

Lampiran 1.

Ringkasan Hasil Pengkajian Keamanan Pangan Kapas PRG Event GHB811

I. Pendahuluan

Kapas (*Gossypium sp*) PRG event GHB811 merupakan kapas produk rekayasa genetik dari PT. BASF Indonesia, yang mengandung dua gen sisipan, yaitu gen *hppdPfw336-1Pa* dan gen *2mepsps*. Gen *hppdPfw336-1Pa* menyandi protein HPPD W336 (4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase) yang memberikan sifat ketahanan terhadap herbisida isoksaf lutol, sedangkan gen *2mepsps* menyandi protein 2mEPSPS (5-enolpyruvylshikimate 3-fosfat sintase) yang memberikan sifat ketahanan terhadap herbisida glifosat. Oleh karena itu, kapas PRG event GHB811 mempunyai sifat ketahanan terhadap herbisida glifosat dan isoksaf lutol.

Kapas PRG event GHB811 telah memperoleh sertifikat aman pangan di 10 (sepuluh) negara yaitu Australia (2018), Selandia Baru (2018), Kanada (2018), Jepang (2018), Korea (2018), Amerika Serikat (2018), Argentina (2019), Paraguay (2019), Taiwan (2019), dan Kolombia (2020). Kapas PRG event GHB811 juga telah memperoleh sertifikat aman pakan di 9 (sembilan) negara Argentina (2018), Australia (2018), Selandia Baru (2018), Kanada (2018), Jepang (2018), Amerika Serikat (2018), Korea (2019), Paraguay (2019), dan Taiwan (2019). Kapas PRG event GHB811 telah memperoleh sertifikat aman lingkungan di 4 negara yaitu Amerika Serikat (2018), Argentina (2019), Brazil (2019) dan Paraguay (2019).

Pengkajian keamanan pangan kapas PRG event GHB811 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-78/KKH PRG/07/2020 Tanggal 22 Juli 2020 Perihal Penugasan Pengkajian Keamanan Pangan Produk Rekayasa Genetik (PRG) Komoditas Kapas Event GHB811. TTKH PRG Bidang Keamanan Pangan telah melakukan pengkajian keamanan pangan kapas PRG event GHB811 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 GHB811 mengandung dua gen sisipan, yaitu gen *hppdPfw336-1Pa* dan gen *2mepsps*. Gen *hppdPfw336-1Pa* diregulasi oleh promotor Pcsvmv dan terminator ThistonAt. Gen *hppdPfw336-1Pa* menyandi protein HPPD W336 (4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase) yang bertanggungjawab dalam toleransi terhadap herbisida isoksaf lutol. Elemen genetik dari kaset gen *hppdPfw336-1Pa* adalah sebagai berikut:

- Gen *hppdPfw336-1Pa* yang mengekspresikan protein HPPD W336
- Promoter *Cassava Vein Mosaic Virus* (Pcsvmv)
- Terminator ThistonAt dari gen histone H4

- TPotpY-1Pa berupa gen penyandi sekuen peptida transit dari gen RuBisCO

Gen *2mepsps* diregulasi oleh promotor *Ph4a748At* dan terminator 3'histonAt. Gen *2mepsps* menyandi protein 2mEPSPS (*5-enolpyruvylshikimate 3-fosfat sintase*) yang bertanggungjawab dalam toleransi terhadap herbisida glifosat. Elemen genetik kaset gen *2mepsps* adalah sebagai berikut:

- Gen *2mepsps* yang mengekspresikan protein 2mEPSPS,
- Promotor Ph4a748 dari gen penyandi histone,
- Terminator ThistonAt dari gen penyandi histone,
- TPotpC gen penyandi sekuen peptida transit dari sekuen gen RuBisCO sub unit kecil,
- Intron1 h3At yaitu intron pertama dari gen II dari histone H3 untuk meningkatkan ekspresi transgen

(Dreesen, 2015a).

II.2 Sumber Gen Sisipan

Sumber gen sisipan kapas PRG *event* GHB811, yaitu gen *hppdPfw336-1Pa* berasal dari bakteri *Pseudomonas fluorescens* strain A32 yang dimodifikasi dengan penggantian pada asam amino glisin 336 dengan triptofan, dan gen *2mepsps* yang berasal dari *Zea mays* (jagung). Promoter Pcsvmv berasal dari *Cassava Vein Mosaic Virus*, Promoter Ph4a748At serta terminator ThistonAt berasal gen histone H4 tanaman *Arabidopsis thaliana*. TPotpY-1Pa dan TPotp C berasal dari gen RuBisCO sub unit kecil dari *Zea mays* dan *Helianthus annuus* dan intron Intron1 h3At berasal dari gen histone H3 dari *A. thaliana* (Chabouté *et al.*, 1987; Chaubet *et al.*, 1992; Lebrun *et al.*, 1996; Verdaguer *et al.*, 1996; Boudec *et al.*, 2001; dan Lebrun *et al.*, 1997).

II.3 Sistem Transformasi

Kapas PRG *event* GHB811 dirakit melalui metode transformasi yang dimediasi *Agrobacterium tumefaciens* menggunakan vektor pTSIH09 yang berisi kaset ekspresi *hppdPfw336-1Pa* dan *2mepsps*. Biji kapas varietas Coker 312 dikecambahkan pada medium Murashige & Skoog (MS). Eksplan potongan hipokotil diambil dari bibit kapas dan ditransformasikan dengan vektor transformasi pTSIH09. Setelah transformasi tanaman diberi perlakuan tembotrion (herbisida penghambat HPPD). Tanaman terpilih kemudian diselfing selama beberapa generasi dan dianalisis untuk ketahanan terhadap glifosat, keberadaan gen sisipan, jumlah kopi (salinan), kestabilan integrasi, dan tidak adanya sekuen backbone (Dreesen, 2015b).

II.4 Stabilitas Genetik

Stabilitas gen sisipan pada kapas PRG *event* GHB811 dianalisis menggunakan *Southern Blot*. Analisis *Southern Blot* menunjukkan bahwa kapas PRG *event* GHB811 mengandung satu kopi tunggal T-DNA, yang terdiri dari sisipan gen *hppdPfw336-1Pa* dan *2mepsps*. T-DNA sisipan diwariskan mengikuti hukum Mendel. Hasil analisis Kapas PRG *event* GHB811 menunjukkan bahwa T-DNA stabil sampai 5 generasi yaitu: T1,

T3, T4, BC1F2, dan BC2F3. Selain itu, melalui analisis *Southern blot* ditemukan hasil yaitu tidak terdeteksi adanya sekuen dari plasmid pTSIH09 (Back, 2017; Dreesen, 2016).

Berdasarkan hasil kajian informasi genetik dapat disimpulkan bahwa:

1. Kapas PRG *event* GHB811 mengandung satu kopi tunggal T-DNA, yang terdiri dari sisipan gen *hppdPfw336-1Pa* dan *2mepsps*.
2. Kapas PRG *event* GHB811 tidak mengandung sekuen *backbone* dari plasmid transformasi pTSIH09; dan
3. Gen sisipan yaitu *hppdPfw336-1Pa* dan *2mepsps* dalam kapas PRG *event* GHB811 stabil sampai 5 (lima) generasi yaitu: T1, T3, T4, BC1F2, dan BC2F3, serta diwariskan mengikuti hukum Mendel.

III. Informasi Keamanan Pangan

III.1. Kesepadanan Substansial

Pengkajian kesepadanan substansial dari kapas PRG *event* GHB811 dilakukan dengan menggunakan biji kapas PRG *event* GHB811 dan biji kapas non PRG sebagai kontrol. Kapas ditanam dalam rancangan *randomized complete block* pada tahun 2015 di 8 (delapan) lokasi berbeda di Amerika Serikat, yaitu di: (1) Kerman, California, (2) Chula, Georgia, (3) Cheneyville, Louisiana, (4) Greenville, Michigan, (5) Elko, South California, (6) Wall, Texas, (7) Hertford, North Carolina, dan (8) Edmonson, Texas. Sebagian tanaman diberi perlakuan herbisida glifosat (Gotulla *et al.*, 2016).

Setelah dipanen biji kapas dikirim ke laboratorium EPL Bio Analytical Services (EPL BAS), Niantic, Illinois, Amerika Serikat yang sudah menerapkan *good laboratory practices* (GLP) untuk dianalisis komposisinya. Biji kapas dianalisis komposisinya termasuk kadar air, protein, lemak, abu, dan karbohidrat (dihitung *by-difference*), serat (ADF (*acid detergent fiber*) dan NDF (*neutral detergent fiber*), dan TDF (*total dietary fiber*)), mineral (kalium, kalsium, natrium, magnesium, mangan, besi, tembaga, seng, dan fosfor), vitamin (α -tokoferol), 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 (miristat, palmitat, palmitoleat, heptadekanoat, heptadekenoat, stearat, oleat, linoleat, linolenat, arakhidat, eikosenoat, behenat, dan lignoserat), zat antigizi (gosipol), dan metabolit sekunder lainnya (asam dihidrosterkulat, asam sterkulat, dan asam malvalat). Hasil analisis komposisi biji kapas menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata di antara biji kapas PRG *event* GHB811 dengan biji kapas 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* GHB811 sepadan secara substansial dengan biji kapas non-PRG.

III.2 Alergenisitas

Pengkajian alergenitas terhadap protein 2mEPSPS dan HPPD W336 yang diekspresikan pada kapas PRG *event* GHB811 dilakukan melalui analisis bioinformatika, analisis konsentrasi protein, dan pengujian stabilitas protein yang meliputi stabilitas cerna dan stabilitas panas. Pengujian alergenitas dilakukan di laboratorium yang telah menerapkan GLP.

III.2.1 Analisis Bioinformatika

Evaluasi kemiripan sekuen protein 2mEPSPS dan HPPD W336 dengan protein alergen dilakukan dengan menggunakan database protein alergen COMPARE (*COMprehensive Protein Allergen Resource*, www.comparedatabase.org) versi 2018 dengan perangkat FASTA, serta pencarian kesamaan sekuen delapan atau lebih asam amino dengan sekuen protein dalam database dengan menggunakan SeqMatchAll dari EMBOSS (*European Molecular Biology Open Software Suite*) (Posada, 2018a; 2018b).

Hasil analisis menunjukkan tidak ada kemiripan sekuen asam amino yang relevan secara biologis (35% atau lebih kesamaan asam amino di dalam peptida yang mengandung 80 asam amino) antara protein 2mEPSPS dan HPPD W336 dengan sekuen asam amino protein alergen. Selain itu, tidak ada kesamaan sekuen delapan asam amino atau lebih pada protein 2mEPSPS dan HPPD W336 dengan sekuen asam amino protein alergen dalam database (Posada, 2018a; 2018b).

III.2.2 Analisis Konsentrasi Protein

Konsentrasi protein 2mEPSPS dan HPPD W336 pada jaringan kapas PRG *event* GHB811 ditentukan menggunakan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Konsentrasi protein 2mEPSPS dan HPPD W336 di dalam biji kapas PRG *event* GHB811 masing-masing ditemukan sebesar 150,88 µg/g berat kering dan 27,01 µg/g berat kering (Wu *et al.*, 2017).

Berdasarkan kandungan protein total dalam biji kapas PRG *event* GHB811, protein 2mEPSPS dan HPPD W336 hanya merupakan sebagian kecil, masing-masing sebesar 0,068% dan 0,012% dari jumlah total protein dalam biji kapas PRG *event* GHB811 (Gottula *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2017)

III.2.3 Analisis Stabilitas Protein

Protein 2mEPSPS dan HPPD W336 dihasilkan dalam jumlah yang sedikit oleh tanaman kapas PRG *event* GHB811, sehingga untuk keperluan pengujian stabilitas protein digunakan protein yang diproduksi pada bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*). Kesetaraan protein 2mEPSPS dan HPPD W336 yang diproduksi pada bakteri *E. coli* dengan protein 2mEPSPS dan HPPD W336 yang diekspresikan di dalam tanaman kapas PRG *event* GHB811 diuji dengan menggunakan metode SDS-PAGE, *Western blot*, analisis sekuen N-terminal, analisis glikosilasi, analisis pemetaan peptida dengan UPLC-UV-Mass Spectrometry dan analisis aktivitas enzimatis protein 2mEPSPS. Hasil analisis menunjukkan protein 2mEPSPS dan HPPD W336 yang diproduksi pada bakteri *E. coli* ekuivalen dengan protein 2mEPSPS dan HPPD W336 yang dihasilkan oleh kapas PRG *event* GHB811 (Dreesen, 2016a; 2016b).

III.2.3.1 Analisis Stabilitas Cerna Protein

Analisis stabilitas cerna protein 2mEPSPS dan HPPD W336 dilakukan melalui uji pencernaan menggunakan simulasi cairan lambung (*Simulated Gastric Fluid* – SGF) dan simulasi cairan usus (*Simulated Intestinal Fluid* – SIF) selama 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 30 detik dalam SGF dengan menggunakan pepsin pada pH 1,2, tidak terdeteksi adanya pita protein 2mEPSPS dan HPPD W336 maupun fragmen-fragmennya. Demikian pula setelah inkubasi selama 30 detik dalam SIF dengan menggunakan pankreatin pada pH 7,5, tidak terdeteksi adanya pita protein 2mEPSPS dan HPPD W336 maupun fragmen-fragmennya yang menunjukkan bahwa protein 2mEPSPS dan HPPD W336 maupun fragmen-fragmennya dapat terhidrolisis sempurna (Rasclé, 2009a; 2009b; Rouquie, 2011a; 2011b).

III.2.3.2 Analisis Stabilitas Panas Protein

Analisis pengaruh pemanasan terhadap stabilitas protein 2mEPSPS dan HPPD W336 yang diproduksi oleh *E. coli* dilakukan melalui evaluasi dengan SDS-PAGE dan *Western blot* serta melalui pengujian aktivitas enzimatis (Rasclé, 2009c; Serrano, 2015; Van der Klis *et al.*, 2006; Habex, 2011).

Hasil evaluasi menunjukkan bahwa setelah pemanasan pada suhu 90°C selama 60 menit, pita protein 2mEPSPS maupun HPPD W336 tetap terdeteksi, yang menunjukkan bahwa protein 2mEPSPS dan HPPD W336 tidak terdegradasi atau tidak terjadi perubahan migrasi protein pada SDS-PAGE. Namun demikian, pengujian aktivitas enzimatis menunjukkan bahwa aktivitas enzimatis dari protein 2mEPSPS tidak terdeteksi setelah pemanasan selama 10 menit pada suhu 60°C atau lebih, sedangkan protein HPPD W336 kehilangan aktivitas enzimatisnya setelah pemanasan selama 2,5 menit pada suhu 60°C atau lebih (Rasclé, 2009c; Serrano, 2015; Van der Klis *et al.*, 2006; Habex, 2011).

Berdasarkan pengkajian alergenitas yang meliputi analisis bioinformatika, analisis konsentrasi protein, maupun analisis stabilitas cerna dan stabilitas panas protein, dapat disimpulkan bahwa protein 2mEPSPS dan HPPD W336 tidak menunjukkan adanya potensi menimbulkan alergi.

III.3 Toksisitas

Pengkajian toksisitas dilakukan terhadap protein 2mEPSPS dan HPPD W336 yang diekspresikan pada kapas PRG *event* GHB811 dilakukan melalui analisis bioinformatika dan toksisitas akut yang dilakukan di laboratorium yang menerapkan GLP.

III.3.1 Analisis Bioinformatika

Analisis kemiripan sekuen protein 2mEPSPS dan HPPD W336 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 2018 *Internal Toxin Database*. Hasil analisis menunjukkan tidak terdapat kemiripan sekuen asam amino antara protein 2mEPSPS dan HPPD W336 dengan sekuen asam amino protein toksin dalam kedua database yang digunakan (Posada, 2018a; 2108b).

III.3.2 Toksisitas Akut Protein 2mEPSPS

Pengujian toksisitas akut telah dilakukan pada Protein 2mEPSPS dan hasilnya telah dilaporkan. Protein 2mEPSPS yang dihasilkan oleh tanaman kapas PRG *event* GHB811 sangat sedikit, sehingga untuk keperluan pengujian stabilitas protein digunakan protein yang diproduksi pada bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*). Kesetaraan protein 2mEPSPS dan HPPD W336 yang diproduksi pada bakteri *E. coli* dengan protein 2mEPSPS dan HPPD W336 yang diekspresikan di dalam tanaman kapas PRG *event* GHB811 diuji dengan menggunakan metode SDS-PAGE, *Western blot*, analisis sekuen N-terminal, analisis glikosilasi, analisis pemetaan peptida dengan UPLC-UV-Mass Spectrometry dan analisis aktivitas enzimatis protein 2mEPSPS, menunjukkan protein 2mEPSPS yang dihasilkan oleh bakteri *E. coli* ekuivalen dengan protein 2mEPSPS yang dihasilkan oleh kapas PRG *event* GHB811 (Garcin, 2014; Dreesen, 2016a).

Bahan yang diuji adalah protein 2mEPSPS dengan kemurnian sebesar 95% (b/b) dan sebagai kontrol digunakan larutan penyangga yang berisi 50 mM tris-HCl, 100 mM NaCl, 2.4% trehalosa; pH 7.4, hal ini dikarenakan di dalam bahan uji mengandung sejumlah kecil trehalosa. Volume suspensi protein 2mEPSPS maupun larutan penyangga yang diberikan adalah 20 ml/kg BB. Toksisitas akut protein 2mEPSPS (kemurnian lebih besar dari 95% (b/b)) diuji dengan cara cekokan tunggal. Dalam pengujian ini digunakan mencit jantan dan betina strain C57BL/6J, berumur 8 minggu dengan berat badan 17.8-19.9 g (jantan) dan 14.7-16.1 g (betina) pada awal pengujian, yang berasal dari Charles River Laboratories, Saint Germain sur l'Arbresle, France. Setiap kelompok terdiri dari 6 ekor jantan dan 6 ekor betina.

Semua mencit diaklimatisasi selama 6 hari, dan dipelihara secara individual di dalam kandang baja tahan karat model gantung (*suspended, wire-mesh cages*) yang ditempatkan dalam ruangan dengan suhu 20 – 24°C, kelembaban relatif 40 – 70%, dan pencahayaan 12 jam gelap dan 12 jam terang. Pakan berupa *certified rodent pelleted and irradiated diet* A04C-10, yang diperoleh dari SAFE (*Scientific Animals Food and Engineering*), Augy, France dan air minum diberikan secara *ad libitum*.

Pengujian toksisitas akut protein 2mEPSPS sebagai dosis tunggal dilakukan dengan cara cekokan tunggal yang dilakukan pada hari pertama pengujian, diikuti dengan pengamatan selama 14 hari. Desain percobaan yang digunakan adalah sebagai berikut: kelompok kontrol diberi cekokan larutan penyangga yang berisi 50 mM tris-HCl, 100 mM NaCl, 2.4% trehalose; pH 7.4 dan kelompok perlakuan diberi cekokan suspensi protein 2mEPSPS dengan dosis 2000 mg/kg BB setelah terlebih dahulu dipuasakan semalam.

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

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

Berdasarkan pengkajian toksisitas akut dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat efek toksik pada mencit akibat pemberian protein 2mEPSPS sampai dosis 2000 mg/kg BB.

III.3.2 Toksisitas Akut Protein HPPD W336

Pengujian toksisitas akut telah dilakukan terhadap protein HPPD W336 dan telah dilaporkan. Protein HPPD W336 yang dihasilkan oleh tanaman kapas PRG *event* GHB811 dalam jumlah sedikit, sehingga untuk keperluan pengujian stabilitas protein digunakan protein yang diproduksi pada bakteri *E. coli*. Kesetaraan protein 2mEPSPS dan HPPD W336 yang diproduksi pada bakteri *E. coli* dengan protein 2mEPSPS dan HPPD W336 yang diekspresikan di dalam tanaman kapas PRG *event* GHB811 diuji dengan menggunakan metode SDS-PAGE, *Western blot*, analisis sekuen N-terminal, analisis glikosilasi, analisis pemetaan peptida dengan UPLC-UV-Mass Spectrometry dan analisis aktivitas enzimatis protein 2mEPSPS. Hasil analisis menunjukkan protein HPPD W336 yang dihasilkan oleh bakteri *E. coli* ekuivalen dengan protein HPPD W336 yang dihasilkan oleh kapas PRG *event* GHB811 (Rascle, 2009d; Dreesen, 2016b).

Bahan yang diuji berupa protein HPPD W336 nomor *batch* VMLV968, dengan kemurnian 97±2% dan *bovine serum albumin* (BSA) dengan kemurnian 98% sebagai kontrol. Kedua bahan uji tersebut disuspensikan dalam larutan penyangga 50 mM, pH 7,5 untuk mendapatkan konsentrasi akhir suspensi sebesar 50 mg/ml.

Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan mencit betina strain CrI:OF1 sebanyak 10 ekor dengan berat badan antara 20,5 – 22,3 g dan berumur sekitar 8 minggu pada hari pertama perlakuan, yang berasal dari Charles River Laboratories, Saint Germain sur l'Arbresle, Perancis.

Semua mencit diaklimatisasi selama 14 hari sebelum digunakan dalam pengujian. Mencit dibagi secara acak menjadi dua kelompok (kelompok kontrol dan kelompok perlakuan), yang masing-masing terdiri dari 5 ekor. Mencit dipelihara secara individual di dalam kandang *stainless steel*, yang ditempatkan dalam ruangan bersuhu 20-24°C dan kelembaban relatif 40-70%, dengan pencahayaan selama 12 jam terang dan 12 jam gelap. Pakan *certified rodent pelleted and irradiated diet* A04C-10 dari S.A.F.E.

(*Scientific Animals Food and Engineering*), Augy, Perancis, diberikan secara *ad libitum*. Air minum juga diberikan secara *ad libitum*.

Pengujian toksisitas akut protein HPPD W336 sebagai dosis tunggal dilakukan dengan cara cekokan yang dilakukan pada hari pertama perlakuan, diikuti dengan periode observasi selama 15 hari. Desain percobaan yang dilakukan adalah sebagai berikut: (1) kelompok kontrol yang dicekok larutan BSA, dengan dosis 2000 mg/kg BB, dibagi dalam 2 kali pemberian dan (2) kelompok perlakuan yang dicekok suspensi HPPD W336, dengan dosis 2000 mg/kg BB (dibagi dalam dua kali pemberian berselang 4 jam).

Pengamatan klinis dilakukan setiap hari selama pengujian berlangsung. Penimbangan berat badan dilakukan setiap minggu pada periode aklimatisasi, kemudian pada hari ke-1 saat diberikan bahan uji, selanjutnya setiap minggu selama pengamatan, dan juga sebelum dibedah. Pada hari terakhir pengujian, 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) tidak ada mencit yang mati selama pengujian berlangsung, (2) tidak terdapat perbedaan nyata antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol dalam hal berat badan, kenaikan berat badan dan berat organ (otak, ginjal, limpa dan hati), (3) tidak ditemukan kelainan klinis pada mencit akibat pemberian bahan uji, dan (4) pemberian bahan uji tidak berpengaruh pada organ/jaringan secara anatomi makroskopis.

Berdasarkan pengkajian toksisitas akut dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat efek toksik pada mencit akibat pemberian protein HPPD W336 sampai dosis 2000 mg/kg BB.

Berdasarkan hasil pengkajian toksisitas yang meliputi analisis bioinformatika dan toksisitas akut, dapat disimpulkan bahwa kapas PRG *event* GHB811 termasuk kedalam bahan yang tidak toksik.

IV. Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengkajian disimpulkan hal-hal sebagai berikut:

1. Kapas PRG *event* GHB811 mengandung satu kopi (salinan) tunggal T-DNA, yang terdiri dari sisipan gen *hppdPfw336-1Pa* dan *2mepsps* yang stabil sampai 5 (lima) generasi yaitu: T1, T3, T4, BC1F2, dan BC2F3, diwariskan mengikuti hukum Mendel, dan tidak mengandung fragmen *backbone* plasmid transformasi pTSIH09;
2. Kapas PRG *event* GHB811 sepadan secara substansial dengan kapas non PRG; tidak menunjukkan adanya potensi menimbulkan alergi; dan termasuk ke dalam bahan yang tidak toksik;
3. TTKH menilai bahwa kapas PRG *event* GHB811 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* GHB811 perlu dikaji ulang;
5. Apabila setelah ditetapkan aman pangan, kemudian kapas PRG *event* GHB811 tersebut terbukti menimbulkan dampak negatif terhadap kesehatan manusia maka pemohon wajib melakukan tindakan pengendalian dan penanggulangan, serta menarik kapas PRG *event* GHB811 dari peredaran;
6. Kapas PRG *event* GHB811 tidak boleh digunakan sebagai pakan sampai memperoleh sertifikat keamanan pakan; dan
7. Kapas PRG *event* GHB811 tidak boleh dibudidayakan sampai ditetapkan aman lingkungan.

V. Daftar Acuan

- Back, P.; 2017;** *Amendment no. 1 - Detailed insert characterization and confirmation of the absence of vector backbone sequence in cotton GHB811.* Study Report NO. 14-RDTH063B. Bayer CropScience N.V. Innovation Center Seed & Trait Safety Protein and Product Characterization Technologiepark 38 B-9052 Ghent Belgium. *Report Completed on November 8, 2016.*
- Boudec, P.; et al.; 2001.** *Mutated hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, DNA sequence and isolation of plants which contain such a gene and which are tolerant to herbicides.* Journal: US Patent US6245968B1. M-229534-01
- Chabouté et al., 1987;** *Genomic organization and nucleotide sequences of two histone H3 and two histone H4 genes of Arabidopsis thaliana.* Plant Molecular Biology 8: 179-191 (1987).
- Chaubet et al., 1992;** *Genes encoding a histone H3.3-like variant in Arabidopsis contain intervening sequences;* Université Louis Pasteur, Strasbourg, France. M-229098-01-1
- Dreesen, R.; 2015a;** *Description of vector pTSIH09.* Study Report No. BIO1-234_VectDescript_398. Bayer CropScience N.V., Technologiepark 38, 9052 Zwijnaarde, Belgium. *Report Completed on October 2nd, 2015*
- Dreesen, R.; 2015b;** *Description of the GHB811 cotton transformation methodology.* Study Report No. 15-RSTHT057-A. Bayer CropScience N.V, Technologiepark 38, 9052 Ghent, Belgium. *Report Completed on December 18, 2015.*
- Dreesen, R. 2016a.** *Characterization of 2mEPSPS protein purified from GHB811 cotton and comparability with the recombinant 2mEPSPS protein batch 1417_2mEPSPS.* Study Report No. 16-RSTHN035-A. Bayer BioScience N.V. Innovation Center, Technologiepark 38, B-9052 Gent, Belgium. *Report Completed on October 14, 2016.*
- Dreesen, R. 2016b.** *Characterization of HPPD W336 protein purified from GHB811 cotton and comparability with the recombinant HPPD W336 protein batch 1411_HPPD W336.* Study Report No. 16-RSTHN035-B. Bayer BioScience N.V. Innovation Center, Technologiepark 38, B-9052 Gent, Belgium. *Report Completed on December 22, 2016.*

- Dressen, R., 2016.** *Structural stability analysis of cotton GHB811.* Study Report No. 15-RSTHT068-A. Bayer CropScience N.V. Technologiepark 38 9052 Ghent, Belgium. Report Completed on February 29, 2016.
- Garcin J.C. 2014.** *2mEPSPS Acute toxicity by oral gavage in mice.* Study Report No. SA 13321. Bayer CropScience 355, rue Dostoïevski CS 90153 Valbonne 06906 Sophia Antipolis Cedex France. Report Completed on October 17, 2014.
- Gottula, J., Gillikin, N., dan Gao, Y. 2016.** *GHB811 Cotton - Composition Assessment of GHB811 Cotton Grown in the USA during 2014 and 2015.* Study Report No. 14-RSTHT131. Bayer CropScience LP Seed & Trait Safety, 407 Davis Drive, Morrisville, NC 27560, USA. Report Completed on September 30, 2016.
- Habex, V. 2011.** *The modified 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase gene product (HPPD W336) description and characterization.* Study Report No. BIO2-026_ProtDescript_445. Bayer BioScience N.V. BioAnalytics, Technologiepark 38, B-9052 Gent, Belgium. Report Completed on January 10, 2011.
- Lebrun et al., 1996.** US Patent US5510471 (23-APRIL-1996). Rhone poulenc agrochimie (fr).
- Lebrun et al., 1997.** 5-enol pyruvylshikimate-e-phosphate synthase mutee, gene codant pour cette proteine et plantes transformees contenant ce gene. M-216526-01-1
- Posada, E.E. 2018a.** *2mEPSPS protein: Amino acid sequence homology search with known allergens and known toxins.* Study Report No. 18-TXBS0018-2. BASF Agricultural Solutions Belgium NV, Technologiepark-Zwijnaarde 38, 9052 Gent, Belgium. Report Completed on September 19, 2018.
- Posada, E.E. 2018a.** *HPPD W336 protein: Amino acid sequence homology search with known allergens and known toxins.* Study Report No. 18-TXBS0020-2. BASF Agricultural Solutions Belgium NV, Technologiepark-Zwijnaarde 38, 9052 Gent, Belgium. Report Completed on September 19, 2018.
- Rasclé, J.B. 2009a.** *HPPD W336 protein: In vitro digestibility study in human simulated gastric fluid.* Study Report No. SA 09051. Bayer SAS Crop Science Division, 355 rue Dostoïevski, Valbonne, 06903 Sophia Antipolis Cedex, France. Report Completed on September 15, 2009.
- Rasclé, J.B. 2009b.** *HPPD W336 protein: In vitro digestibility study in human simulated intestinal fluid.* Study Report No. SA 09052. Bayer SAS Crop Science Division, 355 rue Dostoïevski, Valbonne, 06903 Sophia Antipolis Cedex, France. Report Completed on September 15, 2009.
- Rasclé, J.B. 2009c.** *HPPD W336 - Heat stability study.* Study Report No. SA 09053. Bayer SAS Crop Science Division, 355 rue Dostoïevski, Valbonne, 06903 Sophia Antipolis Cedex, France. Report Completed on August 26, 2009.
- Rasclé J.B. 2009d. HPPD W336 protein Acute toxicity by oral gavage in female mice. M-358598-01-1
- Rouquié, D. 2011a.** *2mEPSPS protein: In vitro digestibility study in human simulated gastric fluid.* Study Report No. SA 10447. Bayer SAS Crop Science Division 355, rue

Dostoïevski CS 90153, Valbonne 06906 Sophia Antipolis Cedex, France. *Report Completed on April 21, 2011.*

Rouquié, D. 2011b. *2mEPSPS protein: In vitro digestibility study in human simulated intestinal fluid.* Study Report No. SA 06102. Bayer SAS Crop Science Division 355, rue Dostoïevski CS 90153, Valbonne 06906 Sophia Antipolis Cedex, France. *Report Completed on April 26, 2011.*

Serrano, H. 2015. *The effect of temperature on 2mEPSPS as assessed by SDS-PAGE and Western blot.* Study Report No. 15 RSKBS010. Bayer CropScience LP Seed & Trait Safety, 407 Davis Drive, Morrisville, NC 27560, USA. *Report Completed on October 14, 2015.*

Van der Klis, R-J., Hendrickx, K., Herouet-Guicheney, C. dan Rouan, D. 2006. *The double mutant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene product: 2mEPSPS Description and Characterisation.* Study Report No. 2006-2mEPSPS-EPC002. Bayer BioScience N.V. BioAnalytics, Technologiepark 38, B-9052 Gent, Belgium. *Report Completed on September 2006.*

Verdaguer et al., 1996. *Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter;* Plant Molecular Biology 31: 1129-1139. 1996.

Wu, A.J., Gottula, J., dan Sathischandra, S. 2017. *GHB811 Cotton - Protein Expression Analyses of Field Samples Grown in the USA during 2015.* Study Report No. 15-RSTHS002. Bayer CropScience LP Seed & Trait Safety, 407 Davis Drive, Morrisville, NC 27560, USA. *Report Completed on February 28, 2017.*