

Ringkasan Pengkajian Keamanan Pangan PRG *Ice Structuring Protein* (ISP)

I. Pendahuluan

Ice Structuring Protein (ISP) adalah protein alami yang untuk pertama kalinya diidentifikasi 30 tahun yang lalu di dalam darah ikan yang biasa hidup di laut beku, seperti ikan cod, ikan *pout* dan ikan hering. ISP menolong ikan-ikan tersebut untuk terhindar dari kerusakan tubuhnya pada kondisi yang sangat dingin.

Unilever International mengembangkan ISP dengan cara merekayasa khamir *Saccharomyces cerevisiae* yang umum digunakan dalam fermentasi produk roti (*bakery*). Gen sintesis yang mengkode ISP Tipe III HPLC 12 yang berasal dari ikan laut *pout* (*Macrozoarces americanus*) telah dirakit untuk ditransformasikan ke dalam *S. cerevisiae*. Selanjutnya setelah dilakukan fermentasi, ISP Tipe III HPLC 12 yang diproduksi oleh khamir yang sudah dimodifikasi tersebut dimurnikan melalui penyaringan mikro dan ultrafiltrasi untuk memisahkan ISP dari khamirnya. Dengan proses ini, ISP (selanjutnya istilah ISP digunakan untuk menggantikan ISP Tipe III HPLC 12) yang diperoleh sudah tidak mengandung komponen khamir yang termodifikasi secara genetik tersebut.

Unilever menggunakan ISP ini sebagai bahan pembantu dalam pembuatan es krim dengan tujuan mengendalikan pembentukan struktur kristal es selama pembekuan. Jumlah ISP yang digunakan dalam es krim berkisar antara 50 – 100 ppm. Diperkirakan nilai EDI (*Estimated Daily Intake*) di Indonesia sekitar 0,12 mg per kg berat badan per hari. ISP telah dimanfaatkan untuk proses pembuatan es krim di beberapa negara yaitu: Afrika Selatan, Amerika Serikat, Australia, Eropa, Meksiko, dan Selandia Baru.

Berdasarkan Peraturan Kepala Badan POM Nomor HK.00.05.23.3541 Tahun 2008 tentang Pedoman Pengkajian Keamanan Pangan Produk Rekayasa Genetik, TTKHKP telah melakukan pengkajian keamanan pangan ISP berdasarkan informasi genetik dan informasi keamanan pangan yang terdiri alergenitas dan toksisitas sebagaimana diuraikan di bawah ini. Pengkajian kesepadanan substansial tidak relevan dalam pengkajian keamanan pangan ISP, karena ISP adalah produk isolat murni yang tidak mengandung bagian dari atau sudah tidak terkait dengan khamir yang direkayasa secara genetik.

II. Informasi Genetik

II.1 Elemen Genetik

Ice Structuring Protein (ISP) adalah suatu protein yang diproduksi melalui proses tertutup yaitu fermentasi yang menggunakan jasad renik khamir *Saccharomyces cerevisiae* strain CEN.PK (*food grade baker's*) yang telah dimodifikasi (Karl-Dieter Entian and Peter Kotter, *Yeast Mutant and Plasmid Collections, Methods In Microbiology*, Volume 26, 1998, 431-449). Gen sintesis yang mengkode ISP yang berasal dari ikan laut *pout* (*Macrozoarces americanus*) telah dirakit untuk

ditransformasikan ke dalam *S. cerevisiae*. Pada tahap akhir fermentasi dilakukan penyaringan secara mikro dan ultrafiltrasi untuk memisahkan dan memurnikan ISP dari jasad renik yang termodifikasi tersebut, sehingga produk akhir ISP sudah tidak mengandung organisme rekayasa genetik tersebut. (*Martek Product Specification of Ice Structuring Protein Preparation*, dilegalisasi tanggal 8 Desember 2010)

II.2 Sumber Gen Interes

Gen sintesis dirakit dengan menggunakan sekuen asam amino yang sudah diketahui untuk protein ISP dari ikan laut *pout M. americanus* (*Genbank file P19614*). Promoter GAL7 dan *leader sequence* TDH3 berasal dari *Saccharomyces cerevisiae*, dan sekuen sinyal *SUC2 invertase* dari *S. cerevisiae*.

II.3 Sistem Transformasi

Gen sintesis ISP ditransformasikan ke dalam *S. cerevisiae* dengan metode transformasi litium klorida seperti yang telah dilaporkan oleh Gietz dan Woods (*Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method*. Gietz RD, Woods RA. *Methods in Molecular Biology*, 2006;313:107-20).

Vektor transformasi yang digunakan adalah pUR3993 yang mengandung (1) promoter GAL7 (*galactose inducible yeast*) dari *S. cerevisiae*, (2) *leader sequence* TDH3 *S. cerevisiae*, dan (3) sekuen sinyal *SUC2 invertase* dari *S. cerevisiae*. Transformasi yang diperoleh tidak mengandung gen penanda ketahanan antibiotik.

II.4 Stabilitas Genetik

Seperti yang telah diuraikan pada II.1. Elemen Genetik, ISP telah mengalami proses pemurnian melalui penyaringan secara mikro dan ultrafiltrasi, sehingga tidak ditemukan materi DNA pada produk akhir ISP. Dengan demikian, produk ISP tidak mempunyai peluang ketidak-stabilan pada sifat genetik intrinsik *S. cerevisiae* strain CEN.PK. Dengan terbebasnya ISP dari materi genetik tersebut maka risiko langsung ataupun tak langsung terhadap lingkungan tidak terjadi.

Berdasarkan hasil pengkajian informasi genetik disimpulkan bahwa:

1. produk ISP adalah suatu protein yang diproduksi melalui proses fermentasi yang menggunakan jasad renik *S. cerevisiae* strain CEN.PK; dan
2. produk ISP telah mengalami proses pemurnian melalui penyaringan secara mikro dan ultrafiltrasi sehingga tidak ditemukan materi genetik (DNA) dalam produk akhir ISP.

III. Informasi Keamanan Pangan

III.1 Alergenisitas

ISP terdiri dari 66 asam amino, dengan berat molekul berukuran 7 kDa dengan sekuen yang sudah diketahui. Informasi sekuen telah tercatat pada *Swiss-Prot Protein Database* dengan *accession number P19614*. Karakter protein ISP lainnya adalah merupakan protein globular, memiliki struktur β -strands (50%) dan bagian hidrofobik, tidak mengandung gugus gula, memiliki titik iso-elektrik 6 – 10, kestabilan pH antara 2 – 12 dan stabil terhadap panas.

Analisis sekuen asam amino dengan MALDI-TOF, menunjukkan bahwa ISP tidak mengandung sekuen asam amino baru yang mirip dengan protein alergen. Berdasarkan pendekatan dengan menggunakan analisis sekuen N-terminal, *mapping peptide*, dan LC-MS, dapat disimpulkan bahwa sekuen asam amino dari ISP yang dihasilkan oleh khamir PRG ini, identik dengan ISP yang berasal dari ikan *pout* (*Macrozoarces americanus*) yang terdaftar di *Swiss-Prot* dengan nomor P19614. (Baderschneider, B., et al., "Sequence Analysis and Resistance to Pepsin Hydrolysis as Part of Assessment of Potential Allergenicity of Ice Structuring Protein Type III HPLC 12", *Food and Chemical Toxicology* 40 : 965-978, 2002).

Studi bioinformatik menggunakan program BLASTP versi 2.2.1. 2001 dan FASTA 3 serta informasi dari protein *database* PIR, Swiss-Prot, FARRP, TrEMBL, RefSeq, GenPept dan PDB, menunjukkan tidak ada kemiripan sekuen asam amino ISP dengan sekuen asam amino protein yang sudah diketahui menyebabkan alergi, termasuk senyawa alergen dari ikan atau protein lain. Selanjutnya, semua sekuen asam amino dari peptida enam, tujuh, dan delapan (61 heksamer, 60 heptamer, dan 59 oktamer) yang dapat dihasilkan dari sekuen asam amino ISP dimasukkan ke dalam program "*Peptide Match*" untuk mengidentifikasi kemiripan sekuen asam aminonya dengan sekuen alergen di dalam *database* PIR-NREF, dan diperoleh hasil negatif. Dengan demikian, struktur dan sekuen asam amino ISP bersifat spesifik ISP.

Dalam analisis menggunakan delapan asam amino *reading frame*, kemiripan hanya terjadi dengan ISP lain. Dengan mempersempit *reading frame* menjadi tujuh atau enam asam amino untuk meningkatkan jumlah kecocokan dengan protein yang tidak berkaitan, tetap tidak menghasilkan kemiripan dengan alergen yang sudah diketahui.

Analisis kestabilan protein terhadap enzim pepsin menggunakan SDS-PAGE dan *immunoblotting* (*Western blot*) serta studi imunitas yaitu kemampuan protein ISP untuk menginduksi atau memprovokasi reaksi alergi dilakukan sesuai dengan rekomendasi dari FAO/WHO (2001) dan *Codex Alimentarius Commission, Ad Hoc Task Force on Foods Derived from Biotechnology* (2002).

Metoda yang digunakan dan hasilnya telah dipublikasikan seperti dibawah ini:

1. Baderschneider, B. *et al.* 2002. *Sequence Analysis and Resistance to Pepsin Hydrolysis as Part of Assessment of Potential Allergenicity of Ice Structuring Protein Type III HPLC 12*, Food and Chemical Toxicology, 40 : 965-978.
2. Bindlev-Jensen, C. *et al.* 2003. *Assessment of Potential Allergenicity of Ice Structuring Protein Type III HPLC 12 Using FAO/WHO 2001 Decision Tree for Novel Foods*, Food and Chemical Toxicology, 41 : 81-87.
3. Crevel, R.W.R. *et al.* 2007. *Lack of Immunogenicity of Ice Structuring Protein Type III HPLC 12 Preparation Administered by the Oral Route to Human Volunteers*.

Pada uji pepsin, protein ISP terhidrolisis sebanyak 50% dalam kurun waktu kurang dari 10 menit pada pH 1,5 menjadi 5 fragmen peptida yang tidak bersifat alergenik.

Terdapat bukti yang menunjukkan bahwa tidak ada individu yang peka terhadap ikan akan bereaksi berbeda terhadap preparat ISP. Di dalam studi ditemukan bahwa ISP tidak mengikat IgE dari subyek yang sudah alergi terhadap ikan, kesimpulan ini dikonfirmasi secara visual dan dengan analisis *immunoblotting*.

Skin Prick test ISP tidak menghasilkan reaksi positif. Konsumsi preparat ISP selama delapan minggu pada dosis harian yang tinggi tidak menimbulkan pembentukan antibodi spesifik.

Berdasarkan hasil pengkajian alergenitas di atas dapat disimpulkan bahwa ISP tidak berpotensi menimbulkan alergi.

III.2 Toksisitas

Uji toksisitas ISP telah dilakukan dan dilaporkan sebagai *Final Report* (Covance Study Number 375/154, *Covance Report Number 375/154-D6154*, *Sponsor Number KF010105*, *Report Issued March 2002*) dengan judul "*Batch 201008: 13 Weeks Oral (Gavage Administration) Toxicity in the Rat*" oleh John Stewart. Uji toksisitas dilakukan mulai tanggal 4 Juni 2001 sampai dengan 7 Maret 2002. Penelitian dilaksanakan di Covance Laboratories Ltd, Otley Road, Harrogate, North Yorkshire HG3 1 PY, England. Laboratorium ini dinyatakan telah menerapkan GLP (*Good Laboratory Practices*).

ISP yang diuji berbentuk padatan berwarna putih. Protein ini telah dikarakterisasi dan dibandingkan dengan ISP yang diperoleh dari ikan laut *pout*. Kedua jenis protein tersebut telah dibuktikan identik, dalam hal sekuen asam amino, berat molekul, bentuk molekul, titik isoelektrik, kisaran stabilitas pH, stabilitas terhadap panas, dan sifat sebagai protein anti pembekuan (*antifreeze protein*, AFPs) berdasarkan laporan hasil studi dengan judul "*Characterisation of Various AFP III HPLC 12 Batches*" oleh Anja Lalue pada tahun 2002. Penelitian dilaksanakan di Unilever Colworth Laboratory, Colworth House, Sharnbrook, Bedford MK44 1LQ, UK.

Laboratorium Covance menerima bahan yang akan diuji berupa larutan (bahan yang sudah dilarutkan dalam asam sitrat oleh sponsor, sesuai dengan dosis yang akan diberikan). Sebelum diberikan secara cekok (*gavage*) pada tikus percobaan, bahan protein ISP tersebut disimpan dalam keadaan beku di dalam freezer (-20°C), yang kemudian akan dicairkan pada suhu 37°C , selama 1 jam, dalam *water bath*.

Pengujian menggunakan tikus putih galur Crl:WI(Glx/BRL/Han)BR, berumur 28 hari sewaktu diterima, diperoleh dari Charles River UK, Margate, Kent, dengan berat badan berkisar antara 139,8 - 190,5 g untuk jantan, dan 116,7 - 150,3 g untuk betina. Tikus mulai digunakan dalam pengujian sewaktu berumur sekitar 6 minggu (setelah mengalami periode aklimatisasi). Untuk perlakuan uji toksisitas akut, sebanyak 100 ekor mencit jantan dan betina dibagi menjadi 5 kelompok dan masing-masing kelompok terdiri dari 20 ekor tikus jantan dan 20 ekor tikus betina.

Tikus dipelihara dalam kandang baja tahan karat berukuran 30 cm x 28 cm x 24 cm, satu ekor per kandang. Kandang ditempatkan dalam ruangan, dimana tikus jantan dan betina dipisahkan ruangnya. Ruangan dilengkapi dengan AC untuk menjaga suhu ruangan berada dalam kisaran $19 - 25^{\circ}\text{C}$ dan kelembaban sekitar 40 - 70%. Selain itu ruangan dilengkapi dengan lampu fluoresen yang dikontrol secara otomatis untuk memberikan keadaan terang selama 12 jam dan gelap selama 12 jam.

Selama percobaan berlangsung, tikus diberi ransum dan air minum secara *ad libitum*. Ransum yang diberikan berupa SQC Rat and Mouse Maintenance Diet No. 1, Expanded, diperoleh dari Special Diets Service, Ltd, Witham. Air minum berupa *mains water* diberikan melalui botol air minum.

Sebelum pelaksanaan uji toksisitas, tikus mengalami periode aklimatisasi dan pengamatan kesehatan selama sekitar 2 minggu. Bahan yang akan diuji (ISP) dilarutkan dalam asam sitrat (SEAC No. S2372001) dan diberikan secara cekok (*gavage*) sebanyak 20 ml/kg berat badan (BB). Sejumlah yang sama asam sitrat (0,12%) juga diberikan pada kelompok kontrol pelarut, sedangkan untuk kelompok kontrol diberikan air murni (*ultra purified water*). Bahan yang diuji (termasuk kontrol) diberikan pada tikus dengan menggunakan alat suntik dan kateter karet. Tingkat dosis yang diberikan pada tikus adalah dosis rendah 58 mg/kg BB/hari, dosis menengah 290 mg/kg BB/hari, dan dosis tinggi 580 mg/kg BB/hari.

Penentuan dosis didasarkan pada percobaan pendahuluan, dimana tikus yang diberi cekokan sebanyak 20 ml/kg BB/hari setara dengan ISP 400 mg/kg BB/hari selama 14 hari berturut-turut, tidak mengalami keracunan. Uji toksisitas ISP dilakukan selama 14 minggu, dimana tikus akan diberi bahan uji secara cekokan selama 13 minggu, sedangkan pada minggu ke-14 dilakukan nekropsi pada semua tikus.

Pengamatan dilakukan baik secara mingguan maupun hanya pada minggu tertentu saja. Pengamatan mingguan meliputi pengamatan fisik, motorik dan perilaku hewan (baik di kandang maupun di tempat terbuka), serta berat badan dan konsumsi ransum. Hasil pengujian toksisitas pada tikus menunjukkan bahwa tidak terdapat tikus yang mati

selama pengujian berlangsung. Satu ekor tikus (No. 97) yang diberi dosis 580 mg/kg BB/hari, dimatikan pada minggu ke-10 karena kondisinya kurang baik (kesulitan bernafas). Tikus ini mengalami penurunan berat badan sekitar 3% dibandingkan minggu sebelumnya. Penyebab penurunan kondisi tikus ini tidak dapat ditentukan. Tidak terdapat pengaruh merugikan baik terhadap berat badan maupun kenaikan berat badan tikus akibat pemberian bahan yang diuji, bahkan tikus yang diberi cekokan bahan uji dengan dosis 290 atau 580 mg/kg BB/hari, timbangan badannya lebih berat dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Salivasi diamati terjadi pada minggu ke-7 pada beberapa ekor tikus yang menerima dosis 580 mg/kg BB/hari. Salivasi umumnya terjadi segera setelah diberi cekokan, dan berhenti setelah 30 menit kemudian. Tidak terdapat perbedaan konsumsi ransum antara kelompok uji dan kelompok kontrol. Terkait dengan kondisi fisik, motorik dan perilaku, tidak terdapat kondisi kelainan yang permanen atau kecenderungan yang disebabkan oleh pemberian bahan uji.

Pada minggu ke-12 semua tikus diperiksa matanya (*ophthalmoscopy*). Hasil pengujian tidak menunjukkan adanya pengaruh perlakuan pemberian bahan uji terhadap mata hewan percobaan.

Pada minggu ke-4, ke-8 dan ke-13, terhadap 10 ekor tikus jantan dan 10 ekor tikus betina terpilih, dilakukan pengambilan darah dari vena (*lateral caudal vein*), untuk dilakukan pengamatan hematologi dan kimia klinis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan antar kelompok dalam hal komposisi hematologi, potensi penggumpalan (*clotting*) sampel darah tikus, komposisi biokimia plasma darah yang diperoleh dari sampel darah, dan tidak terdapat pola variasi yang konsisten dari parameter urinalisis yang mengindikasikan adanya pengaruh perlakuan.

Pada minggu ke-14, setelah dilakukan nekropsi, organ dalam tikus ditimbang, dan terhadap beberapa macam organ dilakukan pengamatan histologi dan patologi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan antar kelompok dalam hal berat organ tubuh tikus yang mungkin disebabkan oleh perlakuan. Berat jantung beberapa ekor tikus jantan yang memperoleh dosis 580 mg/kg BB/hari dan beberapa ekor tikus betina yang memperoleh dosis 290 mg/kg BB/hari, lebih tinggi ($p < 0,01$ untuk jantan dan $p < 0,05$ untuk betina), namun hal ini diduga bukan disebabkan oleh pengaruh toksik bahan uji, karena tidak didukung oleh hasil pengamatan histopatologi.

Terhadap sejumlah data yang diperoleh, dilakukan analisis statistik (ANOVA), untuk melihat pengaruh pemberian bahan uji dan dosis bahan uji dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Hasil pengujian toksisitas ISP yang diberikan selama 13 minggu (sub-kronis 90 hari) menunjukkan bahwa ISP sampai dosis 580 mg/kg BB/hari tidak memberikan efek toksik pada tikus.

Berdasarkan hasil pengkajian toksisitas di atas dapat disimpulkan bahwa ISP tidak memberikan pengaruh toksik.

IV. Kesimpulan

Atas dasar uraian tentang informasi genetik dari ISP; pengkajian alergenitas dan toksisitas ISP, maka dapat disimpulkan bahwa ISP dapat dinyatakan aman untuk dikonsumsi sebagai bahan pangan.