

## **Ringkasan Pengkajian Keamanan Pangan Tebu PRG Toleran Kekeringan Event NXI-1T**

### **I. Pendahuluan**

Tebu PRG toleran kekeringan *event* NXI-1T merupakan produk perusahaan PT. Perkebunan Nusantara XI yang diklaim dikembangkan untuk meningkatkan konsentrasi senyawa protektan betain sehingga tebu menjadi toleran kekeringan.

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 tebu PRG toleran kekeringan *event* NXI-1T berdasarkan informasi genetik dan informasi keamanan pangan yang terdiri atas kesepadanan substansial, alergenisitas, dan toksisitas sebagaimana diuraikan di bawah ini.

### **II. Informasi Genetik**

#### **II.1 Elemen Genetik**

Tebu PRG toleran kekeringan *event* NXI-1T mengandung satu transgen interes yaitu *betA* yang menyandi protein *choline dehydrogenase* (CDH), enzim yang mengkatalisis konversi *choline* menjadi *betaine aldehyde*, menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404. Promoter yang digunakan adalah CaMV-35S (35S dari *cauliflower mosaic virus*), dengan terminator NOS (*nopaline synthase*) dari *Agrobacterium tumefaciens*.

#### **II.2 Sumber Gen Interes**

Gen *betA* pada tebu PRG toleran kekeringan *event* NXI-1T berasal dari hasil isolasi bakteri *Escherichia coli*, yaitu bakteri gram negatif yang biasa dijumpai dalam usus organisme berdarah hangat.

#### **II.3 Sistem Transformasi**

Tebu PRG toleran kekeringan *event* NXI-1T dirakit melalui transformasi plasmid rekombinan pMLH 2113 ke jaringan tanaman tebu non PRG varietas CF 1426, menggunakan agensia biologis *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404. Selain gen interes *betA*, plasmid rekombinan tersebut mengandung gen ketahanan terhadap antibiotika kanamisin (Kan') atau *NPT II* dan higromisin (Hyg') atau *HPT*. Gen *betA* dan Hyg' berada dalam kaset ekspresi gen dengan promoter CaMV-35S dan terminator T35S, sedangkan gen Kan' diapit oleh promoter Pnos di ujung 5'nya dan terminator Tnos di ujung 3'nya. Di antara promoter CaMV-35S dan gen *betA* terdapat transit peptida dari mitokondria tomat untuk mengarahkan enzim CDH ke dalam organel mitokondria.

Berdasarkan data dan informasi yang disampaikan oleh pemohon, komponen-komponen genetik di dalam plasmid rekombinan tersebut, biasa digunakan dalam perakitan tanaman PRG. Jumlah kopi DNA sisipan (*insert*) pada tebu PRG toleran kekeringan varietas CF 1426 *event* NXI-1T adalah dua kopi.

## II.4 Stabilitas Genetik

Hasil analisis molekuler dengan PCR, tebu PRG toleran kekeringan *event* NXI-1T menunjukkan bahwa gen *betA* telah ada dan stabil pada genom tebu PRG. Analisis PCR juga dilakukan pada genom DNA dari tebu PRG yang diperbanyak secara vegetatif pada generasi pertama, kedua, ketiga dan hasilnya menunjukkan bahwa gen *betA* stabil keberadaannya pada tiga generasi. Dari data hasil analisis PCR tersebut tebu PRG toleran kekeringan *event* NXI-1T dapat dijamin stabilitas genetiknya karena perbanyakannya dilakukan secara vegetatif melalui stek batang/bagal tebu. (Bambang Sugiharto, Nurmalasari dan Andika Suminingrum. Karakter Biomolekul dan Biokimia Tebu PRG Toleran Kekeringan: Keberadaan, Stabilitas dan Ekspresi Gen Target (Gen *Beta*), 2010, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jember dan Laboratorium Biologi, PT. Perkebunan Nusantara XI (Persero))

Berdasarkan hasil pengkajian informasi genetik dapat disimpulkan bahwa :

1. tebu PRG toleran kekeringan *event* NXI-1T mengandung dua kopi *insert* gen *betA*;
2. promoter yang digunakan untuk gen *betA* adalah CaMV-35S (35S dari *cauliflower mosaic virus*), dengan terminator NOS (*nopaline synthase*) dari *Agrobacterium tumefaciens*; dan
3. gen interes *betA* yang diintroduksi ke tebu PRG toleran kekeringan *event* NXI-1T masih stabil pada tiga generasi.

## III. Informasi Keamanan Pangan

### III.1 Kesepadanan Substansial

Hasil pengkajian kesepadanan substansial tebu PRG toleran kekeringan *event* NXI-1T diperoleh setelah memperhatikan Laporan “Analisa Kesepadanan Substansial Tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) Toleran Kekeringan *Event* NXI-1T” dari PT. Perkebunan Nusantara XI (Persero), Surabaya tahun 2011.

Untuk tujuan analisis kesepadanan substansial, tebu PRG toleran kekeringan *event* NXI-1T dan tetuanya CF 1426 yaitu tebu non PRG ditanam di kebun percobaan tebu di Nyeoran Vak 5, Pabrik Gula Djatiroto, Lumajang, Jawa Timur pada awal bulan Mei 2010. Pada umur 8 bulan, sampel berupa batang tebu diambil untuk kemudian dilakukan analisis proksimat di Laboratorium Biochem Technology Surabaya yang sudah diakreditasi oleh KAN. Bahan yang digunakan untuk analisis adalah nira tebu dan daun tebu.

Hasil analisis proksimat nira tebu berupa total protein, total lemak, kadar air, kadar abu, karbohidrat, energi, dan gula pereduksi dari tebu PRG toleran kekeringan *event* NXI-1T pada prinsipnya tidak berbeda nyata dengan atau masuk ke dalam kisaran komposisi proksimat dari tebu non PRG. Demikian juga untuk analisis proksimat daun tebu yang terdiri dari total protein, total lemak, kadar air, kadar abu, karbohidrat, energi dan serat kasar.

Berdasarkan hasil pengkajian kesepadanan substansial di atas dapat disimpulkan bahwa tebu PRG toleran kekeringan *event* NXI-1T sepadan secara substansial dengan tebu non PRG.

### III.2 Alergenisitas

Pengujian alergenisitas nira tebu PRG toleran kekeringan *event* NXI-1T dilakukan pada bulan Juli 2009 di Laboratorium BIOMOL, Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Brawijaya Malang, menggunakan modifikasi metode Toward and Broadley (T. J. Toward dan K. J. Broadley. *Early and Late Bronchoconstrictions, Airway Hyper-reactivity, Leucocyte Influx and Lung Histamine and Nitric Oxide After Inhaled Antigen: Effects of Dexamethasone and Rolipram. Clin Exp Allergy* 2004; 34:91–102).

Hewan coba yang digunakan pada pengujian alergenisitas yaitu tikus putih Wistar betina berumur 2-3 bulan, sebanyak 18 ekor, yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu UGM. Kelompok percobaan mencakup kelompok kontrol negatif (KN), kelompok kontrol positif (A) yang diberi ovalbumin kadar 1 mg/ml dengan dosis 2 ml per tikus, kelompok yang diberi nira tebu PRG pada konsentrasi rendah 2000 mg/kg Berat Badan (BB) (NAT 12), kelompok yang diberi nira tebu PRG konsentrasi tinggi 5000 mg/kg BB (NAT 15), dan kelompok yang diberikan campuran nira tebu PRG dan ovalbumin dosis rendah (AT 12) dan dosis tinggi (AT 15). Masing-masing kelompok terdiri dari 3 ekor tikus. Nira tebu didapat dari batang tebu PRG toleran kekeringan *event* NXI-1T yang berumur 11 bulan, dengan cara diblender dan diberikan pada hewan coba tikus putih Wistar dengan pencekakan secara oral.

Uji alergenisitas dilakukan dengan mengukur kadar IgE dalam serum darah hewan coba tikus putih Wistar hari ke-0, ke-6, ke-11, ke-20 dan ke-22 menggunakan Rat IgE ELISA dari Immunology Consultants Laboratory, Inc., Newberg.

Setelah injeksi ovalbumin, kelompok kontrol positif (A) mengalami peningkatan IgE sebesar 17,08% pada hari ke-11 menjadi 271,8 ng/ml, dan meningkat menjadi 19,38% di atas hari ke-0 pada hari ke-20. Pada hari ke-20, kelompok kontrol positif (A) tetap menunjukkan kadar IgE tertinggi dibandingkan kelompok lainnya (KN, NAT12, NAT15, AT12 dan AT15) yaitu 277,14 ng/ml. Sedangkan pada kelompok AT12 tidak terjadi peningkatan kadar IgE bila dibandingkan hari ke-0. Demikian juga pada kelompok KN, NAT12 dan NAT15 bahkan terjadi penurunan kadar IgE bila dibandingkan hari ke-0. Peningkatan kadar IgE terjadi pada kelompok AT15 namun tidak melebihi kelompok A (meningkat 6,14% dibandingkan hari ke-0).

Pada hari ke-22, kelompok kontrol positif (A) secara konsisten menunjukkan peningkatan kadar IgE paling tinggi dibandingkan semua kelompok perlakuan lainnya yaitu sebesar 17,13%. Pengaruh ovalbumin inhalasi meningkatkan kadar IgE pada kelompok AT12 dan AT15 yang meningkat berturut-turut 12,84% dan 10,29%. Pola peningkatan kadar IgE pada kelompok AT12 dan AT15 hari ke-22 adalah serupa dengan hari ke-11, dimana peningkatan kadar IgE terjadi setelah pemberian ovalbumin inhalasi. Namun demikian tidak terjadi peningkatan kadar IgE setelah pencekakan nira karena nilai IgE hari ke-20 justru menurun pada kelompok NAT12 dan NAT15.

Pencekakan secara oral dengan nira tebu PRG toleran kekeringan *event* NXI-1T dengan dosis 2000 mg/kg BB maupun 5000 mg/kg BB tidak meningkatkan kadar IgE lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol positif/alergen (A).

Evaluasi menggunakan bioinformatik dilakukan untuk menentukan homologi protein *choline dehydrogenase* (CDH) yang disandi oleh gen *betA* dengan database alergen. *Sequencing* nukleotida gen *betA* dilakukan oleh Ajinomoto (Australian Patent Office ACT 1990 No 737600). Sekuen asam amino protein CDH diperoleh dengan aplikasi program Bioedit. Selanjutnya sekuen asam amino protein ini menjadi objek analisis bioinformatik.

Analisa bioinformatik menggunakan algoritma FASTA menunjukkan bahwa sekuen asam amino protein CDH tidak mempunyai homologi dengan protein alergen yang telah terdaftar pada *AllergenOnline* ([www.allergenonline.com](http://www.allergenonline.com), [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)). Sekuen asam amino protein dengan kesamaan lebih dari 35% atau lebih dipertimbangkan mempunyai risiko dan potensi *cross-reactivity* sebagai alergen (*Codex Alimentarius Commission, Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Derived from Recombinant-DNA Plants, 2003*). Selanjutnya, algoritma BLASTP digunakan untuk menentukan tingkat homologi protein CDH dengan alergen yang telah didaftarkan dalam *NCBI-Entrez Protein Database*. Hasil evaluasi homologi (*alignment*) sekuen asam amino protein CDH dengan 10 protein yang diketahui sebagai alergen atau *putative allergen* menunjukkan bahwa protein CDH tidak mempunyai potensi atau *cross-reaction* dengan alergen.

Pengujian stabilitas cerna enzim CDH pada nira tebu PRG toleran kekeringan *event* NXI-1T dilakukan dengan menggunakan enzim pepsin dalam dapar SGF (*simulated gastric fluid*) dan enzim tripsin dalam dapar SIF (*simulated intestinal fluid*). Aktivitas enzim CDH dihitung dengan melihat jumlah betain selama 1 jam reaksi dan kandungan betain ditentukan menggunakan alat HPLC. Unit aktivitas CDH disetarakan dengan unit aktivitas *choline oxydase* (Sigma Cat No. C-5896) yang digunakan sebagai standarnya. Penentuan aktivitas enzim CDH dilakukan dengan penyeteraan aktivitas *choline oxydase*, sehingga satu unit enzim CDH setara dengan 1  $\mu\text{mole H}_2\text{O}_2$  yang dihasilkan dari oksidasi 1  $\mu\text{mole choline}$  menjadi *betaine aldehyde* per jam pada pH 7,5 dan suhu 37°C. Dari stokiometri reaksi pembentukan betain dari substrat *choline*, 1  $\mu\text{mole H}_2\text{O}_2$  setara dengan 1  $\mu\text{mole}$  betain.

Pengujian stabilitas cerna menunjukkan bahwa enzim CDH tidak mempunyai ketahanan/stabilitas terhadap pencernaan dan mudah dihancurkan oleh pepsin dan tripsin. Inkubasi protein daun tebu PRG toleran kekeringan *event* NXI-1T dengan enzim pepsin pada 0 menit telah menyebabkan hilangnya aktivitas enzim CDH yang diduga akibat pengaruh pH rendah (1,2) dari dapar SGF yang mengandung pepsin. Inkubasi protein daun tebu PRG toleran kekeringan *event* NXI-1T selama 30 menit dan 60 menit dengan enzim tripsin dalam dapar SIF (pH 7,5) telah menghilangkan sama sekali aktivitas enzim CDH. Hal ini menunjukkan bahwa enzim CDH mudah terdegradasi oleh enzim pepsin atau tripsin pada lambung maupun usus manusia.

Analisis aktivitas dan SDS-PAGE menunjukkan bahwa protein dan aktivitas enzim CDH tidak terdeteksi sesudah inkubasi dengan pepsin atau tripsin selama 30 menit.

Pengujian stabilitas panas dilakukan pada enzim CDH dengan melihat aktivitas enzim CDH pada sampel sesudah perlakuan pemanasan. Stabilitas enzim ditentukan dengan pemanasan nira tebu PRG toleran kekeringan *event NXI-1T* pada suhu 37°C, 60°C dan 100°C selama 30 menit. Hasil pengujian stabilitas panas menunjukkan bahwa enzim CDH kehilangan aktivitasnya sebanyak 20% setelah pemanasan pada suhu 60°C selama 30 menit, sedangkan pemanasan pada suhu 100°C selama 30 menit menghilangkan aktivitasnya.

Berdasarkan hasil pengkajian alergenitas dapat disimpulkan bahwa nira tebu PRG toleran kekeringan *event NXI-1T* yang mengandung enzim CDH tidak menunjukkan adanya potensi menimbulkan alergi.

### III.3 Toksisitas

Pengujian toksisitas akut nira tebu PRG toleran kekeringan *event NXI-1T* dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga tanggal 7-15 Mei 2010. Pengujian menggunakan hewan coba mencit jantan dan betina galur Wistar berumur 2 bulan yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA), Surabaya. Untuk perlakuan uji toksisitas akut, sebanyak 120 ekor mencit jantan dan betina dibagi menjadi 6 kelompok dan masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor jantan dan 10 ekor betina. Setiap kelompok diberi sediaan nira tebu PRG toleran kekeringan *event NXI-1T* dengan dicekok (*gavage*) menggunakan sonde dengan dosis pada kelompok I diberi suspensi CMC Na 0,5% (sebagai kontrol, volume suspensi CMC Na 0,5% 0,5 ml/20 g BB mencit), kelompok II, III, IV, V, dan VI masing-masing diberi sediaan bahan coba nira tebu PRG toleran kekeringan *event NXI-1T* dengan dosis 1,25 g/kg BB (1125 µl/kg BB); 2,5 g/kg BB (2250 µl/kg BB); 5 g/kg BB (4500 µl/kg BB); 10 g/kg BB (9000 µl/kg BB); dan 21 g/kg BB (18900 µl/kg BB). Sebagai ekuivalensi 1 g nira tebu setara dengan 900 µl nira tebu pada uji toksisitas. Pemberian perlakuan nira tebu PRG toleran kekeringan *event NXI-1T* dilakukan satu kali, kemudian dilakukan pengamatan sampai hari ke-14 sesudah perlakuan.

Pemberian sediaan nira tebu PRG toleran kekeringan *event NXI-1T* sampai dengan dosis 21 g/kg BB tidak menimbulkan efek kematian pada hewan coba, maka dapat disimpulkan bahwa sediaan uji nira tebu PRG toleran kekeringan *event NXI-1T* mempunyai LD<sub>50</sub> di atas 21 g/kg BB.

Dari hasil pengkajian toksisitas di atas dapat disimpulkan bahwa nira tebu PRG toleran kekeringan *event NXI-1T* termasuk dalam golongan bahan yang tidak toksik.

#### **IV. Kesimpulan dan Saran**

Atas dasar uraian tentang informasi genetik dari gen *betA*, yang menyandi enzim *choline dehydrogenase* (CDH); pengkajian kesepadanan substansial antara komposisi tebu PRG toleran kekeringan *event NXI-1T* dengan tebu non PRG; serta pengkajian alergenitas dan pengkajian toksisitas nira tebu PRG toleran kekeringan *event NXI-1T*; disimpulkan bahwa tebu PRG toleran kekeringan *event NXI-1T* dapat dinyatakan aman untuk dikonsumsi sebagai bahan pangan.

Disarankan selama belum memperoleh sertifikat keamanan lingkungan, maka tebu PRG toleran kekeringan *event NXI-1T* tidak boleh dibudidayakan.