

Ringkasan Pengkajian Keamanan Pangan Jagung PRG *Event 3272*

I. Pendahuluan

Jagung PRG *event 3272* adalah produk perusahaan Syngenta yang diklaim dikembangkan untuk memberikan manfaat untuk peningkatan produksi etanol dari jagung. Jagung PRG *event 3272* menghasilkan enzim AMY797E dan enzim PMI (*phosphomannose isomerase*). Jagung PRG *event 3272* telah memperoleh sertifikat aman pangan di 6 negara yaitu Amerika Serikat (2007), Australia (2008), Filipina (2008), Kanada (2008), Meksiko (2008), dan Rusia (2010).

Sesuai dengan 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 jagung PRG *event 3272* 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

Jagung PRG *event 3272* mengandung dua gen interes yaitu gen AMY797E dan gen PMI. Gen AMY797E mengkode produksi enzim AMY797E, yang bertanggung jawab mengekspresikan modifikasi enzim amilase untuk menghasilkan etanol, sedangkan gen PMI mengkode produksi enzim PMI yang bertanggung jawab sebagai marka seleksi. Promoter yang digunakan untuk gen AMY797E adalah GZein dari tanaman jagung, dengan terminator 35S dari *cauliflower mosaic virus*; sedangkan untuk gen PMI menggunakan promoter ZmUbi1nt (*Zea mays polyubiquitin*) dari tanaman jagung, dengan terminator NOS (*nopaline synthase*) dari *Agrobacterium tumefaciens*.

II.2 Sumber Gen Interes

Gen AMY797E berasal dari mikroorganisme hipertermofilik *Thermococcales spp.*, sedangkan gen PMI berasal dari *Escherichia coli*. [Negrotto, D., Jolley, M., Beer, S., Wenck, A. R., Hansen, G., 2000, "The Use of Phosphomannose-Isomerase as a Selectable Marker to Recover Transgenic Maize Plants (*Zea mays L.*) via *Agrobacterium Transformation*", Plant Cell Rep. 19: 798-803].

II.3 Sistem Transformasi

Jagung PRG *event 3272* dirakit menggunakan eksplan *immature embryos* yang berasal dari galur *Zea mays* milik Syngenta melalui teknik transformasi mediasi *Agrobacterium tumefaciens*. Melalui metode tersebut, elemen genetik pada daerah *left* dan *right border* dari vektor transformasi pNOV7013 yang mengandung dua gen interes AMY797E dan PMI, secara efisien ditransfer dan diintegrasikan ke dalam genom sel tanaman, sedangkan elemen genetik yang berada di luar daerah *border* tersebut tidak ikut dipindahkan. Keberadaan gen AMY797E dan PMI, serta tidak adanya gen tahan

antibiotik *spectinomycin* (*aadA*), diuji dengan analisis PCR TaqMan[®] pada planlet yang beregenerasi. Tanaman yang menunjukkan positif dua gen AMY797E dan PMI, dan negatif untuk *aadA*, dipindahkan ke rumah kaca dan digunakan untuk perbanyakan lebih lanjut.

II.4 Stabilitas Genetik

Analisis molekuler dengan *Southern blot* telah dilakukan untuk melihat stabilitas gen sisipan dari generasi ke generasi. Hasilnya menunjukkan bahwa gen sisipan tersebut stabil pada empat generasi silang balik. Sifat yang diintroduksi mengalami segregasi sebagai lokus tunggal dan mengikuti prinsip segregasi hukum Mendel.

Data karakterisasi molekuler yang diperoleh menunjukkan bahwa jagung PRG *event* 3272 mempunyai satu kopi sisipan utuh (*single intact insertion*) transgen (gen AMY797E dan gen PMI). Hal ini ditunjukkan dengan analisis *Southern blot* dan *sequencing* langsung DNA sisipan. Analisis *Southern blot* juga menunjukkan bahwa elemen genetik dari *vector backbone* tidak dijumpai dalam jagung PRG *event* 3272. Stabilitas genetik jagung PRG *event* 3272 dilaporkan dalam bentuk *company report* (*Report No. SSB-005-05*) Syngenta Biotechnology, Inc. dengan judul “*Stability of Amy797e α -Amylase and Phosphomannose Isomerase (PMI) Expression Over Multiple Generation in Maize (Corn) Derived from Event 3272*” (*Protocol No. AMY-04-02*) oleh Kim Hill pada tahun 2005.

Berdasarkan hasil pengkajian informasi genetik disimpulkan bahwa:

- a. jagung PRG *event* 3272 mengandung satu kopi gen AMY797E dan gen PMI;
- b. promotor yang digunakan untuk gen AMY797E adalah GZein dari tanaman jagung, dengan terminator 35S dari *cauliflower mosaic virus*; sedangkan untuk gen PMI menggunakan promotor ZmUbilnt (*Zea mays* polyubiquitin) dari tanaman jagung, dengan terminator NOS (*nopaline synthase*) dari *Agrobacterium tumefaciens*.
- c. jagung PRG *event* 3272 tidak mengandung sekuen *backbone* dari plasmid transformasi pNOV7013;
- d. dua gen interes (AMY797E dan PMI) yang diintroduksi ke jagung PRG *event* 3272 masih stabil pada empat generasi silang balik; dan
- e. dua gen interes (AMY797E dan PMI) yang diintroduksi ke jagung PRG *event* 3272 diwariskan mengikuti hukum Mendel.

III. Informasi Keamanan Pangan

III.1 Kesepadanan Substansial

Hasil pengkajian kesepadanan substansial dari jagung PRG *event* 3272 ini diperoleh setelah memperhatikan 3 (tiga) dokumen sebagai berikut: (1) Jawaban kuesioner keamanan pangan jagung *event* 3272 (PT. Syngenta Indonesia, 2010), (2) *Event 3272 Maize: Application for Direct Use as Food, Feed and for Processing* (Syngenta Philippines, Inc., 2008), dan (3) *Compositional Analysis of Grain and Forage from Transgenic Maize Event 3272 with an Introduced Alpha-Amylase (AMY797E) Enzyme* (Philip Brune, 2010), Syngenta Seeds Biotechnology Report No. SSB-101-05 A1.

Dokumen yang ketiga ini menggantikan *company report* yang dikeluarkan sebelumnya pada tanggal 1 Agustus 2005.

Untuk tujuan pengkajian kesepadanan substansial ini, baik jagung PRG *event 3272* maupun jagung non PRG, ditanam di Amerika Serikat oleh pihak perusahaan di 6 (enam) lokasi berbeda pada tahun 2003 dan di 7 (tujuh) lokasi berbeda pada tahun 2004. Lokasi penanaman tahun 2003 adalah di Bondville IL, Bloomington IL, Shirley IL, Stanton MN, Fairbault MN, dan Glidden IA, sedangkan pada tahun 2004 ditanam di Brookings SD, Stanton MN, Janesville WI, Glidden IA, Washington IA, Bondville IL, dan Bloomington IL. Di seluruh lokasi kecuali di Bloomington IL pada tahun 2004, biji-bijian dan seluruh bagian tanaman jagung (*forage*) hanya dipanen untuk tujuan pengkajian kesepadanan substansial ini. Sedangkan di Bloomington IL pada penanaman tahun 2004 hanya dipanen seluruh bagian tanaman jagung (*forage*) untuk tujuan pakan ternak.

Analisis komposisi biji jagung dan tanaman jagung dilakukan oleh Covance Laboratories Inc., Madison, WI. Laboratorium ini dinyatakan telah menerapkan GLP (*Good Laboratory Practices*). Berikut ini adalah analisis komposisi yang dilakukan untuk biji jagung: kadar proksimat (air, protein, karbohidrat, lemak, dan abu), pati, *acid detergent fiber* (ADF), *neutral detergent fiber* (NDF), *total dietary fiber* (TDF), mineral (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P, K, Na, Zn, dan Se), komposisi asam amino, komposisi asam lemak, kriptoxantin, vitamin (beta-karoten, asam folat, B₁, B₂, niasin, B₆, C, dan E), inositol, metabolit sekunder dan anti-nutrien termasuk asam ferulik dan p-kumarik, furfural, asam fitat, rafinosa, dan tripsin inhibitor. Untuk tanaman jagung dilakukan analisis komposisi sebagai berikut: kadar proksimat (air, protein, karbohidrat, lemak, dan abu), pati, *acid detergent fiber* (ADF), *neutral detergent fiber* (NDF), *total dietary fiber* (TDF), dan mineral (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P, K, Na, dan Zn).

Data analisis statistik komposisi biji dan tanaman jagung PRG *event 3272* dan jagung non PRG dilaporkan secara lengkap pada laporan *Event 3272 Maize: Application for Direct Use as Food, Feed and for Processing* (Syngenta Philippines, Inc., 2008), tertuang pada Lampiran 5, Tabel 1 (komposisi proksimat, ADF dan NDF tanaman jagung), Tabel 2 (komposisi mineral tanaman jagung), Tabel 3 (komposisi proksimat, ADF, NDF, TDF, dan pati biji jagung), Tabel 4 (komposisi mineral biji jagung), Tabel 5 (komposisi vitamin biji jagung), Tabel 6 (komposisi asam lemak biji jagung), Tabel 7 (komposisi asam amino biji jagung), dan Tabel 8 (komposisi anti-nutrien dan metabolit sekunder biji jagung). Semua hasil analisis statistik ini dibandingkan dengan *database* komposisi tanaman pangan dari ILSI (2006, *International Life Sciences Institute Crop Composition Database Version 3.0*. <http://www.cropcomposition.org>) dan OECD [2002, *Consensus Document on Compositions Consideration for New Varieties of Maize (Zea mays): Key Food and Feed Nutrients, Anti-Nutrients and Secondary Plant Metabolites*. Publication No. 6, 2002. ENV/JM/MONO (2002)].

Hasil analisis proksimat dan serat (ADF, NDF, dan TDF) biji jagung pada beberapa komponen menunjukkan adanya perbedaan nyata pada sebagian pasangan hibridnya, tetapi masih masuk ke dalam kisaran komposisi yang dilaporkan ILSI (2006) dan OECD (2002). Demikian juga untuk komponen-komponen yang lainnya. Hasil analisis komponen anti-nutrien dan metabolit sekunder pada umumnya masuk ke dalam kisaran

data ILSI (2006) dan OECD (2002). Hasil analisis komposisi tanaman jagung masuk ke dalam kisaran data yang dilaporkan ILSI (2006).

Dari hasil pengkajian kesepadanan substansial di atas dapat disimpulkan bahwa jagung PRG event 3272 sepadan secara substansial dengan jagung non PRG.

III.2 Alergenisitas

Jagung PRG event 3272 mengekspresikan gen AMY797E sebagai enzim *alpha-amylase* (AMY797E) yang stabil dalam pemanasan (*thermostable alpha-amylase enzyme*) yang dapat digunakan dalam produksi bahan bakar etanol *dry-grind* (*dry-grind fuel ethanol production*).

III.2.1 Homologi dengan Alergen

Enzim AMY797E tidak berasal dari sumber yang sudah diketahui sebagai penyebab alergi. Organisme donor dari enzim AMY797E berasal dari mikroorganisme hipertermofilik *Thermococcales spp.* yang diketahui bukan sebagai sumber yang bersifat alergen. (Richardson, T.H., Tan, X., Frey, G., Callen, W., Cabell, M., Lam, D., Macomber, J., Short, J.M., Robertson, D.E. and Miller, C., 2002, *A Novel, High Performance Enzyme for Starch Liquefaction*, *Journal of Biological Chemistry* Vol. 277, No. 29: 26501-26507).

Gen AMY797E difusikan dengan gen *N-terminal signal sequence* jagung yang terdiri dari 19 asam amino (GZein ss) dan C-terminal SEKDEL *endoplasmic reticulum retention signal* (ER rs). (Lanahan, M.B., Basu, S.S., Batie, C.J., Chen, W., Joyce, C. and Kinkema, M. 2003. *Self-Processing Plants and Plant Parts*. *US Patent Application Publication Number US2003/0135885 A1*).

Enzim AMY797E yang dihasilkan mengkatalisis hidrolisis pati pada ikatan α -1,4-glukosidik menjadi dekstrin, maltosa, dan glukosa. Enzim ini bersifat termostabil. Enzim *chimeric* AMY797E ("797GL3") terdiri dari 4 fragmen BD5031, 2 fragmen BD5064 dan 3 fragmen BD5063. Adanya fragmen *signal* tambahan membuat enzim diarahkan dan diekspresikan dalam retikulum endoplasma untuk optimasi ekspresi protein. Setelah penguraian sekuen N-terminal diperoleh enzim AMY797E (50,2 kDa).

Hasil analisis yang dilakukan di Syngenta Biotechnology, Inc., USA, menunjukkan bahwa enzim AMY797E mempunyai keidentikan asam amino 93% terhadap enzim **alfa amilase dari isolat BD5088 yang telah dinyatakan *generally recognized as safe* (GRAS)** berdasarkan kategori US FDA.

III.2.2 Konsentrasi Protein Enzim AMY797E dan Enzim PMI

Ekstraksi protein AMY797E dan PMI dilakukan dari tanaman utuh dan serbuk sari. Kuantifikasi protein dilakukan dengan ELISA menggunakan antibodi poliklonal yang berasal dari kambing. (De Fontes J., and Kramer, C., 2005, *A Quantification of AMY797E and PMI Proteins in Transgenic Maize (Corn) Tissues and Whole Plants Derived from Event 3272*, Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-028-04 A1. *Unpublished*).

Konsentrasi enzim AMY797E tertinggi ditemukan pada biji. Ekspresi gen ini stabil selama 4 generasi pada kisaran 1147- 1369 mcg/g berat basah. Enzim PMI terdeteksi pada berbagai jaringan dan fase pertumbuhan dengan kisaran 8 – 8,5 mcg/g berat basah dan tertinggi pada serbuk sari, sedangkan konsentrasi rata-rata pada biji adalah 0,4 mcg/g berat basah. Ekspresi enzim PMI stabil selama 4 generasi yaitu pada 6,6 – 8,6 mcg/g berat basah.

Semua metoda uji enzim PMI mengacu pada Freeze, H.H., 2002, *Phosphomannose Isomerase*. In.: *Handbook of Glycosyltransferase and Related Genes*. Edition 1. Taniguchi, N., Honke, K. and Fukuda, M., Eds; Springer-Verlag, Tokyo and New York, pp. 595-599.

III.2.3 Studi Bioinformatik

Sekuen asam amino enzim AMY797E dan enzim PMI dibandingkan dengan *Database Allergen* (versi 4.0) *Syngenta Biotechnology Inc.* (SBI), *Database Alergen* SBI tersebut memuat informasi sekuen asam amino yang diketahui sebagai protein alergen, termasuk gliadin (SBI *Allergen* versi 4.0, 2005).

Keseluruhan homologi juga diuji dengan membandingkan sekuen peptida 80 asam amino dari sekuen enzim AMY797E dan enzim PMI. Selain itu dilakukan penapisan terhadap sekuen enzim AMY797E dan enzim PMI untuk mencocokkan keberadaan delapan atau lebih asam amino yang berdekatan sebagai daerah yang menunjukkan lokasi atau identitas epitop umum pengikatan IgE.

Hasil analisis menunjukkan bahwa tidak ada kemiripan signifikan antara salah satu sekuen peptida 80 asam amino dari enzim AMY797E maupun enzim PMI dengan data yang terdapat dalam *database* alergen SBI. Ada satu daerah homologi sekuen dari peptida delapan asam amino yang identik (*contiguous identical amino acids*) antara AMY797E dan protein Per a 3 (alergen spesifik) dari kecoa Amerika. Epitop pengikatan IgE Per a 3 telah berhasil diidentifikasi dan tidak ada tumpang tindih (*overlap*) antara epitop pengikatan IgE tersebut dan daerah sekuen homologi pada enzim AMY797E. Dengan demikian, keidentikan sekuen antara enzim AMY797E dan Per a 3 tidak relevan secara biologis, sehingga enzim AMY797E tidak berpotensi menimbulkan alergi. (Wu, C.H., Lee, M.L. and Tseng, Y., 2003, *IgE-Binding Epitopes of the American Cockroach Per a 3 Allergen*, *Allergy* 58: 986-992).

Hasil analisis homologi sekuen asam amino PMI dengan semua alergen yang diketahui menunjukkan bahwa secara keseluruhan tidak ditemukan homologi sekuen asam amino dengan protein alergen manapun. Terdapat satu lokasi pada perbandingan homologi sekuen delapan asam amino yang identik dengan suatu alergen yaitu α -*parvalbumin* dari spesies Katak *Rana* CH2001 (*unidentified edible frog*). Uji selanjutnya di laboratorium Hilger (penemu parvalbumin) menggunakan PMI dari *E. coli* rekombinan menunjukkan tidak ada reaktivitas silang diantara IgE serum pasien yang alergi terhadap katak dan PMI. Dengan demikian adanya keidentikan sebagian kecil sekuen antara enzim PMI dan α -*parvalbumin* dari spesies Katak *Rana* CH2001 tidak berarti secara biologis sehingga enzim PMI tidak berpotensi menimbulkan alergi. (Hilger, C., Grigioni, F., Thill, L., Mertens, L. and Hentges, F. (2002), *Severe IgE Mediated Anaphylaxis Following Consumption of Fried Frog Legs : Definition of α -Parvalbumin as the Allergen in Cause*, *Allergy* 57:1053-1058).

III.2.4 Uji Daya Cerna *in vitro* Enzim AMY797E dan Enzim PMI

Kepekaan enzim AMY797E terhadap degradasi proteolitik dievaluasi dengan simulasi cairan lambung hewan mamalia (SGF) yang mengandung pepsin. Dalam SGF, enzim AMY797E terurai dalam waktu 5 menit sehingga diperkirakan dapat segera tercerna dalam kondisi pencernaan mamalia. (De Fontes, J. and Kramer, C. 2005, *In vitro Digestibility of AMY797E α -Amylase (Test Substance AMY797E-0104) Under Simulated Mammalian Gastric Conditions*, Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-034-04 A1. *Unpublished*).

Di dalam SGF, enzim PMI segera terurai dalam waktu 2 menit. Sehingga diperkirakan dapat segera tercerna dalam kondisi pencernaan hewan mamalia.

III.2.5 Analisis Stabilitas Panas Protein Enzim AMY797E dan Enzim PMI

Enzim AMY797E dipilih untuk perakitan jagung PRG *event* 3272 karena bersifat termostabil dan masih beraktivitas pada suhu tinggi. Kondisi ini diperlukan untuk menghidrolisis pati dalam pengolahan jagung, khususnya untuk produksi etanol. Walaupun enzim AMY797E adalah protein yang stabil dalam pemanasan, stabilitas terhadap panas bukanlah satu-satunya indikasi bahwa suatu protein mempunyai risiko menimbulkan alergi. Protein penyebab alergi (alergen) dalam pangan biasanya stabil dalam pemanasan, meskipun demikian tidak semua protein yang stabil dalam pemanasan adalah protein penyebab alergi (alergen).

Ada beberapa karakteristik yang menguatkan bahwa enzim AMY797E tidak bersifat alergen yaitu: sumber protein (*Thermococcales spp.*) bukanlah organisme yang diketahui menyebabkan alergi; sekuen asam aminonya tidak homolog dengan alergen; konsentrasinya kecil di dalam PRG; dan protein ini tidak tahan enzim pencernaan. Disamping itu, enzim AMY797E tidak akan dikonsumsi langsung karena hanya dipakai sebagai katalisator hidrolisis pati (yang selanjutnya akan diproses menjadi etanol), dan produk sampingnya akan diberikan ke hewan. Enzim AMY797E diketahui memiliki kemiripan 17% dalam hal sekuen asam amino dan tidak memiliki kemiripan dalam hal peptida delapan asam amino (epitop pengikatan IgE) dengan alfa amilase *Aspergillus oryzae* yang dipakai di industri roti yang pada orang tertentu dilaporkan menimbulkan beberapa reaksi alergi. Informasi tambahan lain adalah protein ini tidak terglisosilasi. [Kramer, C. 2005. *Characterization of Lyophilised Amylase Test Substance (AMY797E-0104) and Certificate of Analysis*. Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-027-04. *Unpublished*]

Enzim PMI stabil sekurang-kurangnya selama 30 menit pada suhu 25°C, tetapi menjadi tidak stabil pada suhu $\geq 37^\circ\text{C}$. Pada suhu 65°C ditemukan aktivitas enzimatik yang sangat kecil dan pada suhu 95°C terjadi kehilangan seluruh aktivitas enzimatik. (Stacy, C., Li, X., and G. Graser. 2006. "Effect of Temperature on the Stability of Phosphomannose Isomerase (PMI) from Test Substance PMI-0198", Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-154-06. *Unpublished*).

Enzim PMI tidak mengandung deretan asam amino yang diperlukan bagi reaksi glikosilasi, ekspresinya tidak diarahkan ke jalur glikosilasi. Enzim PMI yang dihasilkan oleh *E. coli* tidak mungkin terglisosilasi karena bakteri tidak mampu melakukan reaksi tersebut. (Taylor, S.L. and Hefle, S.L. (2001) *Will Genetically Modified Foods be*

Allergenic? Journal of Allergenicity and Clinical Immunology 107(5):765-771. FAO/WHO (2001). *Evaluation of Allergenicity of Genetically Modified Foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology*. 22-25 January 2001. Rome, Italy).

Berdasarkan hasil pengkajian alergenitas dapat disimpulkan bahwa:

- a. Enzim AMY797E tidak berasal dari sumber protein alergen yang sudah diketahui. Organisme donor dari enzim AMY797E adalah *Thermococcales spp.* yang diketahui bukan merupakan sumber alergen.
- b. Gen PMI berasal dari *E. coli* yang bukan merupakan sumber alergen. Bakteri tersebut tidak mempunyai riwayat atau sejarah alergenitas. Enzim PMI tidak dikonsumsi langsung oleh manusia.
- c. Enzim AMY797E dan enzim PMI tidak terglisosilasi.
- d. Enzim AMY797E dan enzim PMI tidak mempunyai homologi sekuen asam amino dengan protein alergen yang sudah diketahui.
- e. Enzim PMI sangat tidak stabil terhadap pemanasan dan menjadi tidak aktif pada suhu 95°C.
- f. Enzim AMY797E dan enzim PMI bersifat peka terhadap cairan lambung dan akan cepat terurai dalam simulasi cairan lambung yang mengandung pepsin. Dengan demikian seandainya termakan, enzim AMY797E dan enzim PMI akan segera terurai dalam pencernaan mamalia sebagaimana dengan protein yang lain.

III.3 Toksisitas

III.3.1 Analisis Homologi Sekuen Asam Amino dengan Protein Toksin

1. Enzim AMY797E

Analisis homologi sekuen asam amino dengan protein toksin telah dilakukan terhadap enzim AMY797E dan hasilnya dilaporkan sebagai *company report* (Report No: SSB-126-09) dengan judul “*AMY797E: Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known*” oleh Brian Harper, tanggal 18 Pebruari 2009. Penelitian dilaksanakan di Syngenta Biotechnology, Inc., Regulatory Science, USA. Laboratorium ini dinyatakan telah menerapkan GLP (*Good Laboratory Practices*).

Program *BLASTP* (Altschul *et. al*, 1997) digunakan untuk mencari *NCBI Entrez Protein database* dengan prekursor AMY797E sebagai *query sequence*. Enzim AMY797E disebut sebagai protein alfa-amilase sintetik. Hasil pencarian menggunakan *NCBI Entrez Protein*, teridentifikasi 2057 sekuen asam amino yang serupa dengan enzim AMY797E, dan sejumlah 2053 sekuen merupakan protein yang terkait dengan metabolisme karbohidrat dari 585 spesies atau hasil konstruksi sintetik. Hal ini menunjukkan bahwa tidak satupun dari protein tersebut teridentifikasi sebagai protein toksin, sehingga dapat disimpulkan bahwa sekuen asam amino enzim AMY797E tidak homolog dengan protein toksin. (Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402).

2. Enzim PMI

Analisis homologi sekuen asam amino dengan protein toksin telah dilakukan terhadap enzim PMI dan hasilnya dilaporkan sebagai *company report* (Report No: SSB-125-09) dengan judul “*Phosphomannose Isomerase (Entrez Database Accession No. AAA24109): Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Toxins*” oleh Brian Harper, tanggal 18 Pebruari 2009. Penelitian dilaksanakan di Syngenta Biotechnology, Inc., Regulatory Science, USA. Laboratorium ini dinyatakan telah menerapkan GLP (*Good Laboratory Practices*).

Program *BLASTP* digunakan untuk mencari *NCBI Entrez Protein database* dengan PMI sebagai *query sequence*. Hasil pencarian menggunakan *NCBI Entrez Protein*, teridentifikasi 580 sekuen asam amino yang serupa dengan enzim PMI, tetapi tidak ada satupun yang dikenal sebagai protein toksin, sehingga dapat disimpulkan bahwa sekuen asam amino enzim PMI tidak homolog dengan protein toksin.

III.3.2 Toksisitas Akut pada Mencit

1. Enzim AMY797E

Pengujian telah dilakukan terhadap enzim AMY797E dan hasilnya dilaporkan sebagai *company report* (Report No: CTL Study number: AM7506; Document number: CTL/AM7506/REG/REPT REV 001) dengan judul “*CT/AM7506/Regulatory/Report Revision 001. AMY797E-0104: Single Dose Oral Toxicity Study in the Mouse*” oleh E. Barnes, tanggal 2 Agustus 2007. Penelitian dilaksanakan di Central Toxicology Laboratory, UK. Laboratorium ini dinyatakan telah menerapkan GLP (*Good Laboratory Practices*).

Pengujian menggunakan mencit galur Alpk:AP_fCD-1, berumur 8-12 minggu, yang dibagi ke dalam dua kelompok, dengan jumlah mencit per kelompok masing-masing 5 ekor mencit jantan dan 5 ekor mencit betina (total 20 ekor mencit). Mencit ditempatkan dalam kandang, yang masing-masing kandang berisi 5 ekor mencit, dan penempatan mencit jantan dan mencit betina dipisahkan. Bahan uji berupa tepung AMY797E-0104 berwarna putih yang mengandung 42% enzim AMY797E, larutan CMC 0,5% digunakan sebagai pelarut protein yang diujikan. Ransum yang diberikan berupa CTI *powder* (*Special Diet Services Ltd., Witham, Essex, UK*) dan air minum yang diberikan berasal dari air keran.

Pengujian dilakukan selama 15 hari terhadap dua kelompok mencit, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Mencit kelompok kontrol tidak diberikan enzim AMY797E. Kelompok perlakuan diberi tepung AMY797E-0104 sebanyak 3600 mg/kg berat badan yang setara dengan dosis enzim AMY797E 1511 mg/kg berat badan. Mencit dicekok (*gavage*) dengan larutan kontrol dan larutan perlakuan sebanyak masing-masing 2,0 ml/100 g berat badan, pada hari pertama percobaan dan hanya diberikan satu kali (*one single dose*). Ransum dan air minum diberikan secara *ad libitum*.

Hasil percobaan menunjukkan bahwa tidak ditemukan tanda-tanda klinis yang disebabkan oleh pemberian enzim AMY797E; tidak terdapat perbedaan antara

kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dalam hal berat badan mencit, konsumsi ransum, parameter hematologi, kimia darah klinis, dan berat organ. Pada pengamatan mikroskopis, sejumlah kecil lesi (luka) terdapat pada semua kelompok, dan hal ini dianggap spontan, sehingga tidak berhubungan dengan perlakuan.

Penelitian ini menyimpulkan bahwa enzim AMY797E tidak memberikan pengaruh toksik terhadap mencit pada pemberian dosis tunggal 1511 mg/kg berat badan.

2. Enzim PMI

Pengujian telah dilakukan terhadap enzim PMI dan hasilnya dilaporkan sebagai *company report* (Report No:4708-98) dengan judul "*Phosphomannose Isomerase (Sample PMI-0198) Acute Oral Toxicity in Mice*" oleh Janice O. Kuhn. Penelitian dilaksanakan dari tanggal 3 Desember 1998 sampai 11 Agustus 1999 di Stillmeadow, Inc., 12852 Park One Drive, Sugar Land, TX 77478. Laboratorium ini dinyatakan telah menerapkan GLP (*Good Laboratory Practices*).

Pengujian menggunakan *Albino mice*, HSD:ICR, berumur sekitar 1 bulan, dengan jumlah 13 ekor mencit jantan dan 11 ekor mencit betina (*nulliparous and non-pregnant*). Mencit ditempatkan dalam kandang yang terbuat dari bahan polikarbonat yang ditutup dengan anyaman kawat, yang masing-masing kandang berisi 1 (satu) ekor mencit, dan penempatan mencit jantan dan mencit betina dipisahkan. Bahan uji berupa tepung enzim PMI berwarna putih, bahan yang digunakan sebagai kontrol adalah larutan CMC 0,5 %. Ransum yang diperoleh dari Purina Mills Inc, Formulab #5008 dan air minum yang berasal dari air keran diberikan secara *ad libitum*.

Pengujian toksisitas akut dilakukan selama 14 hari terhadap dua kelompok mencit, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan terdiri atas 7 ekor mencit jantan dan 6 ekor mencit betina; sedangkan kelompok kontrol terdiri atas 6 ekor mencit jantan dan 5 ekor mencit betina. Mencit kelompok kontrol diberi secara dicekok larutan CMC 0,5% dengan dosis 25,25 ml/kg berat badan. Kelompok perlakuan diberi larutan enzim PMI secara cekok dengan dosis 5050 mg/kg berat badan yang dilarutkan dalam larutan CMC 0,5% untuk memperoleh konsentrasi sekitar 20% (berat/volume), sebanyak 25,25 ml/kg berat badan. Dikarenakan besarnya volume, maka pemberian bahan uji dan kontrol dilakukan dua kali dengan selang waktu sekitar 1 jam.

Hasil percobaan menunjukkan bahwa tidak terdapat mencit yang mati akibat konsumsi enzim PMI yang diuji selama percobaan dilaksanakan. Satu ekor mencit jantan dari kelompok kontrol mati dan tiga ekor mencit betina dari kelompok uji mati, semuanya akibat kesalahan pencekokan pada hari ke-0. Tidak terdapat tanda-tanda klinis akibat toksisitas selama percobaan dilaksanakan. Hasil *necropsy* pada hewan di akhir percobaan tidak menunjukkan adanya kelainan pada organ dalam (hati, limfa, ginjal, termasuk otak). Nilai LD50 yang dihitung dari percobaan toksisitas akut adalah lebih besar dari 5050 mg/kg berat badan.

Penelitian ini menyimpulkan bahwa enzim PMI termasuk dalam golongan zat yang tidak toksik (*practically non toxic*).

III.3.3 Evaluasi pada Ayam Broiler

Evaluasi pada ayam broiler telah dilakukan terhadap jagung PRG *event 3272* dan hasilnya dilaporkan sebagai *company report* dengan judul "*Evaluation of Event 3272 Transgenic Maize (Corn) in Broiler Chickens*" oleh John T. Brake, dilaporkan tanggal 22 Agustus 2005 di Department of Poultry Science, North Carolina State University, Chicken Educational Unit, Lake Wheeler Road Field Laboratory, 4108 Lake Wheeler Road, Raleigh, North Carolina, USA 27603. Laboratorium ini dinyatakan telah menerapkan GLP (*Good Laboratory Practices*).

Penelitian ini bertujuan untuk menguji dampak merugikan dari ransum ayam yang dibuat dengan menambahkan jagung PRG *event 3272* pada ayam broiler (jantan dan betina).

Penelitian menggunakan tiga jenis jagung yaitu: biji jagung PRG (*event 3272 positive*), jagung hibrida (*event 3272 negative*) dan jagung lokal non PRG (NC 2004, NC = North Carolina) yang digunakan sebagai pembanding. Ayam yang digunakan adalah ayam broiler galur Ross 344 jantan dan Ross 308 betina, berumur 1 hari. Semua ayam yang digunakan berjumlah 900 ekor (450 ekor jantan dan 450 ekor betina). Ayam dibagi menjadi 36 kandang, masing-masing kandang berisi 25 ekor ayam (jantan dan betina dipisahkan). Percobaan dilaksanakan selama 49 hari; data berat badan diukur pada hari ke-1, ke-21, ke-35 dan ke-49. Ransum dan air diberikan secara *ad libitum*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pertumbuhan ayam sangat baik. Pada hari ke-49, berat rata-rata ayam jantan mencapai 3613 gram, sedangkan ayam betina mencapai 2825 gram. Berat rata-rata ayam yang diberi ransum mengandung biji jagung PRG tidak berbeda dengan ayam yang diberi jagung hibrida, tetapi ayam yang diberi ransum jagung lokal sedikit lebih berat (sekitar 68 gram) dibandingkan dengan kedua grup tersebut. Namun berdasarkan rasio konversi ransum yang dikonsumsi terhadap berat badan sampai hari ke-49, ternyata tidak ada perbedaan diantara 3 kelompok ransum tersebut. Sampai hari ke-49 tidak terdapat ayam yang mati dari ketiga kelompok ransum tersebut. Hasil analisis karkas ayam betina menunjukkan tidak ada perbedaan diantara ketiga kelompok ransum, tetapi kelompok ayam jantan yang diberi ransum biji jagung hibrida berat pahunya lebih ringan dibandingkan dengan kelompok yang diberi biji jagung PRG maupun jagung lokal. Namun hal ini dianggap tidak terlalu berpengaruh dan tidak konsisten dengan data lain.

Penelitian ini menyimpulkan bahwa ransum yang mengandung jagung PRG *event 3272* dapat mendukung pertumbuhan ayam broiler, dengan angka kematian yang sangat rendah (nol), angka konversi ransum yang baik, dan tidak mempengaruhi hasil dan kualitas karkas. Dari studi ini dibuktikan bahwa jagung PRG *event 3272* tidak memberikan efek merugikan pada ayam broiler.

Dari hasil pengkajian toksisitas di atas dapat disimpulkan bahwa enzim AMY797E dan enzim PMI tidak homolog dengan protein toksin; enzim AMY797E bersifat tidak toksik dan enzim PMI termasuk dalam golongan zat yang tidak toksik (*practically non toxic*); serta jagung PRG *event 3272* tidak memberikan dampak merugikan pada ayam broiler.

IV. Kesimpulan

Atas dasar uraian tentang informasi genetik gen AMY797E yang diperoleh dari mikroorganisme hipertermofilik *Thermococcales spp.* dan gen PMI dari *Escherichia coli* yang disisipkan dalam jagung PRG *event* 3272; analisis kesepadanan substansial antara komposisi jagung PRG *event* 3272 dengan jagung non PRG; serta analisis alergenitas dan pengujian toksisitas enzim AMY797E dan enzim PMI, maka dapat disimpulkan bahwa jagung PRG *event* 3272 dapat dinyatakan aman untuk dikonsumsi sebagai bahan pangan.

Disarankan bahwa selama jagung PRG *event* 3272 belum memperoleh sertifikat aman lingkungan, maka jika ditemukan adanya biji jagung yang tumbuh (tanaman *volunteer*) harus segera dimusnahkan. Meskipun demikian, karena hal ini terkait dengan aspek keamanan lingkungan, maka saran ini dapat diabaikan apabila jagung PRG *event* 3272 telah memperoleh sertifikat keamanan lingkungan.