-

122. Pioneer Hi-Bred International, Inc. 7300 NW 62nd Avenue, Johnston, IA 50131, USA. *Report Completed on August 1, 2007.*

Finlay C, 2012. *GAT 4621: Acute Oral Toxicity Study in Mice.* Report Revision 1. Laboratory Project ID: Dupont-18527. Performing Laboratory: El Du Pont De Nemours and Company, Dupont Haskell Global Centers for Health & Environmental Sciences, P.O. Box 50, Newark, Delaware 19714, USA.

Hettinger, H. dan Deege, L. 2010. *Quantification of GAT4621 Protein in Tissues of Herbicide-Treated Canola Lines Containing Event DP-073496-4: U.S. and Canada Test Sites.* Pioneer Report PHI-2009-039/010. Pioneer Hi-Bred International, Inc. 2450 SE Oak Tree Court, Ankeny, IA 50021, USA. *Report Completed on April 30, 2010.*

Keil M, Sanchez-Serrano J, Schell J, Willmitzer L .1986. *Primary structure of a proteinase inhibitor II gene from potato (Solanum tuberosum).* Nucleic Acids Research 14: 5641-5650.

Lauer, M., E. Crowgey, K, Brink, and H. Mirsky. 2009. *Description and Sequence of Fragment PHP28181A from Plasmid PHP28181.* Amended Report. Study ID: PHI-2009-140. Pioneer Hi-Bred International, Inc. DuPont Agricultural Biotechnology Experimental Station 200 Powder Mill Road PO Box 8352 Wilmington, DE 19803 .

Linderblood, C., Hong, B., dan Maxwell, C. 2010. *Nutrient Composition of an Herbicide-Treated Canola Line Containing Event DP-Ø73496-4: U.S. and Canada Test Sites.* Pioneer Report PHI-2009-039/020. Pioneer Hi-Bred International, Inc. 2450 SE Oak Tree Court, Ankeny, IA 50021, USA. *Report Completed on July 23, 2010.*

Mirsky, H dan Chang, P. 2014. *Comparison of the Amino Acid Sequence Identity between the GAT4621 Protein and Known Protein Allergens.* Pioneer Report PHI-2007-008/074. Pioneer Hi-Bred International, Inc. DuPont Agricultural Biotechnology, DuPont Experimental Station, 200 Powder Mill Road PO Box 8352, Wilmington, DE 19803, USA. *Report Completed on August 19, 2014.*

Nichols, M. and K. Taylor, 2011. *Expressed Trait Protein Concentration and Nutrient Composition of Canola Lines Containing Events DP-Ø73496-4 and DP-Ø61Ø61-7: U.S. and Canada Test Sites.* Pioneer Hi-Bred International, Inc., Study Number: PHI-2009-039

Norris SR, Meyer SE, Callis J. 1993. *The intron of Arabidopsis thaliana polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression.* Plant Molecular Biology 21: 895-906.

Siehl DL, Castle LA, Gorton R, Keenan RJ. 2007. *The Molecular Basis of Glyphosate Resistance by an Optimized Microbial Acetyltransferase.* Journal of Biological Chemistry 282: 1144611455.

Siehl, D. dan Locke, M. 2007. *Characterization of the Thermal Stability of Glyphosate Acetyltransferase Enzyme Activity: GAT4621. Pioneer Report PHI-2006-184/018.* Pioneer Hi-Bred International, Inc. Verdia Campus, 700A Bay Road Redwood City, CA 94063, USA. *Report Completed on August 1, 2007.*