

Lampiran 1

RINGKASAN PENGKAJIAN KEAMANAN PAKAN KEDELAI PRG *EVENT* GTS 40-3-2

I. PENDAHULUAN

Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 merupakan kedelai produk rekayasa genetik dari PT Bayer Indonesia dengan nama dagang *Roundup Ready® GTS 40-3-2* yang mengandung 1 gen sisipan, yaitu gen *cp4 epsps*, yang memberikan sifat ketahanan terhadap glifosat (USDA-NASS, 2006).

Menurut ISAAA (2020), Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 telah memperoleh sertifikat aman pangan di 25 negara, yaitu Amerika Serikat (1995); Argentina, Kanada, Meksiko, Swiss, dan Uruguay (1996); Brazil (1998); Jepang (2001); Australia, Cina, Korea Selatan, Selandia Baru, dan Taiwan (2002); Filipina (2003); Paraguay (2004); Bolivia, Kolombia, dan Uni Eropa (2005); Rusia (2007); Malaysia (2010); Singapura (2014); Vietnam (2015); Iran (2016); Nigeria (2019). Di **Indonesia**, Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 ini dinyatakan aman pangan berdasarkan Surat Keputusan Kepala Badan Pengawasan Obat dan Makanan No. HK.04.1.52.04.11.03588 Tahun **2011**.

Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 telah memperoleh sertifikat aman pakan di 20 negara, yaitu Amerika Serikat dan Kanada (1995); Argentina, Swiss, dan Uruguay (1996); Brazil (1998); Cina (2002); Filipina dan Jepang (2003); Korea Selatan dan Paraguay (2004); Bolivia dan Uni Eropa (2005); Kolombia (2007); Rusia (2008); Malaysia (2010); Turki (2011); Singapura (2014); Vietnam (2015); Nigeria (2019).

Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 juga telah memperoleh sertifikat aman lingkungan di 12 negara, yaitu Amerika Serikat (1994); Kanada (1995); Argentina, Meksiko, dan Uruguay (1996), Brazil (1998); Afrika Selatan dan Kosta Rika (2001); Paraguay (2004); Bolivia dan Jepang (2005); Chili (2007).

Berdasarkan Peraturan Menteri Pertanian No. 36/Permentan/LB.070/8/2016 Tahun 2016 tentang Pengkajian Keamanan Pakan PRG dan Keputusan Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian No. 466.2/Kpts/OT.210/H/11/2016 Tahun 2016 tentang Pedoman Teknis Tata Cara dan Mekanisme Pengkajian Keamanan Pakan PRG, TTKH PRG Bidang Keamanan Pakan telah melakukan pengkajian keamanan pakan Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 berdasarkan informasi genetik dan informasi keamanan pakan sebagaimana diuraikan berikut ini.

II. INFORMASI GENETIK

II.1 Elemen Genetik

Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 merupakan hasil rekayasa genetik menggunakan plasmid PV-GMGT04, mengandung kaset gen *cp4 epsps* tunggal yang terdiri atas promotor E35S *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), peptida transit kloroplas (CTP4), dan terminator *nopaline synthase* (NOS). Gen *cp4 epsps* adalah gen *5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase* yang berfungsi memberikan ketahanan terhadap glifosat (Padgett *et al.*, 1993; Re *et al.*, 1993; Kolacz dan Padgett, 1994).

II.2 Sumber Gen Sisipan

Sumber gen sisipan Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2, yaitu gen *cp4 epsps* dari *Agrobacterium* sp. strain CP4. Promotor E35S berasal dari CaMV, CTP4 berasal dari gen *epsps* bunga *Petunia*, dan terminator NOS berasal dari *A. tumefaciens* (Padgett *et al.*, 1993; Re *et al.*, 1993; Kolacz dan Padgett, 1994).

Pada awalnya, Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 memiliki 2 sisipan DNA pada genomnya. Sisipan pertama bertanggung jawab sebagai marka ekspresi protein GUS dan sisipan kedua mengekspresikan ketahanan terhadap glifosat. Di samping itu, di dalam *backbone* plasmid juga terdapat gen resistensi kanamisin (*NPTII*). Progeni GTS 40-3-2 yang hanya mengandung DNA sisipan kedua yang diseleksi untuk dilanjutkan (Padgett *et al.*, 1993).

II.3 Sistem Transformasi

Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 dirakit melalui metode biolistik (*particle bombardment*). Plasmid PV-GMGT04 mengandung gen *cp4 epsps*, *GUS*, dan *NPTII* ditembakkan ke dalam jaringan meristem embrio tanaman kedelai A5403 (Christou *et al.*, 1988; McCabe *et al.*, 1988). Tanaman yang membawa gen *cp4 epsps* dan tidak mengandung gen yang menyandi antibiotik dan GUS ditumbuhkan sampai dewasa, serta diseleksi untuk ketahanannya terhadap glifosat.

II.4 Stabilitas Genetik

Stabilitas genetik gen sisipan pada Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 diuji dengan *Southern Blot* pada generasi R₃ dan R₆. Pola pewarisan sifat ketahanan terhadap glifosat dianalisis pada generasi R₃, R₄, dan R₅. Hasil analisis menunjukkan bahwa 1 kopi gen *cp4 epsps* terintegrasi secara stabil pada lokus tunggal dalam genom Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 sampai 6 generasi, dan diwariskan mengikuti hukum Mendel (Kolacz dan Padgett, 1994).

Berdasarkan hasil kajian informasi genetik, dapat disimpulkan bahwa:

1. Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 mengandung 1 kopi gen sisipan *cp4 epsps* yang terintegrasi secara utuh dalam 1 lokus genom kedelai.
2. Gen sisipan pada Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 stabil sampai 6 generasi, serta diwariskan mengikuti hukum Mendel.
3. Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 tidak mengandung sekuen *backbone*.

III. INFORMASI KEAMANAN PAKAN

III.1 Kesepadanan Substansial

Pengkajian kesepadanan substansial tanaman Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 dilakukan dengan mempelajari dokumen Padgett *et al.* (1996). Sampel yang diuji berupa biji (*grain*) diambil dari 13 lokasi tanam di Amerika Serikat pada tahun 1992 (9 lokasi tanam) dan 1993 (4 lokasi tanam). Pada tahun 1992 penanaman dilaksanakan di Macon (MO), Washington (LA), Martinsville (IN), Greenville (MS), Newport (AR), Proctor (AR), Winterville (GA), Seven Springs (NC), dan Marion (AR). Sementara, penanaman pada tahun 1993 dilakukan di Gordon (AL), Salisbury (MD), Steele (MO), dan Marion (AR). Kedelai yang dihasilkan kemudian diproses di *Texas A&M University, Engineering and Biosciences Research Center* (College Station, TX) untuk memperoleh bungkil kedelai. Biji kedelai dari berbagai lokasi tanam serta bungkil kedelainya digunakan sebagai sampel pada analisis kesepadanan substansial dilakukan di laboratorium yang telah mendapatkan sertifikat *Good Laboratory Practices* (GLP), yaitu *Ralston Analytical Laboratories* (St. Louis, MO) (Padgett *et al.*, 1996).

Analisis biji dan bungkil Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 dan kedelai kontrol A5403 meliputi analisis proksimat (kadar air, protein, lemak, abu, dan karbohidrat) dan komponen serat. Analisis lain meliputi mineral (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P, K, Na, dan Zn), vitamin (A, B1, B2, B9, dan E), profil asam amino (asam aspartat, treonin, serin, asam glutamat, prolin, glisin, alanin, valin, isoleusin, leusin, tirosin, fenilalanin, histidin, lisin, arginin, triptofan, sistin, dan metionin), dan profil asam lemak (palmitat, stearat, oleat, linoleat, dan linolenat), zat antinutrisi (asam fitat, rafinosa, dan inhibitor tripsin), dan metabolit sekunder (asam ferulat, furfural, asam p-kumarat, dan inositol) (Padgett *et al.*, 1996).

Hasil analisis proksimat, komponen serat, vitamin, mineral, asam amino, zat antinutrisi, dan metabolit sekunder pada biji kedelai menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata antara Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 dan kedelai kontrol non-PRG A5403, serta masuk dalam kisaran komposisi biji kedelai pada umumnya (AFSI, 2015).

Hasil analisis proksimat, komponen serat, vitamin, mineral, asam amino, zat antinutrisi, dan metabolit sekunder pada bungkil kedelai menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata antara Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 dan bungkil kedelai kontrol non-PRG A5403, serta masuk dalam kisaran komposisi kedelai pada umumnya (AFSI, 2015).

Berdasarkan pengkajian kesepadanan substansial, dapat disimpulkan bahwa Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 sepadan dengan kedelai non-PRG.

III.2 Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan melalui studi bioinformatik, uji pencernaan *in vitro*, dan toksisitas oral akut pada mencit.

III.2.1 Studi bioinformatik protein CP4 EPSPS

Studi bioinformatik dilakukan dengan membandingkan sekuen protein CP4 EPSPS dengan sekuen yang ada pada basis data AD7, TOXIN5, dan ALLPEPTIDES. Analisis dilakukan menggunakan FASTA dengan menggunakan nilai ambang batas *E-value* di bawah 10^{-5} (McClain dan Silvanovic, 2007). Hasil analisis menunjukkan bahwa sekuen asam amino CP4 EPSPS tidak ada kesamaan dengan toksin yang telah diketahui.

III.2.2 Uji pencernaan *in vitro* protein CP4 EPSPS

Telah dilakukan uji pencernaan *in vitro* protein CP4 EPSPS dengan mengikuti metode SGF dan SIF, dan selanjutnya dilakukan SDS-PAGE dan analisis *Western Blot* (Rean *et al.*, 1993).

Protein CP4 EPSPS yang digunakan berasal dari *Escherichia coli* dengan kemurnian >90%. Protein rekombinan ini mempunyai aktivitas ekuivalen dengan protein asli dari tanaman Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 (Harrison *et al.*, 1993).

Hasil pengujian *in vitro* menunjukkan bahwa protein CP4 EPSPS didegradasi dengan cepat melalui SGF dan SIF, yaitu <15 detik melalui SGF dan <10 menit melalui SIF (Leach *et al.*, 2002).

III.2.3 Uji toksisitas oral akut protein CP4 EPSPS

Bahan uji adalah protein CP4 EPSPS rekombinan yang berasal dari purifikasi *E. coli* dengan kemurnian hingga > 90%, dan sebagai kontrol digunakan larutan protein *Bovine Serum Albumin* (BSA, dengan kemurnian 98%). Pelarut untuk protein CP4 EPSPS dan protein BSA adalah larutan bufer natrium karbonat 0,05 mM.

Dalam pengujian ini digunakan 100 ekor mencit CD-1 terdiri atas 50 ekor mencit jantan berumur 5,5 minggu dengan bobot badan 25,2–29,8 g dan 50 ekor mencit betina berumur 7,0 minggu dengan bobot badan 22,7–27,2 g.

Larutan protein diberikan melalui *oral gavage* (cekok). Protein CP4 EPSPS dosis target 40 mg/kg bobot badan, 100 mg/kg bobot badan, dan 400 mg/kg bobot badan (dosis setara dengan dosis aktual 49 mg/kg bobot badan, 154 mg/kg bobot badan, dan 572 mg/kg bobot badan). Kelompok kontrol 1 diberi larutan bufer natrium karbonat 0,05 mM dengan dosis 33,33 ml/kg bobot badan (dosis aktual 33,33 ml/kg bobot badan), sedangkan kelompok kontrol 2 menggunakan BSA dengan dosis target 400 mg/kg bobot badan (dosis aktual 363 mg/kg bobot badan). Selama pengujian mencit diberikan pakan dan air minum *ad libitum*.

Pengamatan pada mencit dilakukan 2 kali sehari untuk melihat timbulnya efek toksisitas. Bobot badan dicatat sebelum pengujian dan selama pengujian sampai hari ke-7 dan tidak ada perbedaan yang signifikan secara statistik dalam kelompok rata-rata bobot badan atau penambahan bobot badan kumulatif antara bahan uji dan kelompok kontrol. Pada hari ke-8 dan ke-9 semua mencit dibius CO₂, kemudian dilakukan nekropsi. Setelah itu, dilakukan pemeriksaan makroskopik (patologis) untuk melihat perubahan eksternal dan internal pada seluruh rongga badan (Harrison, 1993; Harrison *et al.*, 1996; Herren *et al.*, 1993; Naylor, 1993).

Hasil pengujian menunjukkan tidak ada efek toksik yang teramati pada mencit yang diberi protein CP4 EPSPS. Tidak ada perbedaan yang signifikan secara statistik pada bobot badan, konsumsi pakan, kelainan klinis, dan patologis antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Berdasarkan uji toksisitas oral akut, disimpulkan bahwa protein CP4 EPSPS pada Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 tidak bersifat toksik.

III.3 Studi Pakan

Tujuan dilakukannya studi pakan pada ayam broiler ialah membandingkan performa ayam broiler yang diberi bungkil Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 dan GTS 61-671, serta bungkil kedelai non-PRG A5403.

Pengamatan dilakukan di *Dardenne Poultry Research Center (NOVUS International)*, Dardenne, MO (Hammond *et al.*, 1996). Bahan penelitian adalah 360 ekor ayam broiler komersial Cobb 500 (*Tyson Foods*, Springdale, AR) masing-masing 5 ekor jantan dan 5 ekor betina per kandang dengan 3 perlakuan pakan dan 12 ulangan. Bahan ransum adalah bungkil Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 seperti dilaporkan oleh Padgett *et al.* (1996). Penyusunan ransum dilakukan oleh *NOVUS International* (St. Louis, MO).

Pengamatan dilakukan selama 42 hari terhadap pertumbuhan, konsumsi pakan, bobot badan, konversi pakan, daya hidup, dan berat karkas dan bagian-bagiannya.

Bobot badan akhir, konsumsi pakan, daya hidup, dan berat karkas dan bagian-bagian ayam broiler yang diberi ransum mengandung bungkil Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 dan GTS 61-671, serta bungkil kedelai non-PRG tidak menunjukkan perbedaan yang nyata.

Berdasarkan studi pakan, disimpulkan bahwa Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 tidak mempunyai dampak negatif terhadap performa ayam broiler yang dipelihara selama 42 hari.

IV. KESIMPULAN

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

1. Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 mengandung 1 kopi gen *cp4 epsps* yang stabil pada 6 generasi, serta diwariskan mengikuti hukum Mendel.
2. Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 sepadan secara substansial dengan kedelai non-PRG dan tidak bersifat toksik.
3. TTKH PRG Bidang Keamanan Pakan menilai bahwa Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 yang diajukan adalah aman untuk dikonsumsi sebagai bahan pakan.
4. Apabila di kemudian hari ditemukan data dan informasi baru yang tidak sesuai dengan data keamanan pakan yang diperoleh hingga saat ini, status keamanan pakan Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 perlu dikaji ulang.
5. Apabila setelah ditetapkan aman pakan kemudian Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 terbukti menimbulkan dampak negatif terhadap kesehatan ternak, pemohon wajib melakukan tindakan pengendalian dan penanggulangan, serta menarik Kedelai PRG *event* GTS 40-3-2 dari peredaran.

Daftar Pustaka

- AFSI. 2015. *Agricultural and food systems institute crop composition database*. V. 8.0 [Online] Available from: <https://www.cropcomposition.org/CCDB/SelectAnalytes> [Accessed 21 Desember 2020].
- Christou, P., McCabe, D.E., and Swain, W.F. 1988. *Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles*. *Plant Physiology*, 87:671–674.
- Hammond, B.G., Vicini, J.L., Hartnell, G.F., Naylor, M.W., Knight, C.D., Robinson, E.H., Fuchs, R.L., and Padgett, S.R. 1996. *The feeding value of soybeans fed to rats, chickens, catfish and dairy cattle is not altered by incorporation of glyphosate tolerance*. *The Journal of Nutrition*, 126:717–727.

- Harrison, L.A., Bailey, M.R., Leimgruber, R.M., Smith, C.E., Nida, D.L., Taylor, M.L., and Padgett, S.R. 1993. *Characterization of microbially expressed protein CP4 EPSPS*. Report number: MSL-12901, Job/project number: 393773. St. Louis, MO 63167, USA.
- Harrison, L.A., Bailey, M.R., Naylor, M.W., Ream, J.E., Hammond, B.G., Nida, D.L., Burlette, B.L., Nickson, T.E., Mitsky, T.A., Taylor, M.L., Fuchs, R.L., and Padgett, S.R. 1996. *The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from Agrobacterium sp. strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice*. The Journal of Nutrition, 126(3):728–740.
- Herren, R.A., Padgett, S.R., and Gustafson, M.E. 1993. *Purification of recombinant E. coli CP4 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphatase syntase for equivalences study*. Report number: MSL-12574, Job/project number: 07-820-760-22. St. Louis, MO 63167, USA.
- ISAAA. 2020. *Summary of regulatory approvals: country, year and type of approval*. [Online] Available from: <https://www.isaaa.org/Gmapproval.database/event/default.asp?EventID=174> [Accessed 30 Oktober 2020].
- Kolacz, K. dan Padgett, S.R. 1994. *Molecular characterization of the 5' and 3' ends of the inserted DNA and the stability of the insert in glyphosate-tolerant soybean line 40-3-2*. Report number: MSL-13524, Job/project number: 393773. St. Louis, MO 63167, USA.
- Leach, J.N., Hilman, R.E., Thorp, J.J., George, C., and Astwood, J.D. 2002. *Assessment of the in vitro digestibility of purified E. coli-produced CP4 EPSPS protein in simulated gastric fluid*. Study number: 01-01-62-09, MSL number: 17566. Laboratory of Monsanto Company Product Safety Center, 800 North Lindbergh, St. Louis, MO 63167, USA.
- McCabe, D.E., Swain, W.F., Martinell, B.J., and Christou, P. 1988. *Stable transformation of soybean (Glycine max) by particle acceleration*. Bio/Technology, 6:923–926.
- McClain, J.S. and Silvanovic, A. 2007. *Bioinformatics evaluation of DNA flanking the 5' and 3' junctions of inserted DNA in Roundup Ready 40-3-2 soybean: assessment of putative polypeptides*. Study number: 07-01-30-10, Final report number: MSL0020632. Product Characterization Center, Monsanto Company Product Characterization Center, 800 North Lindbergh Blvd, St. Louis, MO 63167, USA.
- Naylor, M.V. 1993. *Acute oral toxicity of CP4-EPSPS protein in albino mice*. Report number: MSL-13077, Job/project number: ML-92-542/EHL 92223. St. Louis, MO 63167, USA.
- Padgett, S.R., Barry, G.F., Re, D.B., Eichholtz, D.A., Weldon, M., Kolacz, K., and Kishore, G.M. 1993. *Purification, cloning, and characterization of a highly glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from Agrobacterium sp. strain CP4*. Monsanto technical report number: MSL-12738. St. Louis, MO 63167, USA.
- Padgett, S.R., Taylor, N.B., Nida, D.L., Bailey, M.R., Macdonald, J., Holden, L.R., and Fuchs, R.L. 1996. *The composition of glyphosate-tolerant*

- soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans.* The Journal of Nutrition, 126:702–716.
- Re, D.B., Padgett, S.R., Palmer, R., Delannay, X., Kolacz, K., Nida, D., Peschke, V., Derting, C., Rogers, S., Edwards, J., Barry, G., and Biest, N. 1993. *Petition for determination of nonregulated status: soybeans with a Roundup Ready TM gene.* Monsanto technical report number: MSL-12904. St. Louis, MO 63167, USA.
- Rean, J.E., Padgett, S.R., Bailey, M., Leach, J.N., and Biest, N. 1993. *Assessment of the in vitro digestive fate of CP4 EPSP synthase.* Study number: 92-01-30-15. The Agricultural Group of Monsanto Company, New Product Division, 700 Chesterfield Parkway North, St. Louis, MO 63167, USA.
- USDA-NASS. 2006. *Crop production 2005 summary, January 2006.* United States Department of Agriculture National Agricultural Statistics Service.