

Ringkasan Pengkajian Keamanan Pangan Kapas PRG Event GHB119

I. Pendahuluan

Kapas PRG *event* GHB119 merupakan kapas produk rekayasa genetik dari PT. BASF Indonesia yang mengandung dua gen sisipan yaitu gen *cry2Ae* dan *bar*. Gen *cry2Ae* menghasilkan protein Cry2Ae yang menyebabkan ketahanan terhadap serangga hama Lepidoptera seperti *bollworm* pada kapas (CBW, *Helicoverpa zea*), dan larva *fall armyworm* (FAW, *Spodoptera frugiperda*). Gen *bar* menyandi enzim *phosphinothricin acetyltransferase* (PAT/*bar*) yang menyebabkan toleransi terhadap herbisida amonium glufosinat.

Kapas PRG *event* GHB119 telah memperoleh sertifikat aman pangan di 12 (sebelas) negara, yaitu Australia (2011), Selandia Baru (2011), Amerika Serikat (2011), Kanada (2012), Jepang, (2012), Korea (2013), Taiwan (2015), Kolombia (2016), Uni Eropa (2017), Malaysia (2017), Tiongkok (2018), dan Filipina (2018). Kapas PRG *event* GHB119 juga telah memperoleh sertifikat aman pakan di 10 (sepuluh) negara, yaitu Amerika Serikat (2011), Kanada (2012), Jepang (2012), Korea (2012), Kolombia (2016), Uni Eropa (2017), Taiwan (2017), Malaysia (2017), Tiongkok (2018), dan Filipina (2018). Sertifikat aman lingkungan untuk kapas PRG *event* GHB119 telah diperoleh di 2 (dua) negara, yaitu Amerika Serikat (2011) dan Jepang (2013).

Pengkajian keamanan pangan kapas PRG *event* GHB119 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-22/KKH PRG/02/2020 tanggal 28 Februari 2020 perihal Penugasan Pengkajian Keamanan Pangan Produk Rekayasa Genetik (PRG) Komoditas Kapas PRG *event* GHB119. TTKH telah melakukan pengkajian keamanan pangan kapas PRG *event* GHB119 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

Kapas PRG *event* GHB119 mengandung dua gen sisipan yaitu gen *cry2Ae* dan *bar*. Elemen genetik dari kaset gen sisipan pada Kapas PRG *event* GHB119 secara lengkap adalah sebagai berikut:

- gen *cry2Ae* menghasilkan protein Cry2Ae yang menyebabkan ketahanan terhadap serangga hama Lepidoptera seperti *bollworm* pada kapas (CBW, *Helicoverpa zea*), dan larva *fall armyworm* (FAW, *Spodoptera frugiperda*);
- promotor 35S CaMV yang merupakan konstitutif promotor;
- sekuen 5'cab22L, yaitu sekuen leader dari gen *chlorophyll a/b binding protein*;

- sekuen TPssuAt, yaitu sekuen penyandi dari peptida transit gen *ats1A ribulose-1,5-biphosphate carboxylase* subunit kecil;
 - terminator 3'35S, merupakan sekuen dari daerah 3' UTR (*UnTranslated Region*/daerah yang tidak di-translasi);
 - gen *bar* menyandi enzim *phosphinothricin acetyltransferase* (PAT/*bar*) yang menyebabkan toleransi terhadap herbisida amonium glufosinat;
 - promotor Pcsvmv, promotor dari *Cassava Vein Mosaic Virus*; dan
 - terminator 3'nos, daerah 3' UTR (*UnTranslated Region*/daerah yang tidak di-translasi) dari gen *nopaline synthase*.
- (Lecleir, 2007)

II.2 Sumber Gen Sisipan

Sumber elemen genetik dari kaset gen sisipan pada Kapas PRG *event* GHB119 secara lengkap adalah sebagai berikut:

- gen *cry2Ae* diisolasi dari bakteri tanah *Bacillus thuringiensis subsp. Dakota* (van der Klis, 2008);
- promotor 35S CaMV berasal dari *Cauliflower Mosaic Virus* (Odell *et al.*, 1985);
- sekuen 5'cab22L, diisolasi dari gen *chlorophyll a/b binding protein* dari *Petunia hybrid* (Harpster *et al.*, 1988);
- sekuen TPssuAt, berasal dari gen penyandi peptida transit gen *ats1A ribulose-1,5-biphosphate carboxylase* subunit kecil *Arabidopsis thaliana* (De Almeida *et al.*, 1989);
- terminator 3'35S, berasal dari *Cauliflower Mosaic Virus* (Sanfacon *et al.*, 1991);
- gen *bar* diisolasi dari bakteri *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson *et al.*, 1987);
- promotor Pcsvmv berasal dari *Cassava Vein Mosaic Virus* (Verdaguer *et al.*, 1996); dan
- terminator 3'nos berasal dari gen *nopaline synthase* T-DNA pTiT37 (Depicker *et al.*, 1982).

II.3 Sistem Transformasi

Kapas PRG *event* GHB119 dirakit melalui metode transformasi dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens* pada varietas Coker 312 (C312). Kalus embriogenik kapas diko-kultivasi dengan kultur *A. tumefaciens*, strain C58C1Rif yang mengandung plasmid pTEM1. Setelah diko-kultivasi, jaringan kapas diregenerasi menjadi tanaman lengkap menggunakan media regenerasi yang sesuai ditambah claforan 500 mg/l untuk menghilangkan residu *Agrobacterium*, dan kemudian dilakukan seleksi menggunakan amonium glufosinat. Planlet yang terbentuk dipindahkan ke rumah kaca, diuji lebih lanjut untuk toleransi terhadap herbisida amonium glufosinat dan dibiarkan berbunga dan membentuk biji (Van Larebeke *et al.*, 1974; Criel, 2008).

II.4 Stabilitas Genetik

Analisis *Southern Blot* telah dilakukan untuk menentukan jumlah salinan sisipan gen. Analisis menggunakan DNA genom kapas PRG *event* GHB119, kontrol positif dan kontrol negatif yang sesuai, serta empat probe yang masing-masing mengandung komponen kaset gen yang ditransformasikan. Hasil hibridisasi menunjukkan bahwa adanya integrasi satu kopi lengkap dari T-DNA pada kapas PRG *event* GHB119. Analisis *Southern Blot* juga dilakukan untuk memastikan ada atau tidak adanya sekuen *backbone* plasmid di dalam kapas PRG *event* GHB119. Hasil hibridisasi menunjukkan bahwa tidak terdapat sisipan sekuen *backbone* dari plasmid pTEM12. Selain itu, analisis *Southern Blot* dilakukan untuk mengetahui stabilitas integrasi pada berbagai generasi. Hasil yang diperoleh menunjukkan adanya stabilitas sisipan gen pada Kapas PRG *event* GHB119 sampai tiga generasi, yaitu F1, BC1F1, dan BC2F1. Selain itu, penyisipan gen dalam kapas PRG *event* GHB119 mengikuti pewarisan hukum Mendel (Habex, 2011; Moens, 2008; Verhaeghe dan Criel, 2008).

Berdasarkan hasil kajian informasi genetik dapat disimpulkan bahwa:

1. Kapas PRG *event* GHB119 mengandung dua kopi sisipan yaitu gen *cry2Ae* dan gen *bar*,
2. Kapas PRG *event* GHB119 tidak mengandung sekuen *backbone* dari plasmid transformasi pTEM12; dan
3. T-DNA dalam Kapas PRG *event* GHB119 stabil sampai tiga generasi yaitu F1, BC1F1 dan BC2F1, dan diwariskan mengikuti hukum Mendel.

III. Informasi Keamanan Pangan

III.1 Kesepadanan Substansial

Pengkajian kesepadanan substansial dari kapas PRG *event* GHB119 dilakukan dengan menggunakan tanaman kapas PRG *event* GHB119 dan tanaman kapas non PRG sebagai kontrol. Kapas ditanam dalam rancangan *randomized complete block* pada tahun 2007 dan 2008 di enam lokasi di daerah Andalusia (provinsi Sevilla dan Cadiz) dan di dua lokasi di daerah Catalonia (provinsi Tarragona), Spanyol. Sebagian tanaman kapas diberi perlakuan herbisida amonium glufosinat.

Setelah dipanen biji kapas dikirim ke SGS Germany GmbH, Laboratory Services Hamburg, Jerman yang sudah menerapkan *Good Laboratory Practices* (GLP) untuk dianalisis komposisinya. Biji kapas dianalisis untuk kadar proksimat (air, protein, lemak, abu, dan karbohidrat *by-difference*), ADF (*acid detergent fiber*), NDF (*neutral detergent fiber*), mineral (kalsium, kalium, magnesium, besi, seng, dan fosfor), tokoferol total, asam amino (alanin, arginin, asam aspartat, sistin, asam glutamat, glisin, histidin, isoleusin, leusin, lisin, fenilalanin, metionin, prolin, serin, treonin, triptofan, tirosin, dan valin), asam lemak (kaprat, laurat, miristat, pentadekanoat, palmitat, margararat, stearat, arakhidat, behenat, trikosanoat, lignoserat, palmitoleat ω -7 dan ω -9, oleat, sis-oleat, eikosenoat, linoleat, trans-

linoleat, dan linolenat), zat anti gizi (gosipol dan asam fitat), dan metabolit sekunder lainnya (asam malvalat, asam sterkulat, dan asam dihidrosterkulat) (Oberdörfer, 2011).

Hasil analisis komposisi biji kapas menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata di antara biji kapas PRG *event* GHB119 dengan biji kapas kontrol non PRG, dan masuk ke dalam kisaran komposisi biji kapas komersial pada umumnya.

Berdasarkan hasil pengkajian kesepadanan substansial dapat disimpulkan bahwa biji kapas PRG *event* GHB119 sepadan secara substansial dengan biji kapas non-PRG.

III.2 Alergenisitas

Pengkajian alergenisitas terhadap protein Cry2Ae dan PAT yang diekspresikan oleh kapas PRG *event* GHB119 dilakukan melalui analisis bioinformatika, analisis konsentrasi protein, dan pengujian stabilitas protein yang meliputi stabilitas cerna dan stabilitas panas. Pengujian alergenisitas dilakukan di laboratorium yang telah menerapkan GLP.

III.2.1 Analisis Bioinformatika

Evaluasi kemiripan sekuen protein Cry2Ae dan PAT dengan protein alergen dilakukan menggunakan *database* protein alergen yang diperoleh dari *Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) AllergenOnline Database* versi 2014 dan 2017 dengan perangkat FASTA, serta pencarian kesamaan sekuen delapan atau lebih asam amino dengan sekuen protein dalam *database* menggunakan SeqMatchAll dari situs EMBOSS (*European Molecular Biology Open Software Suite*).

Hasil analisis menunjukkan bahwa tidak terdapat kemiripan sekuen asam amino yang relevan secara biologis (35% atau lebih kesamaan asam amino di dalam peptida yang mengandung 80 asam amino) antara sekuen asam amino protein Cry2Ae dan PAT dengan sekuen asam amino protein alergen. Selain itu, tidak terdapat kesamaan sekuen delapan asam amino atau lebih pada sekuen asam amino protein Cry2Ae dan PAT dengan sekuen asam amino protein alergen dalam *database* (Pecoraro-Mercier, 2014; Capt, 2017).

III.2.2 Analisis Konsentrasi Protein

Konsentrasi protein Cry2Ae dan PAT pada biji kapas PRG *event* GHB119 ditentukan dengan metode ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Konsentrasi protein Cry2Ae dan PAT dalam biji kapas PRG *event* GHB119 ditemukan masing-masing sebesar 1,38–1,57 µg/g berat basah dan 45,5–56,1 µg/g berat basah. Kandungan protein Cry2Ae dan PAT hanya merupakan sebagian kecil, masing-masing sebesar 0,00082% dan 0,028% dari protein total dalam biji kapas PRG *event* GHB119 (Currier, 2008; Martone, 2008a; Oberdörfer, 2011).

III.2.3 Analisis Stabilitas Protein

Protein Cry2Ae dan PAT yang dihasilkan oleh tanaman kapas PRG *event* GHB119 sangat sedikit, sehingga untuk keperluan pengujian stabilitas protein digunakan protein yang diproduksi pada bakteri *Escherichia coli*. Kesetaraan protein Cry2Ae dan PAT yang diproduksi oleh bakteri *E. coli* dengan protein yang diekspresikan di dalam tanaman kapas PRG *event* GHB119 diuji dengan menggunakan metode SDS-PAGE, uji immunoreaktivitas dengan *Western blot*, analisis sekuen N-terminal, serta analisis aktivitas insektisidal untuk protein Cry2Ae dan aktivitas enzimatis untuk protein PAT. Hasil analisis menunjukkan bahwa protein Cry2Ae dan PAT yang dihasilkan oleh bakteri *E. coli* ekuivalen dengan protein Cry2Ae dan PAT yang dihasilkan oleh kapas PRG *event* GHB119 (Martone, 2008b).

III.2.3.1 Analisis Stabilitas Cerna Protein

Analisis stabilitas cerna protein Cry2Ae dan PAT dilakukan melalui uji pencernaan menggunakan simulasi cairan lambung (*Simulated Gastric Fluid* - SGF) dan simulasi cairan usus (*Simulated Intestinal Fluid* - SIF) dalam rentang waktu 60 menit pada suhu 37°C. Hasil hidrolisis protein dievaluasi dengan menggunakan metode SDS PAGE dan *Western blot*.

Evaluasi dengan SDS-PAGE dan *Western blot* menunjukkan, bahwa setelah inkubasi selama 2 menit dalam SGF dengan menggunakan pepsin pada pH 1,2, lebih dari 90% protein Cry2Ae telah terhidrolisis, dan setelah inkubasi selama 5 menit atau lebih, seluruh protein Cry2Ae telah terhidrolisis. Setelah inkubasi selama 60 menit dalam SIF dengan menggunakan pankreatin pada pH 7,5, lebih dari 90% protein Cry2Ae telah terhidrolisis (Rouquié, 2008a; 2008b; 2008c).

Evaluasi dengan SDS-PAGE dan *Western blot* menunjukkan bahwa setelah inkubasi selama 30 detik dalam SGF dengan menggunakan pepsin pada pH 1,2, tidak terdeteksi adanya pita protein PAT maupun fragmen-fragmennya. Setelah inkubasi selama 5 menit dalam SIF dengan menggunakan pankreatin pada pH 7,5, lebih dari 90% protein PAT telah terhidrolisis, sedangkan setelah inkubasi selama 10 menit dalam SIF, protein PAT maupun fragmen-fragmennya dapat terhidrolisis sempurna (Rasclé, 2009a; 2009b).

III.2.3.2 Analisis Stabilitas Panas Protein

Analisis pengaruh pemanasan terhadap stabilitas protein Cry2Ae yang diproduksi oleh *E. coli* dilakukan melalui evaluasi dengan SDS-PAGE, *Western blot*, dan aktivitas insektisidal, serta evaluasi aktivitas enzimatis protein terhadap protein PAT (Rouquié, 2008c; Van der Klis *et al.*, 2008; Serrano, 2016).

Evaluasi dengan SDS-PAGE dan *Western blot* menunjukkan, bahwa protein Cry2Ae hanya terdegradasi sebagian, namun kehilangan seluruh immunoreaktivitasnya setelah pemanasan selama 30 menit pada suhu 90°C, dan

kehilangan aktivitas insektisidalnya setelah pemanasan selama 240 menit pada suhu 90°C (Rouquié, 2008c; Van der Klis *et al.*, 2008).

Analisis efek pemanasan terhadap aktivitas enzimatis protein PAT yang diproduksi oleh *E. coli* menunjukkan, bahwa aktivitas enzimatis protein PAT tidak berubah setelah pemanasan selama 30 menit pada suhu 25°C maupun 37°C, namun protein PAT kehilangan seluruh aktivitas enzimatisnya setelah pemanasan selama 30 menit pada suhu 55°C atau lebih (Serrano, 2016).

Berdasarkan pengkajian alergenitas yang meliputi analisis bioinformatika, konsentrasi protein, maupun analisis stabilitas cerna dan stabilitas panas protein, dapat disimpulkan bahwa protein Cry2Ae dan PAT tidak menunjukkan adanya potensi menimbulkan alergi.

III.3 Toksisitas

Pengkajian toksisitas terhadap protein Cry2Ae dan PAT yang diekspresikan pada kapas PRG *event* GHB119 dilakukan melalui analisis bioinformatika dan toksisitas oral akut yang dilakukan di laboratorium yang menerapkan GLP.

III.3.1 Analisis Bioinformatika

Analisis kemiripan sekuen protein Cry2Ae dan PAT dengan sekuen protein toksin dilakukan dengan perangkat FASTA dan BLOSUM50 menggunakan database sekuen protein yang terdapat dalam *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) Entrez® Protein Database yang mengandung sekuen asam amino dari *GenBank CDS translations*, *UniProtKB/Swiss-Prot*, *Protein Data Bank* (PDB), *Protein Information Resource* (PIR) dan *Protein Research Foundation/Protein Sequence Database* (PRF/SEQDB), serta Bayer BCS 2014 dan 2017 *Toxin Database*. Hasil analisis menunjukkan bahwa tidak terdapat kemiripan sekuen asam amino protein Cry2Ae dan PAT dengan sekuen asam amino protein toksin dalam database yang digunakan (Pecoraro-Mercier, 2014; Capt, 2017).

III.3.2 Toksisitas Akut Protein PAT

Pengujian toksisitas akut telah dilakukan terhadap protein PAT dan telah dilaporkan. Protein PAT yang dihasilkan oleh tanaman kapas PRG *event* GHB119 sangat sedikit, sehingga untuk keperluan pengujian toksisitas akut digunakan protein yang diproduksi pada bakteri *E. coli*. Kesetaraan protein PAT yang diproduksi oleh bakteri *E. coli* dengan protein yang diekspresikan di dalam tanaman kapas PRG *event* GHB119 diuji dengan menggunakan metode SDS-PAGE, uji immunoreaktivitas dengan *Western blot*, analisis sekuen N-terminal, dan aktivitas enzimatis. Hasil analisis menunjukkan bahwa protein PAT yang dihasilkan oleh bakteri *E. coli* ekuivalen dengan protein PAT yang dihasilkan oleh kapas PRG *event* GHB119 (Blanck, 2014; Martone, 2008b).

Bahan yang diuji berupa protein PAT (*batch number* 1342_PATbar, dengan kemurnian sebesar 98%), yang disuspensikan dalam larutan penyangga fosfat pH 7,3 yang mengandung 0,5% Tween 20, yang juga digunakan sebagai kontrol. Pengujian dilakukan dengan menggunakan mencit strain C57BL/6J jantan dan betina masing-masing 20 ekor berumur sekitar 8 minggu, dengan berat badan masing-masing sekitar 17,4 - 19,6 g (jantan) dan 13,7 - 15,7 g (betina), yang diperoleh dari Charles River Laboratories, Saint Germain sur l'Arbresle, Perancis.

Semua mencit diaklimatisasi selama 6 hari sebelum digunakan dalam pengujian, untuk menyesuaikan pada kondisi laboratorium. Mencit dibagi menjadi dua kelompok (kelompok kontrol dan kelompok perlakuan), yang masing-masing terdiri dari 10 ekor jantan dan 10 ekor betina. Mencit dipelihara secara individual di dalam kandang selama aklimatisasi dan pengujian berlangsung. Kandang ditempatkan dalam ruangan dengan suhu 20 – 24°C dan kelembaban relatif 40 – 70%, dengan pencahayaan 12 jam gelap dan 12 jam terang. Pakan yang diberikan secara *ad libitum* berupa *certified rodent pelleted and irradiated diet* A04C-10, yang diperoleh dari SAFE (*Scientific Animals Food and Engineering*), Augy, Perancis dan air minum diberikan secara *ad libitum*.

Pengujian toksisitas akut protein PAT/bar sebagai dosis tunggal dilakukan dengan cara cekokan yang dilakukan pada hari pertama perlakuan, diikuti dengan periode observasi selama 14 hari. Pemberian bahan uji dilakukan dengan menggunakan sonde lambung. Disain percobaan yang digunakan adalah sebagai berikut: kelompok 1 diberi cekokan larutan penyangga fosfat pH 7,3 yang mengandung 0,5% Tween 20 sebagai kontrol, dan kelompok 2 diberi cekokan suspensi protein PAT dengan dosis 2000 mg/kg BB. Volume suspensi protein PAT maupun larutan penyangga fosfat yang diberikan adalah 20 ml/kg BB. Pemberian protein PAT dilakukan dua kali (masing-masing setengah dosis) dengan selang waktu 3 jam.

Pengamatan klinis dilakukan setiap hari selama pengujian berlangsung. Penimbangan berat badan dilakukan pada satu hari sebelum pemberian bahan uji dan kemudian dilakukan setiap minggu, dan penimbangan terakhir dilakukan sebelum mencit di-eutanasia. Konsumsi pakan dihitung setiap minggu. Pada hari terakhir pengujian (hari ke-15) semua mencit di-eutanasia dengan isofluran, kemudian dilakukan pembedahan (*necropsy*) dan pemeriksaan anatomi makroskopis terhadap rongga perut dan rongga dada, serta organ dan jaringan vital.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa: (1) selama pengujian berlangsung tidak terdapat mencit yang mati maupun sakit, (2) tidak terdapat perbedaan antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol dalam hal berat badan, pertambahan berat badan, konsumsi pakan dan kondisi organ dalam, dan (3) tidak ditemukan adanya tanda-tanda kelainan klinis pada mencit akibat pemberian bahan uji.

Dari hasil pengujian toksisitas akut diketahui bahwa tidak terdapat efek toksik pada mencit akibat pemberian protein PAT sampai dosis 2000 mg/kg BB.

III.3.3 Toksisitas Akut Protein Cry2Ae

Pengujian toksisitas akut telah dilakukan terhadap protein Cry2Ae dan telah dilaporkan. Protein Cry2Ae yang dihasilkan oleh tanaman kapas PRG *event* GHB119 sangat sedikit, sehingga untuk keperluan pengujian toksisitas akut digunakan protein yang diproduksi pada bakteri *E. coli*. Kesetaraan protein Cry2Ae yang diproduksi oleh bakteri *E. coli* dengan protein yang diekspresikan di dalam tanaman kapas PRG *event* GHB119 diuji dengan menggunakan metode SDS-PAGE, uji immunoreaktivitas dengan *Western blot*, analisis sekuen N-terminal, dan analisis aktivitas insektisidal. Hasil analisis menunjukkan bahwa protein Cry2Ae yang dihasilkan oleh bakteri *E. coli* ekuivalen dengan protein Cry2Ae yang dihasilkan oleh kapas PRG *event* GHB119 (Totis, 2015; Martone, 2008b).

Bahan yang diuji berupa protein Cry2Ae (*batch number* 1410_Cry2Ae). Bahan uji dalam bentuk terliofilisasi dengan kemurnian sebesar 90%. Bahan uji tersebut mengandung 0,067% trehalose/mg protein yang ditambahkan sebelum bahan dikeringbekukan (*freeze dry*). Bahan uji disuspensikan dalam larutan penyangga yang berisi Na₂CO₃ 30 mM pH 9,6, L- Cysteine 100 µM. Pengujian toksisitas menggunakan mencit strain C57BL/6J, jantan dan betina yang diperoleh dari Charles River Laboratories, Saint Germain sur l'Arbresle, Perancis.

Semua mencit diaklimatisasi selama 8 hari sebelum digunakan dalam pengujian, untuk menyesuaikan pada kondisi laboratorium. Mencit dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Masing-masing kelompok berisi 6 ekor jantan dan 6 ekor betina, dengan berat badan 16,2-19,8 g (jantan) dan 14,0-18,6 g (betina), dengan umur 8 minggu. Mencit dipelihara secara individual di dalam kandang. Kandang ditempatkan dalam ruangan dengan suhu 20 – 24°C, kelembaban relatif 40 – 70%, pencahayaan 12 jam gelap dan 12 jam terang, dan ventilasi udara yang cukup. Pakan berupa *certified rodent pelleted and irradiated diet* A04C-10, yang diperoleh dari SAFE (*Scientific Animals Food and Engineering, Augy*, Perancis), dan air minum yang diberikan secara *ad libitum*.

Pengujian toksisitas akut protein Cry2Ae sebagai dosis tunggal dilakukan dengan cara cekokan yang dilakukan pada hari pertama perlakuan setelah terlebih dahulu dipuaskan semalam, diikuti dengan periode observasi selama 14 hari. Kelompok perlakuan diberi cekokan suspensi protein dengan dosis 2000 mg/kg BB. Volume suspensi protein Cry2Ae maupun larutan penyangga yang diberikan adalah 20 ml/kg BB. Pemberian bahan uji dilakukan dengan menggunakan sonde lambung. Karena keterbatasan volume lambung, maka pemberian suspensi protein Cry2Ae dibagi dalam dua waktu masing-masing setengah dosis dengan selang waktu pemberian 3 jam. Sedangkan untuk kelompok kontrol dicekok dengan larutan penyangga yang berisi Na₂CO₃ 30 mM pH 9,6, trehalose 3,35%, L- sistein 100 µM.

Hal ini dikarenakan di dalam bahan uji mengandung 0,067% trehalosa/mg protein, atau setara dengan 3,35% pada konsentrasi akhir 50 mg/mL.

Pengamatan klinis dilakukan setiap hari selama pengujian berlangsung. Penimbangan berat badan dan sisa pakan dilakukan setiap minggu. Penimbangan berat badan terakhir dilakukan pada hari terakhir pengujian setelah dipuaskan semalam, dan sebelum dilakukan pembedahan. Pada hari terakhir pengujian (hari ke-15) semua mencit di-eutanasia, kemudian dilakukan pembedahan (*necropsy*) dan pemeriksaan anatomi makroskopis terhadap rongga dada dan rongga perut, serta organ dan jaringan vital.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa: (1) selama pengujian berlangsung tidak terdapat tanda-tanda klinis akibat perlakuan (2) tidak ada mencit yang mati, (3) tidak terdapat perbedaan antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol dalam hal berat badan dan jumlah konsumsi pakan, dan (4) tidak ditemukan adanya kelainan anatomi makroskopis.

Dari hasil pengujian toksisitas akut tidak terdapat efek toksik pada mencit akibat pemberian protein Cry2Ae hingga dosis 2000 mg/kg BB.

IV. Kesimpulan

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

1. Kapas PRG *event* GHB119 mengandung dua gen sisipan yaitu gen *cry2Ae* dan gen *bar*, tidak mengandung sekuen *backbone* dari plasmid transformasi pTEM12, T-DNA dalam Kapas PRG *event* GHB119 stabil sampai tiga generasi yaitu F1, BC1F1 dan BC2F1, dan diwariskan mengikuti hukum Mendel;
2. Kapas PRG *event* GHB119 sepadan secara substansial dengan kapas non PRG; tidak berpotensi menimbulkan alergi; dan termasuk ke dalam bahan yang tidak toksik;
3. TTKH menilai bahwa kapas PRG *event* GHB119 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 kapas PRG *event* GHB119 perlu dikaji ulang;
5. Apabila setelah ditetapkan aman pangan, kemudian kapas PRG *event* GHB119 tersebut terbukti menimbulkan dampak negatif terhadap kesehatan manusia maka pemohon wajib melakukan tindakan pengendalian dan penanggulangan, serta menarik kapas PRG *event* GHB119 dari peredaran;
6. Kapas PRG *event* GHB119 tidak boleh digunakan sebagai pakan sampai memperoleh sertifikat aman pakan; dan
7. Kapas PRG *event* GHB119 tidak boleh dibudidayakan sampai ditetapkan aman lingkungan.

V. Daftar Acuan

Blanck M, 2014. *PAT/bar Protein: Acute Toxicity by Oral Gavage in Mice*. Study Number: SA 13239, Study Report Number: SA 13239, Test Facility: Bayer S.A.S., Bayer CropScience 355, rue Dostoïevski CS 90153, Valbonne 06906, Sophia Antipolis Cedex, France.

Capt, A. 2017. *PAT/bar protein: Amino acid sequence homology search with known allergens and known toxins*. Study Report No. TXTPS002. Bayer SAS Crop Science Division, 355 rue Dostoïevski CS 90153, Valbonne 06906 Sophia Antipolis Cedex, France. *Report Completed on April 11, 2017*.

Criel, I. 2008. *Description of the GHB119 transformation methodology*. 7 pages. M-311228-01-1.

Currier, T.C. 2008. *Protein Expression Analysis of Cotton Event GHB119, Expressing Cry2Ae and Pat/bar proteins, USA, 2007*. Study Report No. CY07B005-2. Bayer CropScience, 2 T. W. Alexander Drive Research Triangle Park, NC 27709, USA. *Report Completed on November 20, 2008*.

De Almeida, E.R.P., Gosselé V., Muller, C.G., Dockx, J., Reynaerts, A., Botterman, J., Krebbers, E., Timko, M.P. 1989. Transgenic expression of two marker genes under the control of an *Arabidopsis* rbcS promoter: sequence encoding the Rubisco transit peptide increase expression levels. *Molecular and General Genetics*, 218, 78 – 86.

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

Habex, V. 2011. *Detailed insert characterization of Gossypium hirsutum transformation event GHB119 by Southern blot analysis*. M-308404-03-1.

Harpster, M.H., Townsend, J.A., Jones, J.D.G., Bedbrook, J., Dunsmuir, P. 1988. Relative strenghts of the 35S Cauliflower Mosaic Virus, 1', 2' and nopaline synthase promoters in transforme d tobacco, sugarbeet and oilseed rape callus tissue. *Molecular and General Genetics*, 212,182 -190.

Lecleir, M. 2007. *Description of vector pTEM12*. 9 pages. M-252212-02-1

Martone, A. 2008a. *Analyses of Raw Agricultural Commodity (Fuzzy Seed) of Cry2Ae Cotton Event GHB119 for PAT/bar and Cry2Ae and its Non-Transgenic Counterpart for PAT/bar and Cry2Ae Proteins*. Study Report No. CY07B001. Bayer CropScience-BioAnalytics. 2T. W. Alexander Drive, Research Triangle Park, NC 27709, USA. *Report Completed on February 21, 2008*.

Martone, A. 2008b. *Structural and Functional Equivalence of Cry2Ae and PAT/bar Proteins Produced in Bacillus thuringiensis (Bt) and Escherichia coli to Cry2Ae and PAT/bar Proteins in GHB119 Cotton, Gossypium hirsutum, USA 2007*. Study Report No. CY07B002. Bayer CropScience-BioAnalytics. 2T. W. Alexander Drive, Research Triangle Park, NC 27709, USA. *Report Completed on February 21, 2008*.

Moens, S. 2008. *Confirmation of the absence of vector backbone sequences in Gossypium hirsutum transformation event GHB119*. M-311127-02-1.

Oberdörfer, R. 2011. *Nutritional Impact Assessment Report for the Insect-resistant Cotton (Transformation Event GHB119)*. Study Report No. 09 B 011. Bayer CropScience AG, BioAnalytics, 65926 Frankfurt, Germany. *Report Completed on February 21, 2011*.

- Odell, J.T., Nagy, F. and Chua, N.-H. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter. *Nature* 313:810-812.
- Pecoraro-Mercier, C. 2014. Cry2Ae protein Amino acid sequence homology search with known allergens and known toxins. Study Report No. TXWYT013. Bayer SAS Crop Science Division 355, rue Dostoïevski CS 90153, Valbonne 06906 Sophia Antipolis Cedex, France. *Report Completed on July 30, 2014.*
- Rasclé, J. B. 2009a. *PAT/bar protein: in vitro digestibility study in human simulated gastric fluid.* Study Report No. SA 09045. Bayer SAS Crop Science Division, 355 rue Dostoïevski CS 90153, Valbonne 06906 Sophia Antipolis Cedex, France. *Report Completed on June 5, 2009.*
- Rasclé, J. B. 2009b. *PAT/bar protein: in vitro digestibility study in human simulated intestinal fluid.* Study Report No. SA 09046. Bayer SAS Crop Science Division, 355 rue Dostoïevski CS 90153, Valbonne 06906 Sophia Antipolis Cedex, France. *Report Completed on June 12, 2009; amended on June 28, 2016.*
- Rouquié, D. 2008a. *Cry2Ae Protein In Vitro Digestibility Study in Human Simulated Gastric Fluid.* Study Report No. SA 08126. Bayer SAS Crop Science Division 355, rue Dostoïevski CS 90153, Valbonne 06906 Sophia Antipolis Cedex, France. *Report Completed on October 9, 2008.*
- Rouquié, D. 2008b. *Cry2Ae Protein In Vitro Digestibility Study in Simulated Intestinal Fluid.* Study Report No. SA 08127. Bayer SAS Crop Science Division 355, rue Dostoïevski CS 90153, Valbonne 06906 Sophia Antipolis Cedex, France. *Report Completed October 9, 2008.*
- Rouquié, D. 2008c. *Cry2Ae Protein: Heat Stability Study.* Study Report No. SA 08128. Bayer SAS Crop Science Division 355, rue Dostoïevski CS 90153, Valbonne 06906 Sophia Antipolis Cedex, France. *Report Completed on October 9, 2008.*
- Sanfaçon H., Brodmann P., Hohn T. 1989. Adissection of the Cauliflower Mosaic Virus polyadenylation signal. *Genes and Development*, 5,141-149.
- Serrano, H. 2016. *The effect of temperature on PAT/bar as assessed by the PAT quantitative activity assay.* Study Report No. 16-RSTPS004. Bayer Crop Science LP, Seed & Trait Safety, 407 Davis Drive, Morrisville, NC USA 27560. *Report Completed on May 16, 2016.*
- Thompson, C.J., Movva Rao, N., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J., Lauwereys, M. and Botterham, J. 1987. Characterisation of the herbicide resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO* 6:2519-2523.
- Totis, M. 2015. *Cry2Ae protein - Acute toxicity study by oral gavage in mice.* M-508050-01-1.
- Van der Klis, R.-J., De Pestel, K., Van Rie, J., Hendrickx, K. 2008. Cry2Ae Description and Characterization. Study Report No. BIOX-004_ProtDescript_065. Bayer BioScience N.V., BioAnalytics, Technologiepark 38, B-9052 Gent, Belgium. *Report Completed on October 28, 2008.*
- Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R. A., Schell, J. 1974. *Large plasmid in Agrobacterium tumefaciens essential for crown gall-inducing ability.* M-147632-01-1.

Verdaguer, B., De Kochko, A., Beachy, R. N., Fauquet, C. 1996. Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promotor. *Plant Molecular Biology*, 31, 1129 - 1139.

Verhaeghe, S., and Criel, I. 2008. *Structural stability analysis of Gossypium hirsutum transformation event GHB119 in different generations, in different backgrounds and when grown in different environments*. M-311131-01-1.