

Ringkasan Pengkajian Keamanan Pangan Jagung PRG event MON 87427

I. Pendahuluan

Jagung PRG event MON 87427 merupakan jagung produk rekayasa genetik dari perusahaan Monsanto yang toleran terhadap herbisida glifosat. Jagung tersebut mengandung satu gen interes CP4 EPSPS (*5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase*) yang berasal dari *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4 yang merupakan mikroba tanah dan rizosfer tanaman yang tidak bersifat patogen dan alergenik (FAO/WHO, 2001). Secara umum jagung bukan bahan pangan penyebab alergi (OECD, 2002), toksik maupun penghasil zat anti nutrisi (Watson, 1982; White *et al.*, 1995).

Gen CP4 EPSPS mengekspresikan protein CP4 EPSPS dan bertanggung jawab dalam toleransi terhadap herbisida glifosat. Aktivitasnya ditemukan secara luas pada bahan pangan dan pakan yang berasal dari sumber tanaman dan mikroba. Enzim EPSPS bakteri telah dikarakterisasi dengan baik yang berkaitan dengan struktur kristal tiga dimensinya (Stallings *et al.*, 1991) serta mekanisme kinetik dan kimianya (Anderson *et al.*, 1990).

Pengkajian keamanan pangan jagung PRG event 87427 dilakukan berdasarkan Peraturan Kepala Badan POM Nomor HK.03.1.23.03.12.1563 Tahun 2012 tentang Pedoman Pengkajian Keamanan Pangan Produk Rekayasa Genetik dan surat Kepala Badan POM kepada Ketua Komisi Keamanan Hayati Produk Rekayasa Genetik Nomor SD.10.04.15201.13.655 tanggal 31 Januari 2013 perihal Pengkajian Keamanan Pangan Produk Rekayasa Genetik (PRG) Komoditas Jagung Event MON 87427. TTKH telah melakukan pengkajian keamanan pangan jagung PRG event MON 87427 berdasarkan informasi genetik dan informasi keamanan pangan yang terdiri atas kesepadanan substansial, alergenitas, dan toksisitas sebagaimana diuraikan di bawah ini.

Jagung PRG event MON 87427 telah memperoleh sertifikat aman pangan di Amerika Serikat (2012), Australia (2012), Selandia Baru (2012), Kanada (2012) dan Taiwan (2012).

II. Informasi Genetik

II.1. Elemen Genetik

Jagung PRG event MON 87427 mengandung satu gen interes yaitu CP4 EPSPS (*5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase*) yang bertanggung jawab dalam toleransi terhadap herbisida glifosat, dengan promoter e35S (promoter untuk *cauliflower mosaic virus* atau CaMV 35S RNA yang mengandung daerah *enhancer*) dan terminator *nopaline synthase* (NOS) dari *Agrobacterium tumefaciens*.

II.2. Sumber Gen Interes

Gen interes CP4 EPSPS diisolasi dari bakteri tanah *A. tumefaciens* strain CP4, promoter *e35S* berasal dari *cauliflower mosaic virus*, dan terminator NOS berasal dari *A. tumefaciens*.

II.3. Sistem Transformasi

Perakitan jagung PRG *event* MON 87427 dilakukan melalui teknik transformasi dengan mediasi vektor *A. tumefaciens* pada eksplan *immature embryo* biji jagung non PRG galur LH198 x Hill. Plasmid vektor yang digunakan adalah PV-ZMAP1043 yang mengandung dua sekuen *left* dan *right border* yang mengapit transfer DNA (T-DNA).

II.4 Stabilitas Genetik

Hasil analisis *Southern blot fingerprinting* menunjukkan bahwa jagung PRG *event* MON 87427 mengandung satu kopi gen CP4 EPSPS dan stabil sampai tujuh generasi BC3F7, sedangkan sekuen *backbone* plasmid PV-ZMAP1043 tidak terdeteksi (Arackal *et al.*, 2010). Stabilitas genetik pewarisan sifat pada jagung PRG *event* MON 87427 mengikuti prinsip segregasi Mendel.

Dari hasil pengkajian informasi genetik dapat disimpulkan bahwa jagung PRG *event* MON 87427 mengandung satu kopi gen interes (CP4 EPSPS); tidak mengandung sekuen *backbone* dari plasmid transformasi PV-ZMAP1043; masih stabil sampai tujuh generasi; dan diwariskan mengikuti hukum Mendel.

III. Informasi Keamanan Pangan

III.1 Kesepadanan Substansial

Informasi kesepadanan substansial dari jagung PRG *event* MON 87427 diperoleh dengan mempelajari hasil penelitian Breeze *et al.* (2010).

Sampel biji dan bagian vegetatif untuk analisis komposisi diambil dari jagung PRG *event* MON 87427 dan jagung non PRG yang ditanam selama percobaan tahun 2008 di Amerika Serikat. Penanaman jagung PRG *event* MON 87427 dan jagung non-PRG dilakukan di tiga tempat di Amerika Serikat (Jefferson County, Iowa; Stark County, Illinois; dan Jackson County, Arkansas). Seluruh sampel dianalisis di laboratorium Covance Laboratories Inc., Madison, Wisconsin yang sudah menerapkan *Good Laboratory Practice* (GLP).

Analisis komposisi yang dilakukan terhadap biji jagung adalah: proksimat (air, protein, lemak, dan abu serta karbohidrat *by-difference*), *acid detergent fiber* (ADF), *neutral detergent fiber* (NDF), *total dietary fiber* (TDF), komposisi asam amino dan asam lemak (C8 - C22), vitamin (β -karoten, B1, B2, B6, E, niasin, dan asam folat), mineral (kalsium, tembaga, besi, magnesium, mangan, fosfor, kalium, natrium, dan seng), zat anti nutrisi (asam fitat dan rafinosa), dan metabolit sekunder (furfural, asam ferulat, dan asam p-kumarat). Analisis

komposisi yang dilakukan terhadap bagian vegetatif adalah: proksimat (air, protein, lemak, dan abu serta karbohidrat *by-difference*), *acid detergent fiber* (ADF), *neutral detergent fiber* (NDF), dan mineral (kalsium dan fosfor).

Hasil analisis menunjukkan bahwa komposisi biji jagung, zat anti nutrisi dan metabolit sekunder serta bagian vegetatif jagung PRG *event* MON 87427 tidak berbeda nyata dengan jagung non PRG. Secara umum komposisi biji jagung dan bagian vegetatif jagung PRG *event* MON 87427 masuk ke dalam kisaran komposisi biji jagung dan bagian vegetatif jagung komersial pada umumnya seperti dipublikasikan ILSI *Crop Composition Database* (ILSI, 2006).

Hasil pengkajian menunjukkan bahwa jagung PRG *event* MON 87427 sepadan secara substansial dengan jagung non PRG.

III.2 Alergenisitas

Jumlah ekspresi protein yang dihasilkan oleh tanaman jagung sangat sedikit, oleh karena itu, untuk keperluan pengujian alergenisitas protein CP4 EPSPS diproduksi pada bakteri *Eschericia coli*.

Kesamaan protein CP4 EPSPS jagung PRG *event* MON 87427 dengan protein yang diproduksi oleh *E. coli* dikonfirmasi setelah membandingkan berat molekul, imunoreaktivitas, aktivitas enzim, dan glikosilasi. Protein tersebut setara dengan protein CP4 EPSPS yang dihasilkan oleh tanaman jagung PRG *event* MON 87427 (Chandu *et al.*, 2010).

Semua percobaan dilakukan di laboratorium Monsanto *Company* 800 North Lindbergh Boulevard St. Louis, Missouri 63167 yang telah menerapkan GLP.

III.2.1 Analisis Bioinformatika

Analisis homologi antara protein CP4 EPSPS dan protein yang berpotensi menimbulkan alergi atau toksik dilakukan dengan menggunakan perangkat FASTA (*FASTA sequence alignment tool*), database AD_2010, TOX_2010 dan PRT_2010 (Codex, 2003).

Hasil analisis homologi menunjukkan tidak adanya kemiripan struktural antara protein CP4 EPSPS dengan protein toksin, alergen atau protein aktif biologis lainnya yang dapat membahayakan kesehatan manusia atau hewan (Tu, *et al.*, 2010).

III.2.2 Konsentrasi Protein CP4 EPSPS

Konsentrasi protein CP4 EPSPS dalam berbagai jaringan jagung PRG *event* MON 87427 yang ditentukan dengan metoda *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) adalah 0,004% dari total protein jagung.

III.2.3 Stabilitas Protein

Daya cerna *in vitro* protein CP4 EPSPS di dalam simulasi cairan lambung (SGF, *simulated gastric fluid*) dilakukan menggunakan metode yang telah distandarisasi oleh *International Life Science Institute* (ILSI) (Thomas et al., 2004)

Protein CP4 EPSPS yang dianalisis dengan SDS-PAGE menunjukkan kemurnian 96%, berat molekul 44,1 kDa, dan tidak terglisosilasi. Aktivitas enzimatik protein yang dianalisis menggunakan uji fosfat yang dibebaskan adalah 0.67 ± 0.23 U/mg CP4 EPSPS.

Protein CP4 EPSPS yang dihasilkan *E. coli* dengan cepat terdegradasi dalam waktu 15 detik dan aktivitas enzim CP4 EPSPS tereduksi lebih dari 90 % di dalam simulasi cairan lambung, berdasarkan analisis SDS PAGE, *Western blot*, dan uji aktivitas enzim (Leach et al., 2002).

Berdasarkan hasil pengkajian alergenitas dapat disimpulkan bahwa jagung PRG *event* MON 87427 yang mengandung protein CP4 EPSPS tidak menunjukkan adanya potensi menimbulkan alergi.

III.3 Toksisitas

Pengujian toksisitas telah dilakukan terhadap protein CP4 EPSPS yang dihasilkan oleh jagung PRG *event* MON 87427 di laboratorium yang menerapkan GLP.

Toksisitas Akut Protein CP4 EPSPS

Dalam pengujian toksisitas, digunakan protein CP4 EPSPS yang diperoleh dari bakteri *E. coli*. Protein tersebut setara dengan protein CP4 EPSPS yang dihasilkan oleh tanaman jagung PRG *event* MON 87427 (Chandu et al., 2010).

Pengujian toksisitas akut protein CP4 EPSPS telah dilakukan dan hasilnya telah dilaporkan (Naylor, 1993). Bahan yang diuji berupa protein CP4 EPSPS murni yang dilarutkan dalam larutan dapar Na-karbonat 50 mM. Sebagai kontrol digunakan larutan *bovine serum albumin* (BSA).

Hewan percobaan yang digunakan adalah 50 ekor mencit (*Albino mice*) jantan strain CD-1 berumur sekitar 5,5 minggu dengan berat badan sekitar 25,2- 29,8 g, dan 50 ekor mencit betina strain CD-1 berumur sekitar 7 minggu dengan berat badan sekitar 22,7 - 27,2 g; berasal dari Charles River Breeding Laboratory, Portage, MI. Sebelum digunakan dalam pengujian semua mencit dibiarkan beradaptasi dengan lingkungan laboratorium selama 13 hari. Setiap ekor mencit dipelihara dalam kandang individu *stainless steel*, baik selama masa aklimatisasi maupun selama pengujian.

Ransum (Purina Certified Rodent Chow # 5002) dan air minum (*public water supply*) diberikan secara *ad libitum* selama pengujian.

Sebanyak 50 ekor mencit jantan dan 50 ekor betina dibagi menjadi lima kelompok: Kelompok 1 diberi cekokan larutan dapar Na-karbonat 50 mM, dengan dosis 33,33 ml/kg BB; Kelompok 2 diberi cekokan larutan BSA, dengan dosis 363 mg/kg BB; Kelompok 3 diberi cekokan larutan protein CP4 EPSPS, dengan dosis 49 mg/kg BB; Kelompok 4 diberi cekokan larutan protein CP4 EPSPS, dengan dosis 154 mg/kg BB; dan Kelompok 5 diberi cekokan larutan protein CP4 EPSPS, dengan dosis 572 mg/kg BB. Pemberian bahan uji atau kontrol hanya dilakukan satu kali (dosis tunggal) yaitu pada hari ke 0; dan pengujian berlangsung selama 8 hari.

Selama pengujian, adanya mencit yang mati atau sakit diamati dua kali sehari, yaitu pada pagi dan sore hari. Observasi secara detil untuk memeriksa adanya tanda-tanda keracunan dilakukan pada hari ke 7. Penimbangan berat badan dilakukan tiga kali yaitu pada hari ke 0, hari ke 7 serta hari ke 8 atau ke 9. Pengamatan jumlah konsumsi ransum dilakukan satu kali (mulai hari ke 1 sampai hari ke 7). Pada hari ke 8 atau ke 9 semua mencit dimatikan, kemudian dilakukan pengamatan terhadap organ dalam (*gross necropsy*).

Hasil pengujian menunjukkan bahwa pada semua kelompok: (1) tidak ada mencit yang mati selama pengujian; (2) tidak ada kelainan klinis; (3) tidak ada perbedaan nyata dalam hal konsumsi ransum dan berat badan antar kelompok; (4) tidak ada kelainan pada organ dalam.

Dari hasil pengujian toksisitas akut disimpulkan bahwa tidak terdapat efek merugikan pada mencit akibat pemberian protein CP4 EPSPS sampai dosis 572 mg/kg BB. Oleh karena itu protein CP4 EPSPS dari jagung PRG *event* MON 87427 termasuk kelompok bahan yang tidak toksik.

III.4 Uji Pemberian Pakan pada Ayam Broiler

Uji pemberian pakan pada ayam broiler diperoleh dengan mempelajari hasil penelitian Davis (2010).

Uji dilakukan menggunakan biji jagung PRG *event* MON 87427 sebagai bahan uji, biji jagung konvensional Orion ID 11213170 sebagai kontrol, serta biji jagung hibrida NK N72-G8, Golden Harvest H8920, Pioneer 34P88, Middlekoop 4413, DKC62-30, dan Garst 8450 sebagai pembandingan. Masing-masing biji jagung tersebut dihancurkan dan dicampurkan dengan pakan ayam sampai homogen. Hewan percobaan yang digunakan adalah anak ayam broiler jantan dan betina komersial DOC (Cobb × Cobb 500) yang diperoleh dari Hoover's Hatchery, Inc. Rudd, IA (Davis, 2010).

Metode pengujian yang dilakukan adalah sebagai berikut: pada hari ke 0, sebanyak 800 ekor anak ayam broiler jantan dan betina secara acak dibagi menjadi 8 kelompok, sesuai dengan perlakuan (50 ekor jantan dan 50 ekor betina per perlakuan). Pengujian dilaksanakan selama 42 hari, periode *starter* hari ke 0 sampai ke 20, periode *grower* hari ke 21 sampai ke 42. Pakan dan air minum diberikan secara *ad libitum*.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa: (a) berat badan ayam per ekor pada hari ke 0 rata-rata 41,625 g (jagung PRG *event* MON 87427) dan 41,583 g (kontrol) serta 41,722 (pembanding); (b) berat badan ayam per ekor pada hari ke 42 adalah rata-rata 2,668 kg (jagung PRG *event* MON 87427) dan 2,640 kg (kontrol) serta 2,606 (pembanding); (c) konsumsi pakan rata-rata per ekor ayam selama 42 hari pengujian adalah 4,195 kg (jagung PRG *event* MON 87427) dan 4,172 kg (kontrol) serta 4,089 kg (pembanding); (d) konversi pakan rata-rata per ekor ayam adalah 1,620 kg/kg (jagung PRG *event* MON 87427) dan 1,631 kg/kg (kontrol) serta 1,628 (pembanding). Tidak terdapat perbedaan nyata untuk semua parameter uji antara kelompok perlakuan, kelompok kontrol dan kelompok pembanding.

Berdasarkan hasil uji pemberian pakan pada ayam broiler dapat disimpulkan bahwa jagung PRG *event* MON 87427 mempunyai nilai nutrisi sebanding dengan jagung non PRG.

IV. Kesimpulan

Atas dasar hasil pengkajian tentang informasi genetik, kesepadanan substansial, alergenisitas, dan toksisitas disimpulkan hal-hal sebagai berikut:

1. Jagung PRG *event* MON 87427 mengandung satu kopi gen CP4 EPSPS; tidak mengandung sekuen *backbone* dari plasmid transformasi PV-ZMAP1043; gen interes masih stabil sampai tujuh generasi; dan diwariskan mengikuti hukum Mendel.
2. Informasi keamanan pangan:
 - a. jagung PRG *event* MON 87427 sepadan secara substansial dengan jagung non PRG;
 - b. jagung PRG *event* MON 87427 yang mengandung protein CP4 EPSPS tidak menunjukkan adanya potensi menimbulkan alergi; dan
 - c. jagung PRG *event* MON 87427 yang mengandung protein CP4 EPSPS termasuk kelompok bahan yang tidak toksik.
3. TTKH menilai bahwa jagung PRG *event* MON 87427 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 jagung PRG *event* MON 87427 perlu dikaji ulang.
5. Apabila setelah ditetapkan aman pangan, kemudian produk tersebut terbukti menimbulkan dampak negatif terhadap kesehatan manusia maka pemohon wajib melakukan tindakan pengendalian dan penanggulangan, serta menarik jagung PRG *event* MON 87427 dari peredaran.
6. Jagung PRG *event* MON 87427 tidak boleh digunakan sebagai pakan ternak sampai memperoleh sertifikat aman pakan.
7. Jagung PRG *event* MON 87427 tidak boleh dibudidayakan sampai ditetapkan aman lingkungan.

V. Daftar Acuan

Anderson, K.S, Johnson, K.A., 1990. *Kinetic and Structural Anaysis of enzyme Intermedites: Lessons from EPSP Synthase*. *Chemical Reviews*, Volume 90: 1131-1148.

Arackal, S.M., Garnaat, C.W., Lawry, K.R., Song, Z., Girault, R.L., Groat, J.R., Ralston, L.F., Masucci, J.D., Tian, Q., 2010. *Molecular Characterization of MON 87427*. Monsanto Study Number REG-08-575.

Breeze, M.L, S.G. Riordan, K.D. Miller, and R. D. Sorbet, 2010. *Compositional Analyses of Corn Forage and Grain of MON 87427 Treated with Glyphosate Grown in the United States during the 2008 Field Season*. Monsanto Company, MSL0022340.

Chandu D, KS Crowley, TC Lee dan JJ Finnessy, 2010. *Amended Report for MSL 0022391: Characterization of the CP4 EPSPS Protein Purified from the Grain of MON 87427 and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of the Plant-Produced and E. coli-Produced CP4 EPSPS Proteins*. Monsanto Study Number. REG-09-237.

Codex Alimentarius Commission, 2003. *Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants*. CAC/GL 45-2003.

Davis, S.W., 2010. *Comparison of Broiler Performance and Carcass Parameters When Fed Diets Containing MON 87427, Control, or Reference Corn*. Monsanto Study Number MSL0022485.

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.

International Life Sciences Institute (ILSI). 2006. *Crop Composition Database, Version 3.0*, <http://www.cropcomposition.org>. Accessed 26 October 2009.

Leach, J.N., Hileman, R.R., Thorp, J., George, C., Astwood, J.D., 2002. *Assessment of the in Vitro Digestibility of the Purified E.coli-Produced CP4 EPSPS Protein in Simulated Gastric Fluid*. Monsanto Study Number 01-01-62-09.

Naylor, M.W., 1993. *Acute Oral Toxicity Study of Protein CP4 EPSPS in Albino Mice*. Monsanto Study No. ML-92-542, Monsanto Report No. MSL-13077.

OECD, 2002. *Consensus Document on Compositional Consideration for New Varieties of Maize (Zea mays): Key Food and Feed Nutrients, Anti-Nutrients and Secondary Plant Metabolites*. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds, No. 6.

Stallings, W.C., Abdel-Meguid, S.S., Lim, L.W., Shieh, H.S., Dayringer, H.E., Leimgruber, N.C., Stegeman, R.A., Anderson, K.S., Sikorski, J.A., Padgett, S.R., Kishore, G.M., 1991. *Structure and Topological Symmetry of the Glyphosate Target 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase: A Distinctive Protein Fold*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Volume 88: 5046-5050.

Thomas, K., Aalbers, M., Bannon, G.A., Bartels, M., Dearman, R.J., Esdaile, D.J., Fu, T.J., Glatt, C.M., Hadfield, N., Hatzos, C., Hefle, S.L., Heylings, J.R., Goodman, R.E., Henry, B., Herouet, C., Holsapple, M., Ladies, G.S., Landry, T.D., MacIntosh, S.C., Rice, E.A., Privalle, L.S., Steiner, H.Y., Teshima, R., van Ree, R., Woolhiser, M. and Zawodny, J., 2004. *A Multi-laboratory Evaluation of a Common in Vitro Pepsin Digestion Assay Protocol Used in Assessing the Safety of Novel Proteins*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 39: 87-98.

Tu, H., Silvanovich, A., 2010. *Bioinformatics Evaluation of the CP4 EPSPS Protein Utilizing the AD_2010, TOX_2010, and PRT_2010 Databases*. Monsanto Study Number: REG-10-042.

Watson, A.W., 1982. *Corn: Amazing Maize, General Properties*. CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture, Volume 11.

White, P.J., Pollak, L.M., 1995. *Corn as a Food Source in the United States: Part II Processes, Products, Composition, and Nutritive Values*. American Association of Cereal Chemists.