

## Lampiran 1. Ringkasan Pengkajian Keamanan Pakan Kedelai PRG *Event* MON87701

### I. Pendahuluan

Kedelai merupakan sumber protein bagi manusia dan ternak di Indonesia, di samping itu, kedelai juga merupakan salah satu sumber minyak nabati di dunia. Salah satu hasil samping dari pembuatan minyak nabati dari kedelai adalah bungkil kedelai. Bungkil kedelai ini dapat digunakan sebagai pakan di Indonesia. Indonesia telah lama mengimpor kedelai untuk sumber pangan manusia dan juga impor bungkil kedelai untuk pakan. Menurut Yusun (2018), Indonesia mengimpor kedelai rata-rata 2,67 juta ton per tahun dan impor bungkil kedelai 4,45 juta ton per tahun (Trobos, 2017).

Dalam budidaya kedelai, beberapa faktor penghambat adalah gulma dan hama kedelai. Di Amerika Selatan beberapa hama dijumpai menyerang tanaman kedelai di lapang, antara lain hama *Lepidoptera* termasuk ulat *velvet bean* (*Anticarsia gemmatalis*), ulat penggerek batang kedelai *Epinotia aporema* dan *Pseudoplusia includens*.

Perusahaan Monsanto telah mengembangkan kedelai berbasis rekayasa genetik bernama MON87701 yang mengandung gen *cry1Ac* yang memberi perlindungan dari serangan hama *Lepidoptera* (kupu-kupu) *A. gemmatalis*, *P. includens*, dan *Heliothis virescens* (Bernardi *et al.*, 2012 dan Bernardi *et al.*, 2014). Kedelai MON87701 ini telah dinyatakan aman pangan oleh 4 (empat) negara pertama kali di tahun 2010 dan kini jumlah negara yang menyatakan aman pangan adalah 15 (lima belas) negara yaitu USA (2010), Australia/New Zealand (2010), Kanada (2010), Mexico (2010), Korea (2011), Jepang (2011), Taiwan (2011), EU (2012), Philippines (2012), Rusia (2013), China (2013), **Indonesia (2013)**, Vietnam (2015), Singapura (2016), dan Argentina (2016). Di Indonesia, kedelai MON87701 ini dinyatakan aman pangan dengan Surat Keputusan KA BPOM No : HK04.1.52.06.13.3267 tahun 2013.

MON87701 ini juga telah dinyatakan aman pakan oleh 13 (tiga belas) negara yaitu USA (2010), Kanada (2010), Mexico (2010), Jepang (2011), Korea (2011), EU (2012), Philippines (2012), China (2013), Rusia (2013), Vietnam (2015), Argentina (2016), Singapura (2016) dan Taiwan (2017).

Berdasarkan Peraturan Menteri Pertanian No.36/Permentan/LB.070/8/2016 tahun 2016 tentang Pengkajian Keamanan Pakan PRG dan Keputusan Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Nomor: 466.2/Kpts/OT.210/H/11/2016 tahun 2016 tentang Pedoman Teknis Tata Cara Dan Mekanisme Pengkajian Keamanan Pakan PRG, TTKH Pakan PRG telah melakukan pengkajian keamanan pakan kedelai PRG *event* MON87701 berdasarkan informasi genetik dan informasi keamanan pakan sebagaimana diuraikan di bawah ini.

## **II. Informasi Genetik**

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

Kedelai PRG *event* MON87701 mengandung satu gen interes yaitu gen *cry1Ac*, dan mengekspresikan protein Cry1Ac suatu protein insektisidal dari *Bacillus thuringiensis* subsp.*kurstaki* (Fischhoff dan Perlak, 1996), yang bertanggung jawab memberikan ketahanan terhadap serangga hama Lepidoptera.

Promoter yang digunakan adalah RbcS4 yang mengkode ribulosa 1,5-bifosfat karboksilase sub unit kecil 1A (Krebbers *et al.*, 1988), promoter diekspresikan pada jaringan tajuk tumbuhan.

Sekuen target CTP1 adalah sekuen yang mengkodekan peptida transit 1A dari *Arabidopsis thaliana* RbcS4 untuk mengarahkan protein Cry1Ac ke kloroplas (Krebbers *et al.*, 1988).

Terminator gen *sphas1* (7S  $\alpha'$ ) dari *Glycine max* yang mengkode protein penyimpanan (*storage protein*) benih 7S  $\alpha'$ ,  $\beta$ -konglisinin, termasuk 35 nukleotide daerah penyandi  $\beta$ -konglisinin terminal karboksil dengan kodon terminasi dan sekuen poliadenilasi (Schuler *et al.*, 1982). Elemen ini berfungsi untuk menghentikan transkripsi dan mengarahkan poliadenilasi mRNA.

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

Gen *cry1Ac* berasal dari *Bacillus thuringiensis* subsp.*kurstaki*, adalah mikroorganisme tanah yang melimpah di lingkungan (de Boer dan Diderichsen,

1991). Mikrobal ini telah digunakan sebagai pestisida dengan riwayat penggunaan yang aman untuk pengendalian hama di pertanian (Cannon, 1993; US EPA, 1988; WHO, 1999), juga telah digunakan lebih dari 50 tahun dan tidak menunjukkan efek merugikan (toksik) terhadap kesehatan manusia (Betz *et al.*, 2000; US EPA, 1988; US EPA, 2001; James 2003). Gen *cry1Ac* juga digunakan pada tanaman kapas PRG *event* MON531/757/1076 yang tahan serangga hama dan telah dikomersialkan secara global (Mendelsohn *et al.*, 2003). Promoter dari gen *rbcS4* berasal dari *Arabidopsis thaliana*, sekuen target CTP1 berasal dari *Arabidopsis thaliana*, dan terminator dari gen *sphas1* (7S  $\alpha'$ ) berasal dari kedelai (*Glycine max*).

### II.3. Sistem transformasi

MON87701 dirakit melalui sistem transformasi jaringan meristem kedelai yang dimediasi *Agrobacterium tumefaciens* dengan menggunakan plasmid biner PV GMIR9 berdasarkan metode transformasi tanpa menggunakan kalus (Martinell *et al.*, 2002). Plasmid tersebut mengandung dua kaset, yaitu T-DNA I yang mengandung gen *cry1Ac* dan T-DNA II yang mengandung gen *cp4 epsps* yang digunakan sebagai marka penyeleksi selama transformasi untuk menghasilkan MON87701. Singkatnya, jaringan meristem dipotong dari embrio biji kedelai varietas A5547 yang telah dikecambahkan, kemudian dikultur bersama *Agrobacterium* yang membawa vektor, meristem tersebut lalu dipindahkan ke media seleksi yang berisi glifosat, guna mencegah pertumbuhan sel-sel tanaman yang tidak ditransformasikan. Meristem yang hidup dipindahkan ke media yang kondusif untuk perkembangan tunas dan akar. Tanaman yang berakar dan menunjukkan fenotipik normal dipilih dan dipindahkan ke tanah untuk ditumbuhkan ( $R_0$ ). Selanjutnya tanaman  $R_1$  yang masih bersegregasi dilakukan seleksi memakai dosis glifosat yang tidak mematikan. Tanaman  $R_1$  yang hidup (mengandung gen *cp4 epsps*) dieliminir dan yang menunjukkan kerusakan kecil (tidak mengandung gen *cp4 epsps*) dievaluasi lebih lanjut. Tanaman-tanaman yang hanya mengandung T-DNA I (kaset gen *cry1Ac*) diidentifikasi dan dipilih melalui kombinasi teknik-teknik analisis, termasuk ELISA dan analisis PCR

TaqMan. Hanya tanaman-tanaman R<sub>1</sub> yang homozigot bagi kaset T-DNA I dan tidak mempunyai kaset T-DNA II yang diteruskan untuk pengembangan.

#### **II.4. Stabilitas genetik**

Stabilitas pewarisan gen sisipan *cry1Ac* pada MON87701 dianalisis secara molekuler dengan PCR Taqman pada lima generasi *selfing* (R<sub>1</sub>-R<sub>5</sub>). Kajian pewarisan juga dilakukan pada dua generasi persilangan MON87701 (F1 dan F2) dengan varietas kedelai yang tidak mengandung gen *cry1Ac*. Untuk mengetahui lokus dan jumlah kopi sisipan dilakukan dengan analisis *Southern Blot*. Hasil ini menunjukkan dan mengkonfirmasi bahwa gen *cry1Ac* di dalam kedelai MON87701 terletak pada sebuah lokus tunggal berisi satu kopi dan diwariskan sesuai prinsip-prinsip Mendel (Arackal *et al.*, 2009; Arackal *et al.*, 2010 Phillips *et al.*, 2010).

Berdasarkan hasil pengkajian informasi genetik, dapat disimpulkan bahwa: kedelai PRG MON87701 mengandung satu kopi gen *cry1Ac*; tidak mengandung sekuen *backbone* dari plasmid transformasi PV-GMIR9; gen interes (*cry1Ac*) masih stabil sampai lima generasi dan terletak pada sebuah lokus tunggal yang diwariskan sesuai prinsip-prinsip Mendel.

### **III. Informasi Keamanan Pakan**

#### **III.1 Kesepadanan Substansial**

Pengkajian berdasarkan hasil analisis komposisi nutrisi pada hijauan dan biji kedelai PRG MON87701, varietas pembandingan non-PRG (A5547), dan 20 varietas kedelai konvensional komersial yang ditanam di lima lokasi percobaan pada lima negara bagian di Amerika Serikat pada tahun 2007 (Berman *et al.* 2008).

Analisis sampel hijauan mencakup serat dan proksimat (kadar abu, lemak, air, protein dan karbohidrat). Sampel biji meliputi kandungan asam amino (Alanin, Arginin, Asam aspartat, Sistin, Sistein, Asam glutamat, Glisin, Histidin, Isoleusin,

Leusin, Lisin, Metionin, Fenilalanin, Prolin, Serin, Treonin, Triptofan, Tirosin, dan Valin), asam lemak (Kaprilat, Kaprat, Laurat, Miristat, Miristoleat, Pentadekanoat, Palmitat, Palmitoleat, Heptadekanoat, Stearat, Oleat, Linoleat, Gamma Linolenat, Linolenat, Arakidat, Eikosenoat, Eikosadienoat, Eikosatrienoat, Arakidonat, Behenat, Erusat, Lignoserat), proksimat (kadar abu, karbohidrat, lemak dan protein), serat, antinutrisi (inhibitor tripsin, asam fitat, lektin), isoflavon (daidzein, glisitein, dan genistein), vitamin E, rafinosa, dan stakiosa.

Nilai kesepadanan substansial kedelai PRG ditetapkan berdasarkan nilai hasil analisis nutrisi kedelai PRG dibandingkan dengan kedelai non-PRG (secara statistik pada taraf nyata 5% atau confidence interval 95%) dan kandungan nutrisi referen kedelai konvensional-komersial yang telah dipublikasikan (Berman *et al.*, 2008; Lundry *et al.*, 2008, ILSI, 2006). Analisa dilakukan di laboratorium EPL Bio Analytical Services (EPL BAS) Niantic, Illinois dan Certus International Inc Chesterfield, Missouri.

Dari hasil pengkajian kesepadanan substansial dapat disimpulkan bahwa kandungan komposisi nutrisi hijauan dan biji kedelai PRG MON87701 menunjukkan nilai kandungan yang sepadan secara substansial dengan kedelai non PRG. Kandungan nutrisi kedelai PRG MON87701 masih berada dalam kisaran komposisi kedelai konvensional yang dilaporkan oleh ILSI (2006).

## **III.2 Toksisitas**

Pengujian toksisitas dilakukan melalui studi bioinformatika, uji *in vitro digestibility* dan toksisitas akut pada mencit.

### **III.2.1 Studi Bioinformatika**

Kemiripan struktural protein Cry1Ac dengan toksin atau protein lain yang aktif secara biologis dianalisis dengan membandingkan kemiripan sekuen Cry1Ac dengan sekuen dalam basis data toxin TOX\_2017 dan PRT\_2017 (Skottke dan Silvanovich, 2017). Analisis homologi dilakukan dengan perangkat keterhubungan sekuen FASTA dengan kriteria  $E\text{-score} \leq 1 \times 10^{-5}$ . Hasil analisis

ini menunjukkan bahwa tidak ada kemiripan antara protein Cry1Ac dengan toksin putatif alam.

### **III.2.2 Uji *In Vitro* Digestibility**

Analisis stabilitas protein Cry1Ac yang diproduksi dari *E. coli* sepadan dengan protein Cry1Ac dari kedelai MON87701 (Bell *et al.*, 2008). Hasil uji *in vitro digestibility* terhadap protein Cry1Ac dengan menggunakan metode SGF dan SIF menunjukkan bahwa protein Cry1Ac dicerna dengan cepat di lambung (uji SGF) dan terkonversi menjadi sebuah fragmen 4kDa yang tergedradasi dalam waktu 30 detik di usus halus (uji SIF) (Brian *et al.*, 2008).

### **III.2.3 Uji Toksisitas Oral Akut**

Uji toksisitas oral akut terhadap protein Cry1Ac dilakukan pada mencit CD-1 jantan (umur sekitar 8 minggu, berat badan 28,4-33,4 gram) dan betina (umur sekitar 10 minggu, berat badan 23,1-29,4 gram) dalam 2 tahapan percobaan (Smedley, 2009), diberikan secara dicekok dengan dosis tunggal. Hasil uji toksisitas protein murni Cry1Ac yang diperoleh dari *E. coli* sepadan dengan protein Cry1Ac kedelai MON87701 (Bell *et al.*, 2008). Sebagai kontrol digunakan larutan *Bovine Serum Albumin* (BSA).

Sebelum pengujian, semua mencit dibiarkan beradaptasi minimum selama lima hari ditempatkan di kandang individu selama periode aklimatisasi dan pengujian, mengikuti protokol USDA *Animal Welfare Act* (9 CFR, Part 1, 2, and 3) and the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.

Pada pengujian tahap I digunakan 20 ekor mencit jantan dan 20 mencit betina yang masing-masing dibagi dalam dua kelompok yaitu perlakuan dan kontrol. Kelompok perlakuan dicekok dengan larutan protein Cry1A dosis 1290 mg/kg BB, sedangkan kelompok kontrol diberikan BSA dosis 1280 mg/kg BB. Mencit diamati selama 14 hari pada parameter berat badan, konsumsi pakan dan gejala klinis. Pada akhir pengamatan, mencit dibius dan dinekropsi untuk pengamatan karkas dan organ-organnya. Pada pengujian tahap II digunakan 20 ekor mencit jantan yang dibagi dalam dua kelompok yaitu perlakuan dan kontrol. Kelompok

perlakuan dicekok dengan larutan protein Cry1A dosis 1460 mg/kg BB dan kelompok kontrol dengan BSA dosis 1620 mg/kg BB. Prosedur pengujian sama dengan tahap I.

Hasil pengujian pada tahap I dan II menunjukkan tidak terdapat kelainan klinis, kematian pada mencit, perbedaan berat badan dan perbedaan konsumsi pakan antara perlakuan dan kontrol, serta tidak ada kelainan organ antara perlakuan dan kontrol.

Dari hasil uji toksisitas tersebut dapat disimpulkan bahwa protein Cry1A tidak bersifat toksik terhadap mencit.

#### **IV. Studi Pakan**

Tujuan dilakukan studi pakan adalah untuk mengetahui performans dan karkas ayam broiler yang diberi pakan yang mengandung bungkil kedelai PRG *event* MON87701 dan non PRG.

Pengujian dilakukan pada 900 ekor ayam broiler (jantan dan betina) selama 44 hari yaitu untuk pakan periode *starter* (umur 1-21 hari) dan periode *grower/finisher* (22-44 hari) (Davis, 2009). Formula pakan disusun mengandung kalori yang sama dengan standar industri dan atau yang direkomendasikan oleh *Nutritional Requirements of Poultry* (NRC, 1994). Pengamatan dilakukan terhadap produksi ternak yaitu meliputi parameter pertambahan bobot badan, konsumsi pakan, konversi pakan, daya hidup dan berat karkas sampai umur 42 hari serta kualitas karkas broiler pada umur 44 hari. Studi dilaksanakan dengan mengikuti Prosedur *COR Standard Operating Procedures; The Principles and guidelines for the care and use of agricultural animals in research* (FASS, 1999); dan *The food and drug administration's good laboratory practice for nonclinical laboratory studies regulation*.

Hasil pengujian menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata pada parameter bobot badan akhir, konsumsi dan konversi pakan, berat karkas total dan komposisi

daging broiler yang diberi pakan yang mengandung bungkil dari kedelai PRG *event* MON87701 maupun bungkil dari kedelai non PRG.

Dapat disimpulkan bahwa performans ayam broiler yang diberi pakan mengandung bungkil dari kedelai PRG *event* MON87701 dan non PRG adalah sama.

## V. Kesimpulan

Atas dasar hasil pengkajian informasi genetik dan keamanan pakan, disimpulkan hal-hal sebagai berikut :

1. Kedelai PRG *event* MON87701 mengandung satu kopi gen *cry1Ac* yang terletak pada satu lokus, diturunkan mengikuti kaidah hukum Mendel dan stabil sampai dengan lima generasi,
2. Kedelai PRG *event* MON87701 sepadan secara substansial dengan kedelai non PRG,
3. Kedelai PRG *event* MON87701 tidak bersifat toksik,
4. TTKH PRG Bidang Keamanan Pakan menilai bahwa kedelai PRG *event* MON87701 yang diajukan adalah aman sebagai bahan pakan.

## VI. Saran

Dari hasil pengkajian keamanan kedelai PRG *event* MON87701, dapat disarankan beberapa hal sebagai berikut :

1. Apabila di kemudian hari ditemukan data dan informasi baru yang tidak sesuai dengan data keamanan pakan yang diperoleh hingga saat ini, maka status keamanan pakan kedelai PRG *event* MON87701 perlu dikaji ulang,
2. Apabila setelah ditetapkan aman pakan kemudian produk tersebut terbukti menimbulkan dampak negatif terhadap kesehatan ternak, maka pemohon wajib melakukan tindakan pengendalian dan penanggulangan serta menarik kedelai PRG *event* MON87701 dari peredaran,
3. Kedelai PRG *event* MON87701 tidak boleh dibudidayakan sebelum memperoleh sertifikat keamanan lingkungan.



## Daftar Pustaka

- Arackal, S.M., K.R. Lawry, Z. Song, J.R. Groat, J.F. Rice, J.D. Masucci, and Q. Tian. 2009. Amended Report for MSL0022176 : Molecular Analysis of Insect-Protected Soybean MON87701. Study REG-07-317 MSL0022327
- Arackal, S.M., K.R. Lawry, Z. Song, J.G. Groat, and J.D. Masucci. 2010. Amended Report for MSL0022327: Amended Report for MSL0022176: Molecular analysis of insect-protected soybean MON 87701. Monsanto Technical Report MSL0022652. St. Louis, MO.
- Bell, E, KS Crowley, JP Uffman and EA Rice, 2008. Characterization of the Cry1Ac protein purified from the harvested seed of MON87701 Soybean and comparison of the physicochemical and functional properties of the MON87701-produced and E.coli-produced Cry1Ac Protein. Monsanto Study Report REG-07-270. Monsanto Company, St Louis. MO 63167.
- Berman K.H., S.G. Riordan, M.N. Smith, R. Sorbet. 2008. Compositional analysis of forage and seed collected from MON87701 Grown in United States during 2007. Monsanto Company. Product Safety Center.
- Bernardi, O., G.S. Malvestiti, P.M. Daurado, W.S. Oliveira, S. Martinelli, G.U. Berger, G.P. Head, and C. Omoto. 2012. Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 × MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. Pest Management Science 68(7): 1083-1091
- Bernardi, O., P.M. Daurado, R.A. Carvalho, S. Martinelli, G.U. Berger, G.P. Head, and C. Omoto. 2014. High levels of biological activity of Cry1Ac protein expressed on MON 87701 × MON 89788 soybean against *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). Pest Management Science 70(4): 588-594
- Betz, F.S., B.G. Hammond and R.L. Fuchs. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. Regulatory Toxicology and Pharmacology 32:156-173.
- Brian E. G., E. Bell, and E.A. Rice. 2008. Assesment of the In Vitro Digestibility of the Cry1Ac Protein in Simulated Gastric and Simulated Intestinal Fluids. Study REG-08-136. Monsanto Company.
- Cannon, R.J.C. 1993. Prospects and progress for *Bacillus thuringiensis* based pesticides. Pesticide Science 37:331-335.

- Davis, SW. 2009. Comparison of Broiler Performance and Carcass Parameters When Fed Diets Containing Soybean Meal Produced from MON87701, Control, or Reference Soybean. Report No. MSL0021800. Monsanto Company.
- De Boer, A.S. and B. Diderichsen. 1991. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. Applied Microbiology and Biotechnology 36:1-4.
- FASS. 1999. Guidelines for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching. 1<sup>st</sup> rev. Federation of Animal Science Societies, Savoy, IL.
- Fischhoff, D.A and F.J. Perlak. 1996. Synthetat plant genes. Patent 5,500,365, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- International Life Science Institute (ILSI). 2006. Crop Composition Database. Versi 3.0. <http://www.cropcomposition.org/>.
- James, C. 2003. Preview: Global status of commercialized transgenat crops:2003. ISAAA briefs no. 30. ISAAA. Ithaca, New York.
- Krebbes,E., J. Seurinck, L.Herdies, A.R. Cashmore and M.P. Timko. 1988. Four genes in two diverged subfamilies encode the ribulose-1,5-biphosphate carboxylase small sub unit polypeptides of *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology 11:745-759.
- Lundry, D.R., W.P. Ridley, J.J. Meyer, S.G. Riordan, M.A. Nemeth, W.A. Trujillo, M.L. Breeze and R. Sorbet. 2008. Compotition of grain, forage, and processed fractions from second-generation glyphosate-tolerant soybean, MON 89788, is equivalent to tht of conventional soybean (*Glycine max* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 56:4611-4622.
- Martinell, B.J., L.S. Julson, C.A. Emler, Y. Huang, D.E. McCabe and E.J. Williams. 2002. Soybean Agrobacterium transformation method. Patent 6,384,301, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- Mendelsohn, M.J. Kough, Z. Vaituzis and K. Matthews. 2003. Are *Bt* crops safe? Nature Biotechnology 21: 1003-1009.
- NRC. 1994. Nutritional Requirements of Poultry, 9<sup>th</sup> revised Edition. National Research Council, Washington, D.C.
- Phillips, S., A. Knox, L. Ruschke, D. Kendrick. 2010. RPN-08-438. Heritability and stability of genes present in insect-protected soybean MON 87701 across multiple generations.

- Schuler, M.A. E.S. Schmitt and R.N. Beachy. 1982. Closely related families of genes code for the  $\beta$  and  $\alpha'$  subunits of the soybean 7S storage protein complex. *Nucleic Acids Research*: 10:8225-8244.
- Skottke K. and A. Silvanovich. 2017. RAR-2017-0315. Updated bioinformatics evaluation of MON 87701 utilizing the AD\_2017, TOX\_2017, PRT\_2017, EST\_2017, NT\_2017, and NR\_2017 databases. Monsanto Company, 800 North Lindberg Boulevard, Saint Louis, Missouri 63167.
- Smedley, JW. 2009. An Acute toxicity study of Cry1Ac protein administered by the oral (Gavage) route of mice. Testing Facility Study no. EUF00221. Monsanto study report, CRO-2007-325. Monsanto Company, St Louis. MO 63167.
- Thomas, K., G. Bannon, S. Hefle, C. Herouet, M. Holsapple, G. Ladics, S. MacIntosh and L. Privalle. 2005. In silico methods for evaluating human allergenicity to novel proteins: International Bioinformatics Workshop Meeting Report, 23-24 February 2005.
- Trobos. 2017. [www.trobos.com/detail-berita/2018/01/22/5719776/](http://www.trobos.com/detail-berita/2018/01/22/5719776/)
- U.S. EPA. 1988. Guidance for the registration of pesticide products containing *Bacillus thuringiensis* as the active ingredient. NTIS PB 89-164198. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- U.S. EPA. 2001. Biopesticides registration action document : *Bacillus thuringiensis* (Bt) plant-incorporated protectant (October 15, 2001). U.S. Environmental protection Agency, Washington, D.C.
- WHO. 1999. Environmental health criteria 217. Microbial pest control agent: *Bacillus thuringiensis*. World Health Organization, Geneva.
- Yusan. 2018. Kontan.co.id Jakarta. <http://industri.kontan.co.id/news/impor-kedelai-hingga-tahun-2017/>