

## **Pengkajian Keamanan Pangan Kedelai PRG event MON 87769**

### **I. Pendahuluan**

Kedelai PRG event MON 87769 adalah kedelai produk rekayasa genetik dari perusahaan Monsanto dengan perubahan kandungan asam stearidonat (SDA) untuk meningkatkan nilai gizi.

Kedelai PRG event MON 87769 mengandung kaset gen Pj.D6D penyandi protein *Primula juliae* D6 desaturase (Pj.D6D) dan gen Nc.Fad3 penyandi protein *Neurospora crassa* D15 desaturase (Nc.D15D). Gen Pj.D6D berasal dari *Primula juliae*, tanaman yang umumnya dikenal sebagai „Primrose“ yang tumbuh di daerah subtropis. Gen Nc.Fad3 berasal dari *N. crassa*, yang dikenal sebagai „jamur roti“, dan umum tersebar di lingkungan.

Pengkajian keamanan pangan kedelai PRG event MON 87769 dilakukan berdasarkan Peraturan Kepala Badan POM Nomor HK.00.05.23.3541 Tahun 2008 tentang Pedoman Pengkajian Keamanan Pangan Produk Rekayasa Genetik yang diperbaharui dengan Peraturan Kepala Badan POM Nomor HK.03.1.23.03.12.1563 Tahun 2012 tentang Pedoman Pengkajian Keamanan Pangan Produk Rekayasa Genetik dan surat Kepala Badan POM kepada Ketua Komisi Keamanan Hayati Produk Rekayasa Genetik Nomor SD.05.02.1.52.08.11.07602 tanggal 28 Agustus 2011 perihal Pengkajian Keamanan Pangan Produk Rekayasa Genetik (PRG) Komoditas Kedelai PRG Event MON 87769. TTKH telah melakukan pengkajian keamanan pangan kedelai PRG event MON 87769 berdasarkan informasi genetik dan informasi keamanan pangan yang terdiri atas kesepadanan substansial, alergenisitas, dan toksisitas sebagaimana diuraikan di bawah ini.

Kedelai PRG event MON 87769 telah memperoleh sertifikat aman pangan di Australia (2011), Kanada (2011), Selandia Baru (2011), Amerika Serikat (2012), Meksiko (2012) dan Korea Selatan (2013).

### **II. Informasi Genetik**

#### **II.1. Elemen Genetik**

Kedelai PRG event MON 87769 mengandung kaset gen Pj.D6D penyandi *Primula juliae* D6 desaturase (Pj.D6D), dengan promoter dari gen Sphas (7S  $\alpha'$ ) penyandi protein beta- conglycinin ( $\alpha'$ -bcsp) dan terminator dari gen tml *Agrobacterium tumefaciens*. Selain itu, kedelai PRG event MON 87769 mengandung gen Nc.Fad3 penyandi protein *N. crassa* D15 desaturase (Nc.D15D) dengan promoter dari gen Sphas (7S  $\alpha'$ ) dan terminator E9.

#### **II.2. Sumber Gen**

Gen Pj.D6D berasal dari tanaman Primrose. Promoter Sphas (7S  $\alpha'$ ) berasal dari kedelai dan terminator tml berasal dari *A. tumefaciens*. Gen Nc.Fad3 berasal dari kapang *N. crassa*. Promoter Sphas (i) berasal dari kedelai dan terminator E9 3' berasal dari tanaman *Pisum sativum*.

### II.3. Sistem Transformasi

Perakitan kedelai PRG event MON 87769 dilakukan melalui teknik transformasi dengan mediasi vektor *A. tumefaciens* pada eksplan jaringan meristem yang diperoleh dari embrio biji kedelai non PRG A3525. Plasmid vektor yang digunakan untuk merakit kedelai PRG event MON 87769 adalah PV-GMPQ1972, yang berisi dua set sekuen left dan right border yang mengapit masing-masing dua DNA transfer (T-DNA I dan T-DNA II) untuk memfasilitasi transformasi.

### II.4 Stabilitas Genetik

Data analisis Southern blot menunjukkan bahwa kedelai PRG event MON 87769 mengandung satu kopi gen interes (Pj.D6D dan Nc.Fad3). Hasil analisis stabilitas genetik integrasi gen interes dari kedelai PRG event MON 87769 dengan Southern blot fingerprint menunjukkan bahwa gen interes masih stabil sampai empat generasi, yaitu dengan melihat adanya pita gen interes dalam genom. Selain itu, berdasarkan analisis Southern blot fingerprint ditemukan hasil yang penting yaitu tidak terdeteksinya elemen T-DNA II dan sekuen backbone plasmid PV-GMPQ1972. Stabilitas genetik pewarisan sifat pada kedelai PRG event MON 87769 mengikuti prinsip segregasi Mendel (Girault et al., 2009).

Dari hasil pengkajian informasi genetik dapat disimpulkan bahwa kedelai PRG event MON 87769 mengandung satu kopi gen interes (Pj.D6D dan Nc.Fad3); tidak mengandung sekuen backbone dari plasmid transformasi PV-GMPQ1972; gen interes masih stabil sampai empat generasi; dan diwariskan mengikuti hukum Mendel.

III.	Informasi	Keamanan	Pangan
III.1	Kesepadanan		Substansial

Pengkajian kesepadanan substansial dari kedelai PRG event MON 87769 ini dilakukan dengan mempelajari hasil penelitian Drury et al. (2008). Sampel biji dan bagian vegetatif untuk analisis komposisi diambil dari kedelai PRG event MON 87769 dan kedelai non PRG yang ditanam selama percobaan tahun 2006 di lima lokasi di Amerika Serikat, yaitu Richland (IA), Bagley (IA), Carlyle (IL), Conklin (MI), dan New Holland (OH). Seluruh sampel dianalisis di laboratorium Covance Laboratories Inc., Madison, Wisconsin yang sudah menerapkan Good Laboratory Practice (GLP).

Analisis komposisi yang dilakukan terhadap biji kedelai adalah: proksimat (air, protein, lemak, dan abu serta karbohidrat by-difference), acid detergent fiber (ADF), neutral detergent fiber (NDF), komposisi asam amino dan asam lemak (C8 - C24), inhibitor tripsin, asam fitat, lektin, isoflavon (daidzein, glisitein, dan genistein), vitamin E, rafinosa, dan stakiosa. Analisis komposisi yang dilakukan terhadap bagian vegetatif tanaman kedelai adalah: proksimat (air, protein, lemak, dan abu serta karbohidrat by-difference), ADF, dan NDF.

Hasil analisis menunjukkan bahwa komposisi biji kedelai PRG event MON 87769 tidak berbeda nyata dengan kedelai non PRG, kecuali untuk komposisi asam lemak. Kandungan asam stearidonat (SDA, C18:4) meningkat rata-rata 28%. Dengan kenaikan SDA tersebut maka terdeteksi pula senyawa antara yaitu asam lemak trans-alfa

linolenat (trans-ALA) (C18:3 9c, 12c, 15t) dan asam gama linolenat (C18:3), serta trans- SDA (C18:4 6c, 9c, 12c, 15t) pada biji kedelai PRG event MON 87769.

Kecuali untuk SDA, secara umum komposisi biji kedelai dan bagian vegetative tanaman kedelai PRG event MON 87769 masuk ke dalam kisaran komposisi biji kedelai dan bagian vegetatif tanaman kedelai komersial pada umumnya seperti dipublikasikan ILSI Crop Composition Database (ILSI, 2006).

Hasil pengkajian kesepadanan substansial menunjukkan bahwa kedelai PRG event MON 87769 sepadan secara substansial dengan kedelai non PRG, kecuali SDA dan senyawa antaranya.

## III.2 Alergenisitas

Pengujian alergenisitas protein Pj.D6D dan Nc.D15D yang dihasilkan oleh kedelai PRG event MON 87769 telah dilakukan di laboratorium yang menerapkan GLP.

### III.2.1 Analisis Bioinformatika

Potensi kesamaan struktural protein Pj.D6D dan Nc.D15D dengan protein penyebab alergi dan toksik dievaluasi menggunakan program FASTA dan data dari AD\_2009, TOX\_2009 dan PRT\_2009. Analisis dilakukan pada sekuen asam amino protein dan sekuen peptida 8 asam amino yang berpotensi menimbulkan respon imunoreaktif. Protein Pj.D6D dan Nc.D15D tidak mempunyai kemiripan struktural dengan protein alergen, toksin ataupun protein biologis aktif lainnya yang dikenal memiliki efek merugikan terhadap mamalia (Silvanovich A. et al., 2009).

III.2.2 Konsentrasi Protein Pj.D6D dan Nc.D15D  
Konsentrasi protein Pj.D6D dan protein Nc.D15D di dalam biji kedelai PRG event MON 87769 dianalisis dan dihitung dengan metoda ELISA, SDS PAGE dan Western blot. Konsentrasi protein Pj.D6D ditemukan 0,00043% dari total protein kedelai, sedangkan protein Nc.D15D ditemukan 0,00239% (Qiang Z. et al., 2008 dan A. Drury et al., 2008).

### III.2.3 Stabilitas Protein

Uji daya cerna protein Pj.D6D yang diisolasi dari kedelai PRG event MON 87769 menunjukkan bahwa lebih dari 99% protein Pj.D6D dapat dicerna selama 30 detik di dalam simulasi cairan lambung (SGF, simulated gastric fluid) yang mengandung enzim pepsin. Demikian juga lebih dari 84% protein Pj.D6D dapat dicerna selama 5 menit di dalam simulasi cairan usus (SIF, simulated intestinal fluid) yang mengandung enzim pankreatin. Dari hasil analisis tersebut disimpulkan bahwa protein Pj.D6D dalam kedelai PRG event MON 87769 tidak memberikan pengaruh merugikan terhadap kesehatan manusia karena dapat dicerna dengan cepat dalam SGF maupun SIF (Kapadia, 2009).

Uji daya cerna protein Nc.D15D yang diisolasi dari kedelai PRG event MON 87769 menunjukkan bahwa lebih dari 96% protein Nc.D15D dapat dicerna selama 30 detik di dalam SGF yang mengandung enzim pepsin. Demikian juga lebih dari 96% protein Nc.D15D dapat

dicerna selama 5 menit di dalam SIF yang mengandung enzim pankreatin. Dari hasil analisis tersebut disimpulkan bahwa protein Nc.D15D dalam

kedelai PRG event MON 87769 tidak memberikan pengaruh merugikan terhadap kesehatan manusia karena dapat dicerna dengan cepat dalam SGF maupun SIF (Kapadia, 2008).

Berdasarkan hasil pengkajian alergenitas dapat disimpulkan bahwa kedelai PRG event MON 87769 yang mengandung protein Pj.D6D dan Nc.D15D tidak menunjukkan adanya potensi menimbulkan alergi.

### III.3 Toksisitas

Pengujian toksisitas protein Pj.D6D dan Nc.D15D yang dihasilkan oleh kedelai PRG event MON 87769 telah dilakukan di laboratorium yang menerapkan GLP.

#### III.3.1 Toksisitas Akut

Pengujian toksisitas akut terhadap protein Pj.D6D dan Nc.D15D yang diisolasi dari kedelai PRG event MON 87769 dilakukan pada mencit dan hasilnya telah dilaporkan (Smedley, 2008). Bahan yang diuji berupa larutan protein Pj.D6D dan protein Nc.D15D. Sebagai kontrol digunakan larutan bovine serum albumin (BSA).

Hewan percobaan yang digunakan adalah 60 ekor mencit, strain CD-1, mencit jantan berumur sekitar 8 minggu dengan berat badan 28,5 - 33,8 gram dan mencit betina berumur sekitar 10 minggu dengan berat badan 23,1 - 29,5 gram; berasal dari Charles River Laboratories, St. Constant, Quebec. Sebelum digunakan dalam pengujian semua mencit dibiarkan beradaptasi dengan lingkungan laboratorium selama 8 hari. Semua mencit ditempatkan dalam kandang stainless steel secara individual, baik selama masa aklimatisasi maupun selama studi dilaksanakan.

Ransum (PMI Nutrition International Certified Rodent Chow® # 5002) diberikan secara ad libitum selama pengujian berlangsung, kecuali selama mencit dipuaskan, yaitu 2 - 3 jam sebelum diberi cekokan bahan uji atau kontrol. Air minum yang sudah diproses dengan reverse osmosis dan iradiasi ultraviolet, diberikan secara ad libitum.

Sebanyak 60 ekor mencit dibagi ke dalam 3 kelompok, masing-masing terdiri atas 10 ekor mencit jantan dan 10 ekor betina. Kelompok 1, diberi cekokan larutan BSA, dengan dosis 44,0 mg/kg BB; kelompok 2, diberi cekokan larutan protein Pj.D6D, dengan dosis 4,66 mg/kg BB; dan kelompok 3, diberi cekokan larutan protein Nc.D15D, dengan dosis 37,3 mg/kg BB. Pemberian bahan uji dan kontrol dilakukan pada hari pertama percobaan (hari ke-0) sebagai dosis tunggal. Percobaan berlangsung selama 14 hari.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa pada semua kelompok: (1) tidak terdapat mencit yang mati; (2) tidak terdapat tanda-tanda kelainan klinis pada mencit; (3) tidak ditemukan perbedaan nyata dalam hal konsumsi ransum, berat badan dan perubahan berat badan antar kelompok; (4) tidak ditemukan adanya kelainan organ dalam mencit.

Dari hasil pengujian tersebut disimpulkan bahwa protein Pj.D6D (dosis 4,66 mg/kg BB) dan protein Nc.D15D (dosis 37,3 mg/kg BB) tidak bersifat toksik terhadap mencit. Dosis

tersebut diperhitungkan sebesar 100 kali lebih tinggi dari jumlah protein yang diuji (Pj.D6D dan Nc.D15D) yang mungkin akan dikonsumsi oleh manusia.

Uji toksisitas minyak kedelai yang mengandung SDA telah dilakukan pada tikus dan hasilnya telah dipublikasikan (Hammond et al., 2008). Minyak kedelai dihasilkan dari kedelai PRG yang mengandung gen D6 dan D15 desaturase. Hasil pengujian menunjukkan bahwa tidak terdapat tikus yang mati selama percobaan berlangsung; tidak terdapat pengaruh pemberian bahan uji terhadap kelainan klinis, berat badan maupun konsumsi ransum; tidak ditemukan adanya pengaruh pemberian bahan uji terhadap parameter hematologi atau analisis urin; tidak ditemukan adanya pengaruh pemberian bahan uji terhadap organ dalam tikus secara makroskopis maupun mikroskopis. Berdasarkan hasil pengujian tersebut, no observed adverse effect level (NOAEL) untuk pemberian secara oral (gavage) minyak kedelai SDA selama 28 hari pemberian adalah lebih besar dari 3,0 ml/kg BB/hari. Karena minyak kedelai SDA yang diuji mengandung sekitar 20% SDA, maka NOAEL untuk minyak kedelai SDA diperkirakan lebih besar dari 600 mg/kg BB/hari.

Dari hasil pengkajian toksisitas dapat disimpulkan bahwa kedelai PRG event MON 87769 yang mengandung protein Pj.D6D dan Nc.D15D tidak bersifat toksik.

#### III.4 Studi Pemberian Pakan pada Ayam Broiler

Studi pemberian pakan pada ayam broiler telah dilaporkan (Davis, 2008). Bahan uji adalah bungkil kedelai PRG event MON 87769, sedangkan sebagai kontrol digunakan bungkil kedelai non PRG galur A3525. Sebagai pembanding (reference) digunakan bungkil kedelai non PRG galur PN93B82, NK32Z3, Midwest 3444, H3395, P93B87, dan 93B15. Selanjutnya masing-masing bungkil kedelai tersebut dicampurkan dengan pakan ayam sampai homogen. Hewan percobaan yang digunakan adalah anak ayam broiler jantan dan betina komersial DOC (Ross × Ross 308) yang diperoleh dari Hoover's Hatchery, Inc. Rudd, IA.

Disain percobaan yang dilakukan adalah sebagai berikut: pada hari ke-0, 800 ekor ayam broiler jantan dan betina secara acak dibagi menjadi 8 kelompok, sesuai dengan perlakuan (50 ekor jantan dan 50 ekor betina per perlakuan). Percobaan dilaksanakan selama 42 hari yaitu periode starter hari ke-0 sampai hari ke-20, dan periode grower hari ke-21 sampai ke-42. Pakan dan air diberikan secara ad libitum.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa: (a) rata-rata berat badan anak ayam per ekor pada hari ke-0 adalah 38,50 gram (MON 87769) dan 39,36 gram (kontrol dan pembanding); (b) berat badan ayam per ekor pada hari ke-42 antara kelompok perlakuan dan kontrol tidak berbeda nyata, yaitu rata-rata 2,699 kg (MON 87769) dan 2,754 kg (kontrol dan pembanding); (c) konsumsi pakan rata-rata per ekor ayam selama 42 hari percobaan adalah 4,104 kg (MON 87769) dan 4,211 kg (kontrol dan pembanding); (d) konversi pakan rata-rata adalah 1,592 kg/kg BB (MON 87769) dan 1,595 kg/kg BB (kontrol dan pembanding). Tidak terdapat perbedaan nyata untuk semua parameter uji antara kelompok perlakuan, kelompok kontrol dan kelompok pembanding.

Hasil studi pemberian pakan pada ayam broiler menunjukkan nilai nutrisi kedelai PRG event MON 87769 sebanding dengan kedelai kontrol dan pembanding.

#### IV. Kesimpulan

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

1. Informasi genetik: kedelai PRG event MON 87769 mengandung satu kopi gen (Pj.D6D dan Nc.Fad3); tidak mengandung sekuen backbone dari plasmid transformasi PV-GMPQ1972; gen interes masih stabil sampai empat generasi; dan diwariskan mengikuti hukum Mendel.
2. Informasi keamanan pangan:
  - a. kedelai PRG event MON 87769 sepadan secara substansial dengan kedelai non PRG kecuali kadar asam stearidonat (SDA);
  - b. kedelai PRG event MON 87769 yang mengandung protein Pj.D6D dan Nc.D15D tidak menunjukkan adanya potensi menimbulkan alergi; dan
  - c. kedelai PRG event MON 87769 yang mengandung protein Pj.D6D dan Nc.D15D tidak bersifat toksik.
3. TTKH menilai bahwa kedelai PRG event MON 87769 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 kedelai PRG event MON 87769 perlu dikaji ulang.
5. Apabila setelah ditetapkan aman pangan, kemudian produk tersebut terbukti menimbulkan dampak negatif terhadap kesehatan manusia maka pemohon wajib melakukan tindakan pengendalian dan penanggulangan, serta menarik kedelai PRG event MON 87769 dari peredaran.
6. Kedelai PRG event MON 87769 tidak boleh digunakan sebagai pakan ternak sampai memperoleh sertifikat aman pakan.
7. Kedelai PRG event MON 87769 tidak boleh dibudidayakan sampai ditetapkan aman lingkungan.

V. Daftar Acuan

Davis SW. 2008. Comparison of Broiler Performance and Carcass Parameters When Fed Diets Containing Soybean Meal Produced from MON 87769, Control, or Reference Soybean. Monsanto Study No. 07-01-83-40.

Drury, S.M., S.G. Riordan, K. D. Miller, R. Sorbet. 2008. Compositional Analyses of Forage and Seed Collected from Stearidonic Acid-Containing Soybeans, MON 87769, Grown in the United States during 2006. Monsanto Company, Study 07-01-83-39, MSL0020866.

Girault R, Song Z, Pan A, Feng D, Rice JF, Tian Q, Masucci J. 2009. Amended Report for MSL0021074: Molecular Analysis of Stearidonic Acid Producing Soybean MON 87769. Laboratory Project ID Study 06-01-83-23. Monsanto Study Report MSL0021926.

Hammond BG, JK Lemen, G Ahmed, KD Miller, J Kirkpatrick and T Fleeman. 2008. Safety assessment of SDA soybean oil: results of a 28-day gavage study and a 90- day/one generation reproduction feeding study in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 52:311-323.

International Life Sciences Institute (ILSI). 2006. Crop Composition Database, Version3.0, <http://www.cropcomposition.org>.

Kapadia SA, T Bhakta, TC Lee and EA Rice. 2009. Assessment of the in vitro Digestibility of the *Primula juliae*  $\Delta 6$  Desaturase Protein (Pj.D6D) in Simulated Gastric and Simulated Intestinal Fluids. Monsanto Study Report MSL0021428.

Kapadia SA, TC Lee, and EA Rice, 2008. Assessment of the in vitro Digestibility of the *N. crassa*  $\Delta 15$  Desaturase Protein (Nc.D15D) in Simulated Gastric and Simulated Intestinal Fluids. Monsanto Study Report MSL0021427

Qiang Z. dan Silvanovich A. 2008. Assessment of Delta 6 and Delta 15 esaturase Protein Levels in Tissues from MON 87769 Soybean Grown in 2006 U.S. Sponsor and Performing Laboratory Monsanto Company. Biotechnology Regulatory Sciences 800 North Lindbergh Boulevard Saint Louis, Missouri 63167. Laboratory Project ID REG-07- 18. Monsanto Study Report MSL 0021169.

Silvanovich A. and Haidi Tu. 2009. Updated Bioinformatics Evaluation of  $\Delta 6$  and  $\Delta 15$  Desaturases Utilizing the AD\_2009, TOX\_2009 and PRT\_2009. Laboratory Project ID Study Number: RAR-09-520.

Smedley JW. 2008. An Acute Toxicity Study of Delta 6 Desaturase and Delta 15 Desaturase Proteins Administered by the Oral (Gavage) Route to Mice. Monsanto Study No. CRO-2007-324.