

Lampiran 1

RINGKASAN PENGAJIAN KEAMANAN PAKAN GANDUM PRG *EVENT* IND-00412-7

I. PENDAHULUAN

Sehubungan dengan Surat Penugasan Pengkajian Keamanan Pakan Gandum PRG *event* IND-00412-7 No. B-91/KKH PRG/07/2021 tanggal 16 Juli 2021 dari Ketua KKH PRG dan adanya permohonan pengkajian keamanan pakan Gandum PRG *event* IND-00412-7 dari PT Ravindo Sukses Mulia (atas nama *Trigall Genetics*) dengan surat No. 001/ RSM/5/21 tanggal 31 Mei 2021, TTKH PRG Bidang Keamanan Pakan telah melakukan pengkajian keamanan pakan terhadap Gandum PRG *event* IND-00412-7.

Gandum dalam kajian ini adalah *Triticum aestivum* L. em Thell yang termasuk gandum heksaploid yang mengandung gen sisipan *HaHB4* dan *pat* yang memberikan sifat toleran terhadap kekeringan dan amonium glifosinat. Paten Gandum PRG *event* IND-00412-07 dimiliki oleh *Trigall Genetics*, yaitu gabungan (*joint venture*) antara perusahaan *Bioceres* dan *Florimond Desprez*.

Beberapa negara menggunakan gandum sebagai bahan pangan utama (*staple food*) dan bahan pakan. Adanya perubahan iklim dengan terjadinya kekeringan di berbagai lahan pertanian di berbagai negara memacu peneliti di dunia termasuk Argentina untuk merakit varietas unggul gandum yang toleran kekeringan.

Sejak tahun 2013 *Trigall Genetics* telah memulai upaya untuk mendapatkan sertifikat keamanan hayati untuk Gandum PRG *event* IND-00412-7 ini, dan akhirnya mendapatkan sertifikat aman pangan, pakan, dan lingkungan serta izin pelepasan di Argentina pada bulan Oktober 2020.

Gen *HB4* milik *Bioceres* tidak hanya disisipkan pada tanaman gandum, tetapi juga pada tanaman kedelai. Untuk komersialisasi kedelai *HB4*, perusahaan *Bioceres* bergabung dengan *Arcadia* membentuk *Verdeca*. Kedelai *HB4* telah disetujui untuk keamanan pangan, pakan, dan lingkungan (2015) di Argentina; keamanan pangan dan pakan (2017) serta lingkungan (2019) di Amerika Serikat; keamanan pangan, pakan, dan lingkungan (2019) di Brasil; keamanan pangan (2021) di Kanada (ISAAA, 2022). Amerika Serikat, Brasil, dan Argentina merupakan produsen 80% kedelai di dunia.

Gandum PRG *event* IND-00412-7 merupakan produk gandum PRG yang pertama kali dilepas di dunia. Di samping Argentina, persetujuan aman pangan dan pakan Gandum PRG *event* IND-00412-7 didapatkan juga di Kolombia

(Desember 2020) yang disusul oleh Brasil (November 2021). Selanjutnya, pada tanggal 6 Mei 2022 Australia dan Selandia Baru juga telah memberikan persetujuan aman pangan untuk gandum PRG ini.

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 Gandum PRG *event* IND-00412-07 berdasarkan informasi genetik dan informasi keamanan pakan sebagaimana diuraikan berikut ini.

II. INFORMASI GENETIK

II.1 Elemen Genetik

Gandum PRG *event* IND-00412-7 ditransformasi dengan menggunakan 2 (dua) plasmid, yaitu pIND4-HB4 yang mengandung gen *HaHB4* dan plasmid pIND4-Bar yang mengandung gen *bar* yang terintegrasi pada 1 (satu) lokus (Dezar dan Vazquez, 2014). Kaset ekspresi dan gen sisipan adalah sebagai berikut:

- a. gen sisipan *HaHB4* menyandi protein HAHB4, diregulasi oleh promotor *prUbi-1* dan terminator *Tnos*.
- b. gen sisipan *bar* menyandi protein PAT, diregulasi oleh promotor *prUbi-1* dan terminator *Tnos*.

Keberadaan gen sisipan dianalisis dengan beberapa metode, yaitu *Southern blot*, *Diversity Array Technology* (Dart), dan sekuensing DNA. Dart digunakan untuk verifikasi hasil yang didapatkan dari analisis *Southern blot* dan diketahui bahwa gen sisipan *HaHB4* terdapat pada kromosom 2D. Dari analisis sekuensing DNA diperoleh hasil bahwa Gandum PRG *event* IND-00412-7 mengandung 1 (satu) kopi gen fungsional *HaHB4* dan 2 (dua) kopi gen fungsional *bar*.

II.2 Sumber Gen Sisipan

Sumber gen sisipan Gandum PRG *event* IND-00412-7, yaitu gen *HaHB4* berasal dari bunga matahari (*Helianthus annuus*) (Gago *et al.*, 2002; Manavella *et al.*, 2006, 2008) dan gen *bar* berasal dari *Streptomyces hygroscopicus* (CERA, 2011; Hérouet *et al.*, 2005). Promotor *prUbi-1* berasal dari *Zea mays* (Christensen dan Quail, 1996; Christensen *et al.*, 1992) dan terminator *Tnos* berasal dari *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker *et al.*, 1982).

II.3 Sistem Transformasi

Metode transformasi yang digunakan untuk menghasilkan Gandum PRG *event* IND-00412-7 diadaptasi dari protokol yang diterbitkan oleh Barcelo dan Lazzeri (1995), Pastori *et al.* (2001), dan Rasco-Gaunt *et al.* (2001).

Gandum PRG *event* IND-00412-7 dirakit melalui metode penembakan partikel pada embrio muda (varietas Cadenza) dengan menggunakan 2 (dua) plasmid, yaitu pIND4-HB4 yang membawa gen *HaHB4* dan pIND4-Bar yang membawa gen *bar*.

Seleksi dilakukan dengan cara memaparkan planlet pada media yang mengandung amonium glufosinat sebagai agen seleksi. Tanaman yang tahan dipindahkan ke media tanah untuk diaklimatisasi. Tanaman tersebut dipelihara hingga dewasa dan digunakan pada pengujian selanjutnya.

II.4 Stabilitas Genetik

Analisis molekuler menggunakan *end-point* PCR dan/atau *real time* (RT)-PCR telah dilakukan untuk mengetahui stabilitas gen sisipan dari generasi ke generasi. Hasil analisis menunjukkan bahwa gen sisipan tersebut stabil sampai 7 (tujuh) generasi. Dari pola segregasi diketahui bahwa Gandum PRG *event* IND-00412-7 mengikuti pola pewarisan hukum Mendel.

Berdasarkan kajian informasi genetik dapat disimpulkan bahwa:

- a. Gandum PRG *event* IND-00412-7 mengandung 1 (satu) kopi gen fungsional *HaHB4* dan 2 (dua) kopi gen fungsional *bar*.
- b. Kedua gen sisipan tersebut terintegrasi ke dalam genom gandum pada 1 (satu) lokus dan stabil sampai 7 (tujuh) generasi, dengan pola pewarisan mengikuti hukum Mendel.
- c. Pada Gandum PRG *event* IND-00412-7 terdeteksi adanya fragmen *backbone* dari plasmid pIND4-HB4 dan pIND4-Bar, namun tidak terekspresi pada tanaman gandum PRG tersebut.

III. INFORMASI KEAMANAN PAKAN

III.1 Kesepadanan Substansial

Data hasil pengkajian kesepadanan substansial biji dan hijauan Gandum PRG *event* IND-00412-7 dan gandum non-PRG didapatkan dari *study report* oleh Miranda (2014) dan publikasi oleh Ayala *et al.* (2019). Penilaian komposisi kimia dilakukan sesuai dengan dokumen konsensus OECD tentang senyawa untuk varietas gandum baru (OECD, 2003).

Bahan yang digunakan untuk uji kesepadanan substansial adalah hijauan (*forage*) dan biji (*grain*) yang diperoleh dari tanaman Gandum PRG *event* IND-

00412-7, dan sebagai kontrol, yaitu gandum non-PRG *wild type* Cadenza dan lima varietas gandum referensi komersial. Percobaan penanaman gandum dilakukan pada tiga musim tanam yang berbeda (tahun 2012, 2013, dan 2015) di sembilan lokasi dari tiga provinsi di Argentina, yaitu Buenos Aires (Villa Saboya, Carmen de Areco, Daireaux, Balcarce, dan Pergamino), Cordoba (Monte Buey dan Corral de Bustos), dan Santa Fe (Landeta dan Roldan).

Analisis pada sampel hijauan gandum meliputi proksimat (kadar air, abu, protein, lemak, dan karbohidrat), serat, dan mineral (kalsium dan fosfor). Analisis pada sampel biji gandum meliputi proksimat (kadar air, abu, protein, lemak, dan karbohidrat), serat, 5 jenis mineral (kalsium, besi, fosfor, selenium, dan seng), 6 jenis vitamin (tiamin, riboflavin, niasin, piridoksin, asam folat, dan alfa-tokoferol), 18 jenis asam amino (arginin, asam aspartat, asam glutamat, glisin, histidin, prolin, alanin, serin, isoleusin, leusin, lisin, metionin, sistin, fenilalanin, tirosin, treonin, triptofan, dan valin), 5 jenis asam lemak (palmitat, stearat, oleat, linoleat, dan linolenat), dan 2 zat antigizi (asam fitat dan gliadin).

Hasil analisis komposisi hijauan menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata pada komposisi proksimat, serat, dan mineral antara Gandum PRG *event* IND-00412-7 dan gandum kontrol (non-PRG). Hasil analisis komposisi biji gandum juga menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata pada komposisi proksimat, serat, asam amino, asam lemak, vitamin, dan zat antigizi antara Gandum PRG *event* IND-00412-7 dan gandum kontrol (non-PRG). Semua nilai pengamatan masuk ke dalam kisaran komposisi kimia gandum pada umumnya (Huebner dan Rothfus, 1968; Obert *et al.*, 2004; OECD 2003).

Berdasarkan pengkajian kesepadanan substansial dapat disimpulkan bahwa hijauan dan biji Gandum PRG *event* IND-00412-7 sepadan dengan hijauan dan biji gandum non-PRG.

III.2 Toksisitas

Evaluasi potensi toksisitas Gandum PRG *event* IND-00412-07 berdasarkan hasil studi bioinformatika, uji pencernaan *in vitro*, dan uji toksisitas oral akut.

III.2.1 Studi bioinformatika protein HAHB4 dan PAT

Potensi toksisitas protein HAHB4 yang disandi oleh gen *HaHB4*, protein PAT yang disandi oleh gen *bar*, dan peptida putatif lainnya pada Gandum PRG *event* IND-00412-7 dikaji dengan analisis homologi terhadap basis data protein umum dan basis data spesifik toksin. Basis data protein umum adalah basis data *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) *non-redundant*, sedangkan basis data spesifik toksin yaitu *Toxin and Toxin Target Data Base* (T3DB, version 2.0; <http://www.t3db.ca/>) dan *Toxin and Antitoxin Data Base* versi 2 (TADB2; <https://bioinfomml.sjtu.edu.cn/TADB2/>). Analisis homologi

terhadap basis-basis data ini dilakukan dengan menggunakan program BLASTP dengan ambang batas *E-value* 1×10^{-5} .

Analisis homologi protein HAHB4 pada Gandum PRG *event* IND-00412-7 terhadap basis data NCBI menunjukkan bahwa protein HAHB4 termasuk ke dalam kelompok famili protein *homeodomain-leucine zipper* (HD-Zip) yang umum ditemukan pada tanaman tingkat tinggi. Hasil analisis homologi protein HAHB4 terhadap basis data toksin T3DB dan TADB2 menunjukkan tidak ada kesamaan antara toksin-toksik dalam basis data tersebut dengan protein HAHB4 (Fazio *et al.*, 2014; Revale *et al.*, 2015).

Pada hasil analisis homologi protein PAT terhadap basis data toksin, baik T3DB maupun TADB2, tidak terdapat homologi antara protein PAT dan toksin dalam basis data tersebut. Selain itu, protein PAT telah dikaji keamanannya secara ilmiah (Hérouet *et al.*, 2005), diekspresikan pada banyak tanaman PRG komersial, terutama untuk sifat toleran terhadap herbisida amonium glufosinat, dan telah dinyatakan aman di banyak negara (CERA, 2011; ILSI, 2016; ISAAA, 2022).

Berdasarkan studi bioinformatika disimpulkan bahwa protein HAHB4 dan PAT tidak mempunyai kesamaan yang relevan, baik dengan toksin yang telah diketahui maupun putatif, sehingga tidak berpotensi toksik.

III.2.2 Uji pencernaan *in vitro* protein HAHB4 dan PAT

III.2.2.1 Uji pencernaan *in vitro* protein HAHB4

Uji pencernaan *in vitro* protein HAHB4 dilakukan dengan menggunakan metode *Simulated Gastric Fluid* (SGF) (Fazio *et al.*, 2014; Thomas *et al.*, 2004). Bahan uji yang digunakan adalah protein HAHB4 rekombinan yang diproduksi dari *Escherichia coli* (Fazio, 2014) dengan tingkat kemurnian 90%, diuji dengan menggunakan *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE).

Protein HAHB4 diuji kecernaannya secara *in vitro* dengan metode SGF menurut *technical report* No. 01010273-Ev2. Sebagai kontrol, digunakan *bovine serum albumin* (BSA) dan *soybean trypsin inhibitor*. Pengujian SGF menggunakan larutan pepsin pada pH 1,2 dan suhu 37°C dengan waktu inkubasi 0; 0,5; 1; 2; 8; 15; 30; 60 menit. Selanjutnya, sampel yang telah diambil dianalisis degradasi proteinnya dengan SDS-PAGE.

Hasil pencernaan *in vitro* pada SGF menunjukkan bahwa protein HAHB4 cepat didegradasi, dalam waktu 0,5 menit setelah inkubasi tidak terdeteksi lagi. Sementara, kontrol BSA dicerna dalam waktu 0,5 menit, sedangkan *soybean trypsin inhibitor* tidak terdegradasi hingga 60 menit.

III.2.2.2 Uji pencernaan *in vitro* protein PAT

Uji pencernaan *in vitro* protein PAT pada Gandum PRG *event* IND-00412-7 dilakukan berdasarkan data dan informasi yang disajikan oleh Jeong *et al.* (2020) dengan judul "Allergenicity and Toxicity Evaluation of the PAT Protein Expressed in Herbicide-Tolerant Genetically Modified *Zoysia japonica*". Hasil sekuensing gen *pat* pada *Z. japonica* dan sekuens gen *pat* pada Gandum PRG *event* IND-00412-7 adalah 100% sama. Oleh sebab itu, data dan informasi Jeong *et al.* (2020) dapat digunakan untuk menentukan keamanan pakan dari produk gen *pat* pada gandum PRG ini. Uji dilakukan dengan menggunakan protein rekombinan yang diproduksi oleh *E. coli* dengan konsentrasi yang dihasilkan adalah 1 mg/ml. Protein PAT dimurnikan dengan menggunakan *Ni-Sepharose 6 Fast Flow*, selanjutnya didialisis terhadap bufer PBS.

Uji pencernaan SGF dilakukan selama 60 menit, dengan interval waktu pengamatan 0; 0,5; 1; 5; 10; 60 menit. Selanjutnya, sampel dianalisis dengan SDS-PAGE. Hasil menunjukkan bahwa protein PAT tidak stabil dalam larutan SGF dan 100% tercerna dengan sangat cepat dalam waktu 0,5 menit.

III.2.3 Uji toksisitas oral akut protein HAHB4 dan PAT

III.2.3.1 Uji toksisitas oral akut protein HAHB4

Pengujian ini dilakukan untuk menilai toksisitas akut protein HAHB4 berdasarkan *study report* oleh Miranda (2018). Bahan uji yang digunakan adalah protein HAHB4 rekombinan yang diproduksi dari *E. coli* dengan kemurnian ~90%.

Pengujian ini dilakukan di dalam kandang mencit *specific pathogen free* (SPF) *certification number: SYXK(JING) 2015-0045, by the MOA Supervision, Inspection and Testing Center of Genetically Modified Food Safety* (Beijing), *Chinese Agricultural University* (CAU), Cina. Hewan uji yang digunakan adalah mencit strain *CD-1*, bersertifikat *SYXK(JING) 2016-0006* yang diperoleh dari *Vital River Laboratories Animal Technology, Co. Ltd.* (Beijing). Mencit yang digunakan berumur 4 minggu dengan bobot badan (BB) 18,0–22,0 g dan telah diaklimatisasi selama 3 hari.

Pada uji ini digunakan 10 ekor mencit jantan (JY17050; 5 ekor perlakuan dan 5 ekor kontrol) dan 10 ekor mencit betina (JY170250; 5 ekor perlakuan dan 5 ekor kontrol). Mencit dipelihara di dalam kandang, ditempatkan pada suhu 20–24°C dan kelembapan relatif 40–70%, serta penerangan diatur 12 jam gelap dan 12 jam terang. Udara dalam ruang diganti 10–15 kali per jam.

Pakan yang diberikan telah memenuhi persyaratan GB14924-2010. Mencit dipuasakan selama 4 jam sebelum pengujian, dan tetap mendapat air minum,

kemudian semua mencit ditimbang bobot badannya sebelum pengujian dan pada hari ke-1, ke-7, dan ke-14.

Setiap mencit dalam kelompok perlakuan diberi dosis tunggal 3.822 mg protein HAHB4/kg BB yang diberikan tiga kali dengan interval 3–4 jam, masing-masing 20 ml/kg BB yang mengandung 63,7 mg protein HAHB4/ml. Pemberiannya dilakukan dengan cara dicekok. Pakan diberikan 2 jam setelah akhir pemberian bahan uji.

Pengamatan pada mencit dilakukan selama 14 hari terhadap kematian, bobot badan, dan perubahan perilaku (perubahan klinis). Pada hari ke-15 dilakukan nekropsi untuk pemeriksaan makroskopik dan histopatologi organ jantung, paru-paru, hati, limpa, ginjal, timus, gastrointestinal, dan ovarium atau testis.

Hasil analisis menunjukkan tidak ada kematian, perbedaan bobot badan, dan perubahan klinis, serta kelainan organ antara mencit pada kelompok perlakuan dan kontrol (Miranda, 2018). Dapat disimpulkan bahwa pemberian dosis tunggal 3.822 mg protein HAHB4/kg BB tidak memberikan efek toksik pada mencit.

III.2.3.2 Uji toksisitas oral akut protein PAT

Kajian toksisitas oral akut untuk Gandum PRG *event* IND-00412-7 dilakukan dengan tujuan mengevaluasi potensi toksisitas oral protein PAT. Bahan uji yang digunakan pada studi ini sama dengan bahan uji pada pencernaan *in vitro* protein PAT (Jeong *et al.*, 2020).

Sebagai hewan coba digunakan mencit strain ICR, terdiri atas 20 ekor mencit jantan dan 20 ekor betina, berumur 6 minggu, dan diaklimatisasi selama 7 hari. Pada akhir masa aklimatisasi dilakukan penimbangan bobot badan dan pengamatan gejala umum. Mencit ditempatkan di dalam kandang IVC (391×199×130 mm³), 5 ekor mencit per kandang, dan ditempatkan di ruangan dengan suhu ruang 23±3°C dan kelembapan relatif 55±10%. Pakan dan air minum diberikan secara *ad libitum*.

Pada pengujian ini mencit dibagi ke dalam empat kelompok masing-masing terdiri atas 5 ekor jantan dan 5 ekor betina. Pemberian bahan uji dengan cara dicekok dengan dosis 0 mg/kg untuk kelompok kontrol (k1), 1.000 mg/kg untuk kelompok dosis rendah (k2), 2.000 mg/kg untuk kelompok dosis sedang (k3), dan 4.000 mg/kg untuk kelompok dosis besar (k4). Sebelum pengujian mencit dipuasakan selama 4 jam, pakan diberikan 4 jam setelah pemberian bahan uji. Pengamatan perubahan klinis dan kematian dilakukan setiap hari. Semua mencit ditimbang bobot badannya sebelum pengujian dan pada hari ke-1, ke-5, dan ke-7 setelah pemberian bahan uji. Pada hari ke-8 dilakukan eutanasia dengan menggunakan gas CO₂. Selanjutnya, dilakukan nekropsi untuk

pemeriksaan makroskopik dan mikroskopik pada organ jantung, paru-paru, hati, ginjal, dan limpa.

Hasil analisis menunjukkan tidak ada kematian, perbedaan bobot badan, dan perubahan klinis, serta kelainan organ antara mencit pada kelompok perlakuan dan kontrol (Jeong *et al.*, 2020). Dapat disimpulkan bahwa pemberian dosis sampai dengan 4.000 mg protein PAT/kg BB tidak memberikan efek toksik pada mencit.

Berdasarkan uji toksisitas Gandum PRG *event* IND-00412-7 melalui studi bioinformatika, uji pencernaan *in vitro*, dan uji toksisitas oral akut disimpulkan bahwa protein HAHB4 dan PAT tidak bersifat toksik.

III.3 Studi Pakan

Studi pakan bertujuan mengetahui apakah ayam broiler yang diberi pakan mengandung Gandum PRG *event* IND-00412-7 menunjukkan performa yang sebanding dengan ayam broiler yang diberi pakan non-PRG (gandum *wild type* Cadenza dan gandum komersial BioINTA 3005).

Studi pakan Gandum PRG *event* IND-00412-7 berdasarkan laporan Azcona *et al.* (2014). Penelitian dilakukan dengan menggunakan 360 ekor ayam broiler jantan Cobb-500 umur 1–41 hari. Ayam broiler berasal dari penyalur *Granja Tres Arroyos*. Tiga fase pertumbuhan ayam boiler, yaitu *starter* (1–14 hari), *grower* (15–28 hari), dan *finisher* (29–41 hari), masing-masing mendapatkan ransum dengan komposisi yang mirip yang mengandung 'test material' sebanyak 40%. Gandum digunakan dalam bentuk giling/tumbuk. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok, dengan tiga perlakuan dan delapan ulangan masing-masing 15 ekor ayam. Sebagai perlakuan adalah jenis gandum, yaitu 1) Gandum PRG *event* IND-00412-7, 2) Cadenza (gandum *wild type*), dan 3) BioINTA 3005 (gandum komersial). Formulasi pakan mengikuti rekomendasi Cobb dengan menggunakan perangkat lunak *N-utrition® 2.0*.

Parameter yang diamati adalah bobot badan, konsumsi pakan, konversi pakan, keseragaman (*uniformity*), kematian, umur pada saat mencapai bobot badan 2.800 g, dan bobot karkas pada 42 hari. Tiap-tiap ayam broiler ditimbang pada kelompoknya setiap minggu.

Hasil penelitian menunjukkan tidak ada perbedaan nyata pada parameter yang diuji antara Gandum PRG *event* IND-00412-7 dan Cadenza (gandum *wild type*). Ada perbedaan yang nyata pada parameter persentase bobot karkas dan konversi pakan pada 42 hari, yaitu pemberian gandum BioINTA 3005 menunjukkan bobot badan dan konversi pakan yang sedikit lebih tinggi. Hal ini diduga lebih disebabkan oleh pengaruh genotipenya.

Dari pengujian ini disimpulkan bahwa pemberian pakan yang mengandung Gandum PRG *event* IND-00412-7 menunjukkan performa ayam broiler yang sebanding dengan yang diberi pakan non-PRG.

IV. KESIMPULAN

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

1. Gandum PRG *event* IND-00412-7 mengandung 1 (satu) kopi gen fungsional *HaHB4* dan 2 (dua) kopi gen fungsional *bar*.
2. Gandum PRG *event* IND-00412-7 stabil sampai 7 (tujuh) generasi dan diwariskan mengikuti hukum Mendel, serta terdeteksi adanya fragmen *backbone* dari plasmid pIND4-HB4 dan pIND4-BAR, namun tidak terekspresi pada tanaman gandum PRG tersebut.
3. Gandum PRG *event* IND-00412-7 sepadan secara substansial dengan gandum non-PRG.
4. Gandum PRG *event* IND-00412-7 tidak bersifat toksik.
5. TTKH PRG Bidang Keamanan Pakan menilai bahwa Gandum PRG *event* IND-00412-7 yang diajukan adalah aman untuk dikonsumsi sebagai bahan pakan.
6. Apabila di kemudian hari ditemukan data dan informasi baru yang tidak sesuai dengan data keamanan pakan yang diperoleh hingga saat ini, status keamanan pakan Gandum PRG *event* IND-00412-7 perlu dikaji ulang.
7. Apabila setelah ditetapkan aman pakan kemudian Gandum PRG *event* IND-00412-7 terbukti menimbulkan dampak negatif terhadap kesehatan ternak, pemohon (PT Ravindo Sukses Mulia) wajib melakukan tindakan pengendalian dan penanggulangan, serta menarik Gandum PRG *event* IND-00412-7 dari peredaran.

DAFTAR PUSTAKA

- Ayala, F., Fedrigo, G.V., Burachik, M., and Miranda, P.V. 2019. *Compositional equivalence of event IND-00412-7 to non-transgenic wheat*. Transgenic Research, 28(2):165–176.
- Azcona, J.O., Iglesias, B.F., and Charrere, M.V. 2014. *Wheat event IND-00412-7: Nutritional assessment*. Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria (INTA)-EEA Pergamino, Sección Avicultura, Pergamino, Buenos Aires, Argentina.
- Barcelo, P. and Lazzeri, P.A. 1995. *Transformation of cereals by microprojectile bombardment of immature inflorescence and scutellum tissues*. In: Jones, H. (ed.) Method in Molecular Biology, Vol. 49, Plant Gene Transfer and Expression Protocols. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- CERA. 2011. *A review of the environmental safety of the PAT protein*. ILSI Research Foundation, Washington, D.C., USA.

- Christensen, A.H. and Quail, P.H. 1996. *Ubiquitin promoter-based vectors for high level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants*. *Transgenic Research*, 5(4):213–218.
- Christensen, A.H., Sharrock, R.A., and Quail, P.H. 1992. *Maize polyubiquitin genes: Structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation*. *Plant Molecular Biology*, 18:675–689.
- Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P., and Goodman, H.M. 1982. *Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence*. *Journal of Molecular and Applied Genetics*, 1(6):561–573.
- Dezar, C. and Vazquez, M. 2014. *IND-00412-7 wheat molecular report*. Trigall Genetics. Instituto de Agrobiotecnología Rosario (INDEAR), Rosario, Santa Fe, Argentina.
- Fazio, G. 2014. *HAHB4 protein production*. Technical report number: 0000273. Arcadia Bioscience Inc., Davis, California, USA.
- Fazio, G., Ferela, A., and Miranda, P. 2014. *Assessment of HAHB4 protein safety*. Report number: 01010273-Ev2. Updated 2020. Instituto de Agrobiotecnología Rosario (INDEAR), Rosario, Santa Fe, Argentina.
- Gago, G.M., Almoguera, C., Jordano, J., González, D.H., and Chan, R.L. 2002. *Hahb-4, a homeobox-leucine zipper gene potentially involved in ABA-dependent responses to water stress in sunflower*. *Plant, Cell & Environment*, 25:633–640.
- Hérouet, C., Esdaile, D.J., Mallyon, B.A., Debruyne, E., Schulz, A., Currier, T., Hendrickx, K., van der Klis, R.J., and Rouan, D. 2005. *Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 41:134–149.
- Huebner, F.R. and Rothfus, J.A. 1968. *Glialdin proteins from different varieties of wheat*. *Cereal Chemistry*, 45:242–253.
- ILSI. 2016. *A review of the food and feed safety of the PAT protein*. ILSI Research Foundation, Washington, D.C., USA.
- ISAAA. 2021. *GM approval database*. <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/gmtrait/default.asp?TraitID=1&GMTrait=Glufosinate%20herbicide%20tolerance> (Accessed 21 October 2021).
- ISAAA. 2022. *GM approval database*. <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=403> (Accessed 9 February 2022).
- Jeong, H.R., Sun, H.J., Kang, J.N., Kang, H.G., and Lee, H.Y. 2020. *Allergenicity and toxicity evaluation of the PAT protein expressed in herbicide-tolerant genetically modified *Zoysia japonica**. *Journal of Plant Biotechnology*, 47:316–323.
- Manavella, P.A., Arce, A.L., Dezar, C.A., Bitton, F., Renou, J.P., Crespi, M., and Chan, R.L. 2006. *Cross-talk between ethylene and drought signaling pathways is mediated by the sunflower Hahb-4 transcription factor*. *The Plant Journal*, 48:125–137.

- Manavella, P.A., Dezar, C.A., and Chan, R.L. 2008. *Two ABREs, two redundant root-specific and one W-box cis-acting elements are functional in the sunflower HAHB4 promoter*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46:860–867.
- Miranda, P. 2014. *Compositional assessment of IND-00412-7 wheat*. Report Maret: 01-09 v2. Instituto de Agrobiotecnología Rosario (INDEAR), Rosario, Santa Fe, Argentina.
- Miranda, P. 2018. *HAHB4 acute oral toxicity study*. Report ID: 01010288-Ev2. INDEAR. Supervision, Inspection and Testing Center of Genetically Modified Food Safety, Ministry of Agriculture (MOA), College of Food Science and Nutritional Engineering, Chinese Agricultural University (CAU), Beijing, China.
- Obert, J.C., Ridley, W.P., Schneider, R.P., Riordan, S.G., Nemeth, M.A., and Trujillo, W.A. 2004. *The composition of grain and forage from glyphosate tolerant wheat MON 71800 is equivalent to that of conventional wheat (Triticum aestivum L.)*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:1375–1384.
- OECD. 2003. *Consensus document on compositional considerations for new varieties of bread wheat (Triticum aestivum): Key food and feed nutrients, anti-nutrients and toxicants*. ENV/JM/MONO(2003). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology. Environment Directorate, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- Pastori, G.M., Wilkinson, M.D., Steele, S.H., Sparks, C.A., Jones, H.D., and Parry, M.A. 2001. *Age-dependent transformation frequency in elite wheat varieties*. *Journal of Experimental Botany*, 52(357):857–863.
- Rasco-Gaunt, S., Riley, A., Cannell, M., Barcelo, P., and Lazzeri, P.A. 2001. *Procedures allowing the transformation of a range of European elite wheat (Triticum aestivum L.) varieties via particle bombardment*. *Journal of Experimental Botany*, 52(357):865–874.
- Revale, S., Ferela, A., and Miranda, P. 2015. *Bioinformatic analysis of wheat event IND-00412-7*. Technical report number: 0201. Updated 2021. Instituto de Agrobiotecnología Rosario (INDEAR), Rosario, Santa Fe, Argentina.
- 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., Ladics, G.S., Landry, T.D., MacIntosh, S.C., Ricec, E.A., Privallek, L.S., Steinerk, H.Y., Teshimal, R., van Reeb, R., Woolhiserd, M., and Zawodnyk, 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(2):87–98.