

Lampiran 1.

Ringkasan Hasil Pengkajian Keamanan Pangan Kedelai Produk Rekayasa Genetik (PRG) event DAS-81419-2

I. Pendahuluan

Kedelai PRG *event* DAS-81419-2 merupakan kedelai produk rekayasa genetik dari PT. Dow Agrosciences Indonesia yang mengandung tiga gen sisipan yaitu *cry1Fv3*, *cry1Ac(synpro)*, dan *pat*. Gen *cry1Fv3* menyandi protein Cry1Ac, gen *cry1Ac(synpro)* menyandi protein Cry1F, dan gen *pat* menyandi protein PAT, yang masing-masing memberikan ketahanan terhadap serangga hama ordo *Lepidoptera* dan toleransi terhadap herbisida amonium glufosinat.

Kedelai PRG *event* DAS-81419-2 telah memperoleh sertifikat aman pangan di empat belas (14) negara yaitu Amerika Serikat (2014), Australia (2014), Jepang (2014), Kanada (2014), Selandia Baru (2014), Meksiko (2015), Taiwan (2015), Afrika Selatan (2016), Argentina (2016), Brazil (2016), Kolombia (2016), Korea (2016), Malaysia (2017), dan Filipina (2019). Kedelai PRG *event* DAS-81419-2 juga telah memperoleh sertifikat aman pakan di dua belas (12) negara yaitu Amerika Serikat (2014), Kanada (2014), Jepang (2015), Meksiko (2015), Afrika Selatan (2016), Argentina (2016), Brazil (2016), Kolombia (2016), Korea (2016), Malaysia (2017), Taiwan (2017), dan Filipina (2019). Kedelai PRG *event* DAS-81419-2 telah memperoleh sertifikat aman lingkungan di lima (5) negara yaitu Amerika Serikat – *United States Department of Agriculture/USDA* (2014), Amerika Serikat – *U.S. Environmental Protection Agency/EPA* (2014), Kanada (2014), Argentina (2016), Brazil (2016), dan Jepang (2017).

Pengkajian keamanan pangan Kedelai PRG *event* DAS-81419-2 dilakukan berdasarkan Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 6 Tahun 2018 tentang Pengawasan Pangan Produk Rekayasa Genetik dan surat penugasan ketua Komisi Keamanan Hayati kepada Wakil Ketua Bidang Keamanan Pangan KKH PRG Nomor B-77/KKH PRG/07/2020 Tanggal 18 Juli 2020 Perihal Penugasan Pengkajian Keamanan Pangan Produk Rekayasa Genetik (PRG) Komoditas Kedelai *event* DAS-81419-2. TTKH PRG Bidang Keamanan Pangan telah melakukan pengkajian keamanan pangan Kedelai PRG *event* DAS-81419-2 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

Kedelai PRG *event* DAS-81419-2 mengandung tiga gen sisipan yaitu *cry1Fv3*, *cry1Ac(synpro)*, dan *pat*, yang masing-masing memberikan ketahanan terhadap serangga hama ordo *Lepidoptera* dan toleransi terhadap herbisida amonium glufosinat. Ketiga kaset ekspresi gen tersebut dikonstruksi dalam satu plasmid pDAB9582 pada daerah T-DNA. Gen *cry1Fv3* dikendalikan oleh promotor AtUbi10 dan terminator AtuORF23 3'UTR. Gen *cry1Ac(synpro)* dikendalikan oleh promotor CsVMV dan terminator AtuORF23 3'UTR. Sementara itu, gen *pat* dikendalikan oleh promotor

CsVMV dan terminator AtuORF1 3'UTR. Elemen genetik dari kaset gen sisipan pada Kedelai PRG *event* DAS-81419-2 secara lengkap adalah sebagai berikut:

- Gen *cry1Fv3* merupakan versi sintetik gen *cry1F* dan menyandi protein Cry1F,
- Gen *cry1Ac(synpro)* merupakan versi sintetik gen *cry1Ac* dan menyandi protein Cry1Ac,
- Gen *pat* merupakan gen yang menyandi enzim PAT (*phosphinothricin acetyltransferase*),
- Promoter AtUbi10 merupakan promoter dengan daerah 5'UTR dan intron dari gen *polyubiquitin 10* (UBQ10),
- Promoter CsVMV yang merupakan daerah 5'UTR untuk memulai proses transkripsi,
- Terminator AtuORF23 3'-UTR merupakan daerah 3'-UTR meliputi terminator transkripsi dan lokasi poliadenilasi dari *frame* pembacaan 23 (ORF23) dari plasmid pTi15955, dan
- Terminator AtuORF1 3'-UTR merupakan bagian 3'-UTR yang meliputi terminator transkripsi dan lokasi poliadenilasi *frame* pembacaan 1 (ORF1) dari plasmid pTi15955 (Bard et al., 2014).

II.2. Sumber Elemen Genetik

Sumber elemen genetik dari kaset gen sisipan pada kedelai PRG *event* DAS-81419-2 secara lengkap adalah sebagai berikut:

- Gen *cry1Fv3* berasal dari bakteri tanah *Bacillus thuringiensis subsp. aizawai* strain PS811 (Cardineau et al., 2001; Gao et al., 2006),
- Gen *cry1Ac(synpro)* berasal dari *B. thuringiensis subsp. kurstaki* strain HD73 (Adang et al., 1985; Gilroy and Wilcox, 1992; Cardineau et al., 2001),
- Gen *pat* berasal dari *Streptomyces viridochromogenes* (Wohlleben et al., 1988),
- Promoter AtUbi10 berasal dari tanaman *Arabidopsis thaliana* (Norris et al., 1993),
- Promoter CsVMV berasal dari *Cassava Vein Mosaic virus* (Verdaguer et al., 1996),
- Terminator AtuORF23 3'-UTR berasal dari plasmid pTi15955 *Agrobacterium tumefaciens* (Barker et al., 1983), dan
- Terminator AtuORF1 3'UTR berasal dari plasmid pTi15955 *A. tumefaciens* (Barker et al., 1983).

II.3. Sistem Transformasi

Kedelai PRG *event* DAS-81419-2 dirakit melalui metode transformasi yang dimediasi *A. tumefaciens*. Eksplan kotiledon tanaman kedelai kultivar Maverick diinfeksi dengan *A. tumefaciens* strain EHA101 yang membawa plasmid pDAB9582 dengan tiga kaset, yaitu gen *cry1Fv3*, *cry1Ac(synpro)*, dan *pat*. Eksplan yang digunakan dalam proses transformasi adalah kotiledon. Tunas PRG terpilih dipindahkan ke media pertumbuhan akar dan kemudian dipindahkan ke campuran tanah untuk proses aklimatisasi planlet. Planlet terpilih dipindahkan ke rumah kaca dan kemudian daun dioles dengan glufosinat untuk mengkonfirmasi tanaman PRG (Zeng et al., 2004).

II.4. Stabilitas Genetik

Analisis *Southern blot* menggunakan enzim restriksi dan probe terpilih dilakukan untuk menentukan jumlah kopi (salinan) gen sisipan pada kedelai PRG *event* DAS-81419-2. Pita hibridisasi spesifik tunggal dideteksi pada semua sampel positif dengan ukuran yang diharapkan, sedangkan pada sampel negatif tidak ditemukan. Hasil ini menunjukkan bahwa satu kopi T-DNA berhasil disisipkan pada genom kedelai PRG *event* DAS-81419-2.

Untuk memastikan bahwa tidak ada sekuen vektor plasmid *backbone* pada kedelai PRG *event* DAS-81419-2, juga dilakukan analisis ketiadaan sekuen *backbone* dengan *Southern blot*. Hasil hibridisasi menunjukkan bahwa tidak ada sinyal spesifik yang terdeteksi pada sampel kedelai PRG *event* DAS-81419-2 sedangkan fragmen hibridisasi dengan ukuran yang diharapkan terdeteksi pada kontrol positif. Hasil ini menunjukkan bahwa tidak ada sekuen *backbone* dari plasmid pDAB9582 yang tersisipkan ke dalam kedelai PRG *event* DAS-81419-2.

Analisis *Southern blot* juga dilakukan untuk melihat kestabilan gen sisipan dengan menggunakan sampel yang berasal dari kedelai PRG *event* DAS-81419-2 stabil sampai lima generasi, yaitu T1, T2, T3, T4, dan F2. Hasil menunjukkan bahwa seluruh sampel kedelai PRG *event* DAS-81419-2 stabil sampai lima generasi dan diwariskan mengikuti prinsip hukum pewarisan Mendel (Guttikonda, 2012; Guttikonda dan Richey, 2012).

Berdasarkan hasil kajian informasi genetik dapat disimpulkan bahwa:

1. Kedelai PRG *event* DAS-81419-2 mengandung satu kopi T-DNA yang berisi gen *cry1Fv3*, *cry1Ac(synpro)*, dan *pat*,
2. Kedelai PRG *event* DAS-81419-2 tidak mengandung sekuen *backbone* dari plasmid transformasi pDAB9582; dan
3. T-DNA dalam kedelai PRG *event* DAS-81419-2 stabil sampai lima generasi, yaitu T1, T2, T3, T4, dan F2 dan diwariskan mengikuti hukum genetik Mendel.

III. Informasi Keamanan Pangan

III.1. Kesepadanan Substansial

Pengkajian kesepadanan substansial dari kedelai PRG *event* DAS-81419-2 dilakukan dengan menggunakan tanaman kedelai PRG *event* DAS-81419-2 dan tanaman kedelai non PRG sebagai kontrol. Kedelai ditanam dalam rancangan *randomized complete block* pada tahun 2011 di 10 (sepuluh) daerah di Amerika Serikat, yaitu di Richland, Iowa; Atlantic, Iowa; Carlyle, Illinois; Wyoming, Illinois; Frankfort, Indiana; Fisk, Missouri; La Plata, Missouri; York, Nebraska; Brunswick, Nebraska; dan Germansville, Pennsylvania. Sebagian tanaman kedelai diberi perlakuan herbisida glufosinat.

Setelah dipanen biji kedelai dan tanaman kedelai (*forage*) dikirim ke Covance Laboratories Inc., Madison, Wisconsin, Amerika Serikat yang sudah menerapkan *good laboratory practices* (GLP) untuk dianalisis komposisinya. Analisis komposisi dilakukan terhadap biji kedelai untuk kadar proksimat (air, protein, lemak, abu, dan karbohidrat *by-difference*), ADF (*acid detergent fiber*), NDF (*neutral detergent fiber*), TDF (*total dietary fiber*), mineral (kalium, natrium, magnesium, mangan, besi, tembaga, selenium, seng, dan fosfor), vitamin (β -karoten, tiamin, riboflavin, niasin, asam pantotenat, piridoksin, asam folat, asam askorbat, α -tokoferol, β -tokoferol, δ -tokoferol, dan γ -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 (kaprilat, kaprat, laurat, miristat, miristoleat, pentadekanoat, pentadekenoat, palmitat, palmitoleat, heptadekanoat, heptadekenoat, stearat, oleat, linoleat, linolenat, γ -linolenat, arakhidat, eikosenoat, eikosadienoat, eikosatrienoat, behenat, dan lignoserat), zat antigizi (lektin, asam fitat, rafinosa, stakiosa, dan inhibitor tripsin), dan metabolit sekunder lainnya (daidzein total, genistein total, dan glisitein total). Terhadap tanaman kedelai dilakukan analisis kadar proksimat (air, protein, lemak, abu, dan karbohidrat *by-difference*), ADF, NDF, dan mineral (kalsium dan fosfor) (Fast dan Johnson, 2012).

Hasil analisis komposisi kedelai menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang nyata di antara kedelai PRG *event* DAS-81419-2 dengan kedelai kontrol non PRG, dan masuk ke dalam kisaran komposisi kedelai komersial pada umumnya.

Berdasarkan hasil pengkajian kesepadanan substansial dapat disimpulkan bahwa biji dan tanaman kedelai PRG *event* DAS-81419-2 sepadan secara substansial dengan biji dan tanaman kedelai non PRG.

III.2. Alergenisitas

Pengkajian alergenisitas terhadap protein Cry1Ac, Cry1F dan PAT yang diekspresikan pada kedelai PRG *event* DAS-81419-2 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

Analisis kemiripan sekuen protein Cry1Ac, Cry1F dan PAT dengan sekuen protein alergen dilakukan dengan menggunakan *database* protein alergen COMPARE (*COMprehensive Protein Allergen Resource*) versi 2019 dengan perangkat FASTA, serta pencarian kesamaan sekuen delapan atau lebih asam amino dengan sekuen protein dalam *database* menggunakan perangkat lunak FUZZPRO (Emboss Package v6.4.0) (Song dan Leathers, 2019a; 2019b) atau program Perl yang dikembangkan oleh DuPont-Pioneer (*runLinearEpitopeScreen.pl*) (Mirsky dan Leathers, 2018).

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 sekuen protein Cry1Ac, Cry1F dan PAT dengan sekuen protein alergen. Selain itu, tidak ada kesamaan delapan asam amino atau lebih pada sekuen protein Cry1Ac, Cry1F dan PAT dengan sekuen protein alergen dalam *database* (Song dan Leathers, 2019a; 2019b; Mirsky dan Leathers, 2018).

III.2.2. Analisis Konsentrasi Protein

Konsentrasi protein Cry1Ac, Cry1F dan PAT pada kedelai PRG *event* DAS-81419-2 ditentukan menggunakan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Konsentrasi protein di dalam biji kedelai PRG *event* DAS-81419-2 ditemukan masing-masing sebesar 1,04 µg/g berat kering untuk protein Cry1Ac, 13,80 µg/g berat kering untuk protein Cry1F dan 0,86 µg/g berat kering untuk protein PAT (Maldonado, 2012).

Berdasarkan kandungan protein total dalam biji kedelai PRG *event* DAS-81419-2, maka kandungan protein Cry1Ac, Cry1F dan PAT hanya merupakan sebagian kecil dari total protein kedelai PRG *event* DAS-81419-2, masing-masing sebesar 0,00027%; 0,0036%, dan 0,00023% (Fast dan Johnson, 2012).

III.2.3. Analisis Stabilitas Protein

Protein Cry1Ac, Cry1F dan PAT dihasilkan dalam jumlah yang sedikit oleh tanaman kedelai PRG *event* DAS-81419-2, sehingga untuk keperluan pengujian stabilitas protein digunakan protein yang diproduksi pada bakteri *Pseudomonas fluorescens*. Kesetaraan protein Cry1Ac, Cry1F, dan PAT yang diproduksi pada bakteri *P. fluorescens* dengan protein Cry1Ac, Cry1F, dan PAT yang diekspresikan di dalam tanaman kedelai PRG *event* DAS-81419-2 diuji dengan menggunakan metode SDS-PAGE, *Western blot*, *lateral flow test strip assay* (LFS), analisis glikosilasi, aktivitas insektisidal (untuk Cry1Ac, Cry1F), aktivitas enzimatis (untuk PAT), sekuensing N-terminal dan analisis pemetaan massa peptida dengan spektroskopi massa MALDI-TOF MS/MS. Hasil analisis menunjukkan bahwa protein Cry1Ac, Cry1F dan PAT yang diproduksi pada bakteri *P. fluorescens* ekuivalen dengan protein Cry1Ac, Cry1F dan PAT yang dihasilkan oleh kedelai PRG *event* DAS-81419-2 (Schafer *et al.*, 2012a; 2012b; Brune dan Embrey, 2012; Oman *et al.*, 2013).

III.2.3.1. Analisis Stabilitas Cerna Protein

Analisis stabilitas cerna protein Cry1Ac, Cry1F dan PAT dilakukan melalui uji pencernaan menggunakan simulasi cairan lambung (*Simulated Gastric Fluid* - SGF) dalam rentang waktu 60 menit, dan simulasi cairan usus (*Simulated Intestinal Fluid* - SIF) dalam rentang waktu 240 menit pada suhu 37°C. Hasil hidrolisis protein dievaluasi dengan menggunakan metode SDS-PAGE dan *Western blot*.

Hasil SDS-PAGE dan *Western blot* menunjukkan bahwa tidak terdeteksi adanya pita protein utuh maupun fragmen-fragmennya setelah inkubasi dalam SGF dengan menggunakan pepsin pada pH 1,2 masing-masing selama satu menit untuk protein Cry1Ac, Cry1F dan PAT (Korjagin, 2001; 2004; Embrey dan Gardner, 2013a).

Hasil SDS-PAGE dan *Western blot* menunjukkan pula bahwa tidak terdeteksi adanya pita protein utuh dari protein Cry1Ac maupun Cry1F setelah inkubasi dalam SIF dengan menggunakan pankreatin pada pH 7,5 selama 15 detik, namun pita untuk protein toksin inti (*core toxin*) dari protein Cry1Ac maupun Cry1F tetap terdeteksi dalam rentang waktu pengujian selama 240 menit (Embrey dan Schafer, 2016a; 2016b). Setelah inkubasi dalam SIF dengan menggunakan pankreatin pada pH 7,5 selama 10 menit, tidak terdeteksi adanya pita protein PAT maupun fragmen-fragmennya (Embrey dan Gardner, 2013b).

III.2.3.2. Analisis Stabilitas Panas Protein

Analisis pengaruh pemanasan terhadap immunoreaktivitas protein Cry1Ac dan Cry1F dilakukan melalui inkubasi selama 60 menit pada suhu 91°C. Hasil pengujian dengan ELISA menunjukkan bahwa protein Cry1Ac dan Cry1F kehilangan 98-99% immunoreaktivitasnya. Evaluasi dengan SDS-PAGE dan densitometri menunjukkan pula bahwa lebih dari 60% protein Cry1Ac dan Cry1F telah terdegradasi setelah pemanasan selama 60 menit pada suhu 91°C (Shan dan Embrey, 2005).

Hasil evaluasi juga menunjukkan bahwa setelah pemanasan hingga suhu 95°C selama 30 menit, pita protein PAT tetap terdeteksi, yang menunjukkan bahwa protein PAT tidak terdegradasi atau tidak terjadi perubahan migrasi protein pada SDS-PAGE. Namun demikian, hasil pengujian immunoreaktivitas dan aktivitas enzimatis menunjukkan bahwa protein PAT kehilangan 99% immunoreaktivitasnya dan seluruh aktivitas enzimatisnya setelah pemanasan selama 30 menit pada suhu 75°C atau lebih (Embrey dan Gardner, 2013c).

Berdasarkan pengkajian alergenitas yang meliputi analisis bioinformatika, konsentrasi protein, maupun analisis stabilitas cerna dan stabilitas panas protein, dapat disimpulkan bahwa protein Cry1Ac, Cry1F, dan PAT tidak menunjukkan adanya potensi menimbulkan alergi.

III.3. Toksisitas

Pengkajian toksisitas terhadap protein Cry1Ac, Cry1F, dan PAT yang diekspresikan pada kedelai PRG *event* DAS-81419-2 dilakukan melalui analisis bioinformatika dan toksisitas oral akut yang dilakukan di laboratorium yang menerapkan GLP.

III.3.1 Analisis Bioinformatika

Analisis kemiripan sekuen protein Cry1Ac, Cry1F, dan PAT dengan sekuen protein toksin dilakukan dengan BLASTP menggunakan *DuPont Pioneer Toxin Database*

yang dikembangkan berbasis pada *database* sekuen protein yang terdapat dalam UniProtKB/Swiss-Prot (<https://www.uniprot.org/>). *DuPont Pioneer Toxin Database* tersebut disusun dengan mengumpulkan seluruh sekuen protein dalam UniProtKB/Swiss-Prot yang difilter dengan menggunakan kata kunci yang mengindikasikan toksisitas atau efek buruk bagi kesehatan lainnya seperti toksin, hemagglutinin, vasoaktif dan lain sebagainya (Song dan Challender, 2019a; 2019b; Mirsky dan Sitzmann, 2019). Hasil analisis menunjukkan bahwa tidak terdapat kemiripan sekuen asam amino antara protein Cry1Ac, Cry1F, dan PAT dengan sekuen asam amino protein toksin dalam *DuPont Pioneer Toxin Database* (Song dan Challender, 2019a; 2019b; Mirsky dan Sitzmann, 2019).

III.3.2 Toksisitas Akut Protein PAT

Pengujian toksisitas akut telah dilakukan terhadap protein PAT dan hasilnya telah dilaporkan. Protein PAT yang dihasilkan oleh tanaman kedelai PRG *event* DAS-81419-2 sangat sedikit, sehingga untuk keperluan pengujian toksisitas akut digunakan protein PAT yang diproduksi pada bakteri *P. fluorescens*. Kesetaraan protein PAT yang diproduksi pada bakteri *P. fluorescens* dengan protein PAT yang diekspresikan di dalam tanaman kedelai PRG *event* DAS-81419-2 diuji dengan menggunakan metode SDS-PAGE, *Western blot*, *lateral flow test strip assay* (LFS), analisis glikosilasi, aktivitas enzimatis, sekuensing N-terminal dan analisis pemetaan massa peptida dengan spektroskopi massa MALDI-TOF MS/MS. Hasil analisis menunjukkan bahwa protein PAT yang diproduksi pada bakteri *P. fluorescens* ekuivalen dengan protein PAT yang dihasilkan oleh kedelai PRG *event* DAS-81419-2 (Brooks, 2000; Oman *et al.*, 2013).

Bahan yang diuji adalah protein PAT dengan kemurnian sebesar 84%, yang disuspensikan dalam metilselulosa 0,5% (25% b/v). Toksisitas akut protein PAT diuji dengan cara cekokan tunggal, yang dilanjutkan dengan masa observasi selama 14 hari. Dalam pengujian ini digunakan mencit jantan dan betina strain CD-1 berumur sekitar 8 minggu dengan berat badan sebesar 29,8 – 32,1 g (mencit jantan) dan 29,4 – 31,6 g (mencit betina), yang berasal dari Charles River Laboratories Inc. (Portage, MI).

Semua mencit diaklimatisasi selama 2 minggu sebelum dilakukan pengujian. Mencit ditempatkan dalam kandang *stainless steel* secara individual dengan ruangan bersuhu $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, kelembaban relatif 40 – 70%, dan pencahayaan selama 12 jam terang 12 jam gelap. Pakan berupa Purina Certified Lab Diet #5002 (Purina Mills, Inc., St. Louis, MO) dalam bentuk pelet, diberikan secara *ad libitum* dan air minum juga diberikan secara *ad libitum*.

Sebanyak 5 ekor mencit jantan dan 5 ekor mencit betina diberikan suspensi protein PAT dengan dosis 6000 mg/kg BB. Pemberian protein PAT dilakukan dua kali (masing-masing sekitar setengah dosis yang harus diberikan) dengan jarak waktu 1 jam. Observasi klinis secara detail dilakukan dua kali terhadap semua mencit sebelum diberi cekokan, dan selanjutnya observasi klinis dilakukan setiap hari

selama pengujian berlangsung. Setiap mencit ditimbang berat badannya pada hari sebelum diberi cekokan, pada hari sewaktu diberi cekokan, dan selanjutnya pada hari ke-2, ke-8, dan ke-15.

Pada akhir pengujian, mencit dianestesi dengan inhalasi uap metoksifluran. Setelah itu mencit di-eutanasia dengan cara dekapitasi. Nekropsi dilakukan untuk pemeriksaan jaringan eksternal dan jaringan bagian dalam. Mata diperiksa *in situ*, tengkorak dibuka, kemudian otak, kelenjar pituitari dan jaringan serviks diperiksa.

Hasil pengujian menunjukkan: (1) tidak ada mencit yang mati selama pengujian, (2) semua mencit menunjukkan kenaikan berat badan, dan (3) tidak terdapat kelainan patologis akibat pemberian protein PAT.

Dari hasil pengujian toksisitas akut diketahui bahwa tidak terdapat efek toksik pada mencit akibat pemberian protein PAT sampai dosis 6000 mg/kg BB.

III.3.2 Toksisitas Akut Protein Cry1F

Pengujian toksisitas akut telah dilakukan terhadap protein Cry1F dan hasilnya telah dilaporkan. Protein Cry1F yang dihasilkan oleh tanaman Kedelai PRG *event* DAS-81419-2 sangat sedikit, sehingga untuk keperluan pengujian toksisitas akut digunakan protein Cry1F yang diproduksi pada bakteri *P. fluorescens*. Kesetaraan protein Cry1F yang diproduksi pada bakteri *P. fluorescens* dengan protein Cry1F yang diekspresikan di dalam tanaman Kedelai PRG *event* DAS-81419-2 diuji dengan menggunakan metode SDS-PAGE, *Western blot*, *lateral flow test strip assay* (LFS), analisis glikosilasi, aktivitas insektisidal, sekuensing N-terminal dan analisis pemetaan massa peptida dengan spektroskopi massa MALDI-TOF MS/MS. Hasil analisis menunjukkan bahwa protein Cry1F yang diproduksi pada bakteri *P. fluorescens* ekuivalen dengan protein Cry1F yang dihasilkan oleh kedelai PRG *event* DAS-81419-2 (Brooks dan Andrus, 1999; Brune dan Embrey, 2012).

Bahan yang diuji adalah protein Cry1F dengan kemurnian sebesar 30%, yang disuspensikan dalam metilselulosa 0.5% (5% b/v). Toksisitas akut protein Cry1F diuji dengan cara cekokan tunggal, yang dilanjutkan dengan masa observasi selama 14 hari. Dalam percobaan ini digunakan mencit jantan dan mencit betina strain CD-1 berumur sekitar 8 minggu dengan berat badan sebesar 30,0-35,0 g (mencit jantan) dan 26,4 – 28,6 g (mencit betina), yang berasal dari Charles River Laboratories Inc. (Portage, MI).

Semua mencit diaklimatisasi selama 2 minggu sebelum dilakukan pengujian. Mencit ditempatkan dalam kandang *stainless steel* secara individual dengan ruangan bersuhu $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, kelembaban relatif 40 – 70%, dan pencahayaan selama 12 jam terang 12 jam gelap. Pakan berupa Purina Certified Lab Diet #5002 (Purina Mills, Inc., St. Louis, MO) dalam bentuk pelet, diberikan secara *ad libitum* dan air minum juga diberikan secara *ad libitum*.

Sebanyak 5 ekor mencit jantan dan 5 ekor mencit betina diberikan suspensi protein Cry1F dengan dosis 2000 mg/kg BB. Pemberian protein Cry1F dilakukan dua kali (masing-masing setengah dosis yang harus diberikan) dengan jarak waktu 1 jam. Observasi klinis secara detail dilakukan dua kali terhadap semua mencit sebelum diberi cekokan, dan selanjutnya observasi klinis dilakukan setiap hari selama pengujian berlangsung. Setiap mencit ditimbang berat badannya pada hari sebelum diberi cekokan, pada hari sewaktu diberi cekokan, dan selanjutnya pada hari ke-2, ke-8, dan ke-15.

Pada akhir pengujian, mencit dianestesi dengan inhalasi uap metoksifluran. Setelah itu mencit di-eutanasia dengan cara dekapitasi. Nekropsi dilakukan untuk pemeriksaan jaringan eksternal dan jaringan bagian dalam. Mata diperiksa *in situ*, tengkorak dibuka, kemudian otak, kelenjar pituitari dan jaringan serviks diperiksa.

Hasil pengujian menunjukkan: (1) tidak ada mencit yang mati selama pengujian, (2) semua mencit menunjukkan kenaikan berat badan, dan (3) tidak terdapat kelainan patologis akibat pemberian protein Cry1F.

Dari hasil pengujian toksisitas akut diketahui bahwa tidak terdapat efek toksik pada mencit akibat pemberian protein Cry1F sampai dosis 2000 mg/kg BB.

III.3.2 Toksisitas Akut Protein Cry1Ac

Pengujian toksisitas akut telah dilakukan terhadap protein Cry1Ac dan hasilnya telah dilaporkan. Protein Cry1Ac yang dihasilkan oleh tanaman Kedelai PRG *event* DAS-81419-2 sangat sedikit, sehingga untuk keperluan pengujian toksisitas akut digunakan protein Cry1Ac yang diproduksi pada bakteri *Pseudomonas fluorescens*. Kesetaraan protein Cry1Ac yang diproduksi pada bakteri *P. fluorescens* dengan protein Cry1Ac yang diekspresikan di dalam tanaman kedelai PRG *event* DAS-81419-2 diuji dengan menggunakan metode SDS-PAGE, *Western blot*, *lateral flow test strip assay* (LFS), analisis glikosilasi, aktivitas insektisidal, sekuensing N-terminal dan analisis pemetaan massa peptida dengan spektroskopi massa MALDI-TOF MS/MS. Hasil analisis menunjukkan bahwa protein Cry1Ac yang dihasilkan oleh bakteri *P. fluorescens* ekuivalen dengan protein Cry1Ac yang dihasilkan oleh kedelai PRG *event* DAS-81419-2 (Brooks dan Yano, 2001; Brune dan Embrey, 2012).

Bahan yang diuji adalah protein Cry1Ac dengan kemurnian sebesar 14%, yang disuspensikan dalam metilselulosa 0.5% (10% b/v). Toksisitas akut protein Cry1Ac diuji dengan cara cekokan tunggal, yang dilanjutkan dengan masa observasi selama 14 hari. Dalam pengujian ini digunakan mencit jantan dan mencit betina strain CD-1 berumur sekitar 8 minggu dengan berat badan sebesar 31,8 – 35,4 g (mencit jantan) dan 26,0 – 27,1 g (mencit betina), yang berasal dari Charles River Laboratories Inc. (Raleigh, North Carolina).

Semua mencit diaklimatisasi selama 1 minggu sebelum dilakukan pengujian. Mencit ditempatkan dalam kandang *stainless steel* secara individual dengan ruangan

bersuhu $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, kelembaban relatif 40 – 70%, dan pencahayaan selama 12 jam terang 12 jam gelap. Pakan berupa LabDiet® Certified Rodent Diet #5002 (PMI Nutrition International, St. Louis, Missouri) dalam bentuk pelet, diberikan secara *ad libitum* dan air minum yang berasal juga diberikan secara *ad libitum*.

Sebanyak 5 ekor mencit jantan dan 5 ekor betina diberikan suspensi protein Cry1Ac dengan dosis 5000 mg/kg BB. Pemberian protein Cry1Ac dilakukan dua kali (masing-masing setengah dosis yang harus diberikan) dengan jarak waktu 1 jam. Observasi klinis secara detail dilakukan dua kali terhadap semua mencit sebelum diberi cekokan, dan selanjutnya observasi klinis dilakukan setiap hari selama pengujian berlangsung. Setiap mencit ditimbang berat badannya pada hari sebelum diberi cekokan, pada hari sewaktu diberi cekokan, dan selanjutnya pada hari ke-2, ke-8, dan ke-15.

Pada akhir pengujian, mencit dianestesi dengan inhalasi gas karbon dioksida. Setelah itu mencit di-eutanasia dengan cara dekapitasi. Nekropsi dilakukan untuk pemeriksaan terhadap jaringan eksternal dan jaringan bagian dalam. Mata diperiksa *in situ*, tengkorak dibuka, kemudian otak, kelenjar pituitari dan jaringan serviks diperiksa.

Hasil pengujian menunjukkan: (1) tidak ada mencit yang mati selama pengujian, (2) semua mencit menunjukkan kenaikan berat badan, dan (3) tidak terdapat kelainan patologis akibat pemberian protein Cry1Ac.

Dari hasil pengujian toksisitas akut diketahui bahwa tidak terdapat efek toksik pada mencit akibat pemberian protein Cry1Ac sampai dosis 5000 mg/kg BB.

Berdasarkan hasil pengkajian toksisitas yang meliputi analisis bioinformatika dan toksisitas akut, dapat disimpulkan bahwa kedelai PRG *event* DAS-81419-2 termasuk ke dalam bahan yang tidak toksik.

IV. Kesimpulan

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

1. Kedelai PRG *event* DAS-81419-2 mengandung satu kopi T-DNA yang berisi gen *cry1Fv3*, *cry1Ac(synpro)*, dan *pat* yang stabil sampai lima generasi, yaitu T1, T2, T3, T4, dan F2; diwariskan mengikuti hukum genetik Mendel; dan tidak mengandung sekuen *backbone* dari plasmid transformasi pDAB9582;
2. Kedelai PRG *event* DAS-81419-2 sepadan secara substansial dengan Kedelai non PRG, tidak menunjukkan adanya potensi menimbulkan alergi, dan termasuk ke dalam bahan yang tidak bersifat toksik;
3. TTKH menilai bahwa Kedelai PRG *event* DAS-81419-2 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* DAS-81419-2 perlu dikaji ulang;
5. Apabila setelah ditetapkan aman pangan, kemudian Kedelai PRG *event* DAS-81419-2 terbukti menimbulkan dampak negatif terhadap kesehatan manusia maka pemohon wajib melakukan tindakan pengendalian dan penanggulangan, serta menarik Kedelai PRG *event* DAS-81419-2 dari peredaran;
6. Kedelai PRG *event* DAS-81419-2 tidak boleh digunakan sebagai pakan sampai memperoleh sertifikat keamanan pakan; dan
7. Kedelai PRG *event* DAS-81419-2 tidak boleh dibudidayakan sampai ditetapkan aman lingkungan.

V. Daftar Acuan

Adang MJ, Staver MJ, Rocheleau TA, Leighton J, Barker RF, Thompson DV. 1985. *Characterized Full-length and Truncated Plasmid Clones of the Crystal Protein of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki HD-73 and Their Toxicity to Manduca sexta*. Gene 36: 289-300.

Bard N., Bradfisch GA., Cui YC, Dripps JE., Hoffman T., Pareddy D., Parkhurst DM., Toledo SG., Wiggins B., Ning Zhou N., 2014. Insect Resistant and Herbicide Tolerant Soybean Event 9582.81.4.19.1. United State Patent. No. US 8,680,363 B2

Barker RF, Idler KB, Thompson DV, Kemp JD. 1983. *Nucleotide-Sequence of the T-DNA Region from the Agrobacterium tumefaciens Octopine Ti Plasmid pTi15955*. Plant Molecular Biology 2:335 – 350.

Brooks KJ, 2000. *PAT Microbial Protein (FL): Acute Oral Toxicity Study in CD-1 Mice. Performing laboratory: Toxicology & Environmental Research and Consulting*. The Dow Chemical Company, Midland, Michigan 48674. Sponsor: Dow AgroSciences LLC, 9330 Zionsville Rd. Indianapolis, IN 46268.

Brooks KJ dan AK Andrus, 1999. *Cry1F Microbial Protein (FI): Acute Oral Toxicity Study In CD-1 Mice*. Performing Laboratory: Toxicology & Environmental Research and Consulting, The Dow Chemical Company, Midland, Michigan 48674. Sponsor: Dow AgroSciences (DAS) LLC, 9330 Zionsville Rd., Indianapolis, IN 46268.

Brooks KJ dan BL Yano, 2001. *Cry1Ac-(Synpro) Microbial Protein: Acute Oral Toxicity Study in CD-1 Mice*. Performing Laboratory: Toxicology & Environmental Research and Consulting, The Dow Chemical Company, Midland, Michigan 48674. Sponsor: Dow AgroSciences LLC, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268.

Brune, A.M. dan Embrey, S.K. 2012. *Biological Equivalency of Soybean (DAS-81419-2) and microbe-produced Cry1Ac and Cry1F Proteins*. Study Report No. 120416. Dow AgroSciences LLC, Regulatory Sciences and Government Affairs-Indianapolis Lab, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268-1054, USA. *Report completed on July 18, 2012*.

Cardineau GA, Stelman SJ, Narva KE. 2001. US Patent 6,218,188, 2001.

Embrey, S.K. dan Gardner, B.K. 2013a. *In Vitro Simulated Gastric Fluid Digestibility Study of Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) Protein*. Study Report No. 120938. Dow AgroSciences LLC, Regulatory Sciences and Government Affairs-Indianapolis Lab, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268-1054, USA. Report completed on April 02, 2013.

Embrey, S.K. dan Gardner, B.K. 2013b. *In Vitro Simulated Intestinal Fluid Digestibility Study of Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) Protein*. Study Report No. 120936. Dow AgroSciences LLC, Regulatory Sciences and Government Affairs-Indianapolis Lab, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268-1054, USA. Report completed on April 04, 2013.

Embrey, S.K. dan Gardner, B.K. 2013c. *Effect of Heat Treatment on Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) Protein*. Study Report No. 120937. Dow AgroSciences LLC, Regulatory Sciences and Government Affairs-Indianapolis Lab, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268-1054, USA. Report completed on April 11, 2013.

Embrey, S.K. dan Schafer, B.W. 2016a. *In Vitro Simulated Intestinal Fluid Digestibility of Full-Length Cry1Ac Protein*. Study Report No. 161042. Dow AgroSciences LLC, Regulatory Sciences and Government Affairs-Indianapolis Lab, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268-1054, USA. Report completed on October 26, 2016.

Embrey, S.K. dan Schafer, B.W. 2016b. *In Vitro Simulated Intestinal Fluid Digestibility of Full-Length Cry1F Protein*. Study Report No. 161041. Dow AgroSciences LLC, Regulatory Sciences and Government Affairs-Indianapolis Lab, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268-1054, USA. Report completed on October 26, 2016.

Gao Y, Fencil KJ, Xu X, Schwedler DA, Gilbert JR, Herman RA. 2006. *Purification and Characterization of a Chimeric Cry1F δ -Endotoxin Expressed in Transgenic Cotton Plants*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 829-835.

Gilroy TE, Wilcox ER, inventors. 1992. *Hybrid Bacillus thuringiensis gene, plasmid and transformed Pseudomonas fluorescens*. US Patent, Application No. 568,650.

Guttikonda S. 2012. Molecular characterization of DAS-81419-2 soybean. Study ID 110813, Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, IN.

Guttikonda S, Richey K. 2012. Cloning and characterization of the DNA sequence for the insert and its flanking border regions of DAS-81419-2 soybean. Study ID 102126, Dow AgroSciences LLC, Indianapolis IN.

Fast, B.J. dan Johnson, T.Y. 2012. *Nutrient Composition of a Transformed Soybean Cultivar Expressing Cry1Ac, Cry1F, and PAT: Event DAS-81419-2*. Study Report No. 110000.01. Dow AgroSciences LLC, Regulatory Sciences and Government Affairs-Indianapolis Lab, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268-1054, USA. Report completed on July 11, 2012.

Korjagin, V.A. 2001. *In Vitro Simulated Gastric Fluid Digestibility Study of Microbially Derived Cry1Ac(synpro)*. Study ID: 010026. Dow AgroSciences LLC, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268-1054, USA. Report Completed on August 30, 2001.

Korjagin, V.A. 2004. *In Vitro Simulated Gastric Fluid Digestibility Study of CryIF(synpro) Produced by Pseudomonas fluorescens DR 1647*. Study ID: 040097. Dow AgroSciences LLC, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268-1054, USA. Report Completed on October 4, 2004.

Maldonado, P.M. 2012. *Protein Expression of a Transformed Soybean Cultivar Containing Cry1Ac, Cry1F, and Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) - Event DAS-81419-2*. Study Report No. 110000.02. Dow AgroSciences LLC, Regulatory Sciences and Government Affairs-Indianapolis Lab, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268-1054, USA. Report completed on May 7, 2012.

Mirsky, H dan Leathers, J. 2018. *Comparison of the Amino Acid Sequence of the PAT Protein to the Amino Acid Sequences of Known and Putative Protein Allergens*. Pioneer Hi-Bred International Inc. Study No. PHI-2019-069/201. DuPont Agricultural Biotechnology R&D, 8325 NW 62nd, Johnston, IA 50141, USA. Report Completed on March 29, 2018.

Mirsky, H dan Sitzmann, B. 2019. *Comparison of the PAT Protein Sequence to the Protein Sequences in the DuPont Pioneer Toxin Database*. Pioneer Hi-Bred International Inc. Study No. PHI-2019-041/211. DuPont Agricultural Biotechnology R&D, 8325 NW 62nd, Johnston, IA 50141, USA. Report Completed on March 6, 2019.

Norris SR, Meyer SE, Callis J. 1993. *The Intron of Arabidopsis thaliana Polyubiquitin Genes is Conserved in Location and is a Quantitative Determinant of Chimeric Gene Expression*. Plant Molecular Biology 21: 895-906.

Oman, T.J., Clement, J.M., Juba, A.N., Singletary, L.J. 2013. *Characterization of the Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) Protein Derived from Transgenic Soybean Event DAS-81419-2*. Study ID: 120928. Dow AgroSciences LLC, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268-1054, USA. Report Completed on June 7, 2013.

Schafer, B.W., Oman, T.J., Clement, J.M., Juba, A.N., Embrey, S.K. 2012a. *Characterization of the full-length Cry1Ac protein derived from transgenic soybean event DAS-81419-2*. Study ID: 110840. Dow AgroSciences LLC, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268-1054, USA. Report Completed on July 23, 2012.

Schafer, B.W., Oman, T.J., Clement, J.M., Juba, A.N., Embrey, S.K. 2012b. *Characterization of the full-length Cry1F protein derived from transgenic soybean event DAS-81419-2*. Study ID: 110841. Dow AgroSciences LLC, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268-1054, USA. Report Completed on July 23, 2012.

Shan, G. dan Embrey, S.K. 2005. *Heat Lability of Insecticidal Crystal Proteins Cry1Ac and Cry1F*. Study Report No. GH-C 5777. Dow AgroSciences LLC, Regulatory Sciences and Government Affairs-Indianapolis Lab, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268-1054, USA. Report completed on January 21, 2005.

Song, P dan Challender, M. 2019a. *Comparison of the Cry1Ac(synpro) Protein Sequence to the Protein Sequences in the DuPont Pioneer Toxin Database. Pioneer Hi-Bred International Inc.* Study No. HI-2019-053/211. DuPont Agricultural Biotechnology R&D, 8325 NW 62nd, Johnston, IA 50141, USA. *Report Completed on March 20, 2019.*

Song, P dan Challender, M. 2019b. *Comparison of the Cry1F(synpro) Protein Sequence to the Protein Sequences in the DuPont Pioneer Toxin Database. Pioneer Hi-Bred International Inc.* Study No. PHI-2019-052/211. DuPont Agricultural Biotechnology R&D, 8325 NW 62nd, Johnston, IA 50141, USA. *Report Completed on March 20, 2019.*

Song, P dan Leathers, J. 2019a. *Comparison of the Amino Acid Sequence of the Cry1Ac(synpro) Protein to the Amino Acid Sequences of Known and Putative Protein Allergens. Pioneer Hi-Bred International Inc.* Study No. PHI-2019-080/201. DuPont Agricultural Biotechnology R&D, 8325 NW 62nd, Johnston, IA 50141, USA. *Report Completed on April 12, 2019.*

Song, P dan Leathers, J. 2019b. *Comparison of the Amino Acid Sequence of the Cry1F(synpro) Protein to the Amino Acid Sequences of Known and Putative Protein Allergens. Pioneer Hi-Bred International Inc.* Study No. HI-2019-081/201. DuPont Agricultural Biotechnology R&D, 8325 NW 62nd, Johnston, IA 50141, USA. *Report Completed on April 12, 2019.*

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

Wohlleben W, Arnold W, Broer I, Hillemann D, Strauch E, Punier A. 1988. *Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from Streptomyces viridochromogenes Tü494 and its expression in Nicotiana tabacum.* Gene 70: 25-37.

Zeng P, Vадnais DA, Zhang Z, Polacco JC. 2004. *Refined glufosinate selection in Agrobacterium-mediated transformation of soybean [Glycine max (L.) Merrill].* Plant Cell Reports 22: 478-482.