

## Lampiran 1

### **RINGKASAN PENGAJIAN KEAMANAN PAKAN KEDELAI PRG *EVENT* MON 89788**

#### **I. PENDAHULUAN**

Kedelai PRG *event* MON 89788 merupakan produk rekayasa genetik dari PT Bayer Indonesia yang mengandung gen sisipan *cp4 epsps*. Gen tersebut mengode protein *5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase* (EPSPS) dan memberikan sifat toleran terhadap herbisida glifosat.

Kedelai PRG *event* MON 89788 telah memperoleh sertifikat aman hayati yang meliputi aman pangan, pakan, dan lingkungan.

Sertifikat aman pangan telah diperoleh di 26 (dua puluh enam) negara, yaitu Amerika Serikat, Filipina, Jepang, Kanada, dan Taiwan (2007); Australia dan Selandia Baru, Meksiko, dan Uni Eropa (2008); Korea Selatan (2009); India, Kolombia, dan Rusia (2010); Cina dan **Indonesia (2011, sertifikat No. HK.04.1.52.04.11.03589 tanggal 13 April 2011)**; Malaysia (2012); Afrika Selatan dan Thailand (2013); Singapura dan Vietnam (2014); Argentina dan Iran (2016); Paraguay (2018); Nigeria (2019); Brasil dan Uruguay (2020).

Sertifikat aman pakan telah diperoleh di 21 (dua puluh satu) negara, yaitu Amerika Serikat, Filipina, Jepang, dan Kanada (2007); Cina dan Uni Eropa (2008); Korea Selatan (2009); India, Kolombia, Rusia, dan Singapura (2010); Turki (2011); Malaysia (2012); Afrika Selatan (2013); Vietnam (2014); Argentina (2016); Taiwan (2017); Paraguay (2018); Nigeria (2019); Brasil dan Uruguay (2020).

Sertifikat aman lingkungan telah diperoleh di 8 (delapan) negara, yaitu Amerika Serikat dan Kanada (2007), Jepang dan Kosta Rika (2008), Uruguay (2009), Argentina (2016), Paraguay (2018), dan Brasil (2020).

Berdasarkan Peraturan Menteri Pertanian No. 36/Permentan/LB.070/8/2016 tentang Pengkajian Keamanan Pakan PRG dan Keputusan Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian No. 466.2/Kpts/OT.210/H/11/2016 tentang Pedoman Teknis Tata Cara dan Mekanisme Pengkajian Keamanan Pakan PRG, TTKH PRG Bidang Keamanan Pakan telah melakukan pengkajian keamanan pakan Kedelai PRG *event* MON 89788 berdasarkan informasi genetik dan informasi keamanan pakan sebagaimana diuraikan berikut ini.

## **II. INFORMASI GENETIK**

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

Kedelai PRG *event* MON 89788 mengandung gen sisipan *cp4 epsps* yang mengode protein EPSPS dan memberikan sifat toleran terhadap herbisida glifosat (Padgett *et al.*, 1996). Gen *cp4 epsps* ini diekspresikan dengan promotor kimera *FMV/Tsf1* dan terminator *rbcS-E9* (Coruzzi *et al.*, 1984).

### **II.2 Sumber Gen Sisipan**

Sumber gen *cp4 epsps* berasal dari *Agrobacterium* sp. strain CP4 (Padgett *et al.*, 1996), promotor *FMV/Tsf1* merupakan gabungan dari promotor *Tsf1* yang berasal dari *Arabidopsis thaliana* (Axelos *et al.*, 1989) dan *enhancer* 35S yang berasal dari figwort mosaic virus (Richins *et al.*, 1987), dan terminator *rbcS-E9* berasal dari *Pisum sativum* (Coruzzi *et al.* 1984).

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

Kedelai PRG *event* MON 89788 dirakit melalui metode transformasi yang dimediasi oleh *A. tumefaciens* dengan plasmid PV-GMGOX20 pada meristem kedelai varietas A3244 (Martinnel *et al.*, 2000). Plasmid yang digunakan membawa satu gen sisipan, yaitu gen *cp4 epsps*. Tanaman pada media seleksi yang tahan glifosat lalu dipindahkan ke rumah kaca dan ditumbuhkan untuk studi lebih lanjut (Dickinson *et al.*, 2006).

### **II.4 Stabilitas Genetik**

Analisis molekuler menggunakan *Southern blot* telah dilakukan untuk mengetahui stabilitas gen sisipan dari generasi ke generasi. Hasil analisis menunjukkan bahwa gen sisipan tersebut stabil sampai tujuh generasi. Dari pola segregasi diketahui bahwa Kedelai PRG *event* MON 89788 mengikuti pola pewarisan hukum Mendel. Selain itu, analisis *Southern blot* juga menunjukkan tidak terdeteksinya sekuens *backbone* dari plasmid transformasi PV-GMGOX20 (Dickinson *et al.*, 2006).

Berdasarkan hasil kajian informasi genetik dapat disimpulkan bahwa Kedelai PRG *event* MON 89788 mengandung satu kopi gen sisipan *cp4 epsps* yang stabil sampai tujuh generasi dengan mengikuti pola pewarisan hukum Mendel, serta tidak mengandung sekuens *backbone* dari plasmid PV-GMGOX20.

### **III. INFORMASI KEAMANAN PAKAN**

#### **III.1 Kesepadanan Substansial**

Pengkajian kesepadanan substansial Kedelai PRG *event* MON 89788 dan kedelai non-PRG A3244 dilakukan berdasarkan dokumen *Study Report* No. MSL-20300 (Lundry *et al.*, 2006). Studi dilakukan di *Monsanto Company Product Safety Center* (St. Louis, Missouri). Penilaian komposisi kimia dilakukan sesuai dengan dokumen konsensus *International Life Science Institute Crop Composition Database* (ILSI, 2004).

Bahan yang digunakan pada studi ini yaitu biji dan hijauan dari Kedelai PRG *event* MON 89788 dan kedelai non-PRG sebagai kontrol (A3244) yang ditanam dengan pengulangan sebanyak 3 kali pada 5 lokasi di Amerika Serikat, yaitu Jackson County (Arkansas), Clinton County dan Warren County (Illinois), York County (Nebraska), dan Fayette County (Ohio). Selain itu, 12 varietas kedelai konvensional sebagai referensi juga dianalisis komposisinya.

Analisis pengujian pada sampel biji kedelai meliputi proksimat (kadar air, abu, protein, lemak, dan karbohidrat), komponen serat, 18 asam amino (alanin, arginin, asam aspartat, sistin, asam glutamat, glisin, histidin, isoleusin, leusin, lisin, metionin, fenilalanin, prolin, serin, treonin, triptofan, tirosin, dan valin), asam lemak (palmitat, stearat, oleat, linoleat, linolenat, arakidat, eikosenoat, dan behenat), vitamin E, isoflavon (daidzein, genistein, dan glycitein), dan zat antigizi (inhibitor tripsin, lektin, asam fitat, rafinosa, dan stakiosa).

Analisis pengujian pada sampel hijauan meliputi proksimat (kadar air, abu, protein, lemak, dan karbohidrat), dan komponen serat.

Hasil analisis menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan pada komposisi biji dan hijauan antara Kedelai PRG *event* MON 89788 dan kedelai non-PRG A3244 dan berada dalam kisaran komposisi nutrisi yang dilaporkan dalam ILSI (2004).

Berdasarkan pengkajian kesepadanan substansial dapat disimpulkan bahwa biji dan hijauan Kedelai PRG *event* MON 89788 sepadan dengan biji dan hijauan kedelai non-PRG.

#### **III.2 Toksisitas**

Evaluasi toksisitas Kedelai PRG *event* MON 89788 meliputi studi bioinformatika, uji pencernaan *in vitro*, dan uji toksisitas oral akut protein CP4 EPSPS.

### III.2.1 Studi bioinformatika protein CP4 EPSPS

Potensi toksisitas protein CP4 EPSPS pada Kedelai PRG *event* MON 89788 dianalisis secara bioinformatik dengan membandingkan homologi sekuens protein tersebut terhadap toksin dalam basis data TOX\_2019 dan protein dalam basis data PRT\_2019 pada NCBI (Skottke dan Silvanovich, 2019). Analisis homologi dilakukan dengan menggunakan algoritma FASTA (Pearson dan Lipman, 1988) dengan kriteria  $E\ score \leq 1 \times 10^{-5}$ . Hasil analisis terhadap basis data TOX\_2019 menunjukkan bahwa tidak ada homologi sekuens dengan  $E\ score \leq 1 \times 10^{-5}$ . Hasil serupa diperoleh pada perbandingan dengan protein dalam basis data PRT\_2019. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada kemiripan struktur antara protein CP4 EPSPS dengan toksin dan protein-protein yang aktif secara biologis yang membahayakan kesehatan (Skottke dan Silvanovich, 2019).

### III.2.2 Kecernaan *in vitro* protein CP4 EPSPS

Laporan pencernaan *in vitro* protein CP4 EPSPS berdasarkan *Study Report* MSL No. 17566 (Leach *et al.*, 2002). Pencernaan dilakukan pada *Simulated Gastric Fluid* (SGF) yang mengandung pepsin dengan pH 1,2 dan diinkubasi pada 37°C dengan interval waktu 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 15; 30; 60 menit. Bahan uji yang digunakan adalah protein CP4 EPSPS rekombinan yang diproduksi oleh *Escherichia coli* dengan kemurnian 90%. Pencernaan dikonfirmasi melalui analisis SDS-PAGE dan *Western blot*. Hasil pengujian menunjukkan bahwa protein CP4 EPSPS tercerna dalam waktu 0,25 menit (15 detik) yang dikonfirmasi dari hasil pengamatan pada SDS-PAGE dan *Western blot*.

Kecernaan *in vitro* pada SGF dan *Simulated Intestinal Fluid* (SIF) juga dilaporkan oleh Harrison *et al.* (1996) menggunakan protein CP4 EPSPS rekombinan diproduksi oleh *E. coli* strain GB100 dengan kemurnian di atas 90%. Prosedur SGF dan SIF mengikuti *the US Pharmacopeia* tahun 1990. Uji SGF dan SIF masing-masing mengandung pepsin dan pankreatin dengan interval waktu masing-masing 0, 15, 30, 60, dan 120 detik serta 0, 10, 32, 100, 270, dan 1.181 menit. Lebih dari 50% protein CP4 EPSPS terdegradasi dalam waktu 15 detik pada SGF dan 10 menit pada SIF.

### III.2.3 Uji toksisitas oral akut protein CP4 EPSPS

Pengkajian uji toksisitas oral akut dilakukan berdasarkan dokumen *Studi Report* No. MSL-13077 (Naylor, 1993) dan publikasi Harrison *et al.* (1996). Bahan uji yang digunakan berupa protein CP4 EPSPS rekombinan yang diproduksi dari *E. coli* dengan tingkat kemurnian 90%. Selain itu, digunakan dua bahan lain sebagai kontrol, yaitu protein *bovine serum albumin* (BSA) dan larutan pembawa (sodium bikarbonat 50 mM).

Studi dilakukan di *Environmental Health Laboratory* (St. Louis, Missouri) dengan menggunakan hewan uji mencit CD-1 yang berasal dari *Charles River Breeding Laboratories* (Portage, Missouri). Sebanyak 50 ekor mencit jantan berumur 5,5 minggu dengan kisaran bobot badan (BB) 25,2–29,8 g dan 50 ekor mencit betina berumur 7 minggu dengan BB 22,7–27,2 g, diberi pakan *Purina Certified Rodent Chow* No. 5002 dan air minum secara *ad libitum*.

Sebanyak 100 ekor mencit dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing terdiri atas 10 ekor jantan dan 10 ekor betina. Kelompok 1 dan 2 adalah kelompok kontrol, kelompok 1 dicekok dengan larutan pembawa dosis 33 ml/kg BB, kelompok 2 dicekok dengan larutan BSA dosis 363 mg/kg BB. Untuk kelompok 3, 4, dan 5 dicekok protein CP4 EPSPS dalam larutan pembawa dengan dosis bertingkat, yaitu 49, 154, dan 572 mg/kg BB. Pengamatan dilakukan selama 7 hari terhadap adanya kelainan gejala klinis, jumlah konsumsi pakan, penambahan BB, dan kematian. Semua mencit diterminasi dengan karbon dioksida pada hari ke-8 atau ke-9, dilanjutkan dengan nekropsi untuk melihat adanya perubahan patologi secara makroskopis pada organ dalam.

Hasil pengujian menunjukkan tidak ada kelainan gejala klinis, tidak ada perbedaan yang signifikan pada penambahan BB, jumlah konsumsi pakan, dan perubahan patologi secara makroskopis antara mencit pada kelompok perlakuan yang dicekok protein CP4 EPSPS dan kelompok kontrol yang diberi BSA dan larutan pembawa. Dapat disimpulkan bahwa protein CP4 EPSPS sampai dengan dosis 572 mg/kg BB tidak menyebabkan toksisitas.

Berdasarkan uji toksisitas untuk protein CP4 EPSPS melalui studi bioinformatika, uji pencernaan *in vitro*, dan uji toksisitas oral akut dapat disimpulkan:

- a. Protein CP4 EPSPS tidak memiliki kemiripan dengan protein toksin yang sudah dikenal.
- b. Protein CP4 EPSPS dapat tercerna pada lambung dan usus dengan cepat.
- c. Protein CP4 EPSPS tidak bersifat toksik.

### **III.3 Studi Pakan**

Telah dilakukan studi pakan Kedelai PRG *event* MON 89788 berdasarkan *Study Report Colorado Quality Research* (CQR) No. MN-06-2 (*Monsanto Study* No. 06-01-30-12) dengan tujuan mengevaluasi nutrisi ransum yang mengandung Kedelai PRG *event* MON89788 dibandingkan dengan kedelai non-PRG (Davis, 2006). Studi dilaksanakan sesuai prosedur standar dari CQR dan regulasi *Good Laboratory Practice* dari *Food and Drug Administration* untuk studi laboratorium nonklinis.

Studi pakan dilakukan menggunakan rancangan *randomized complete block* dengan delapan perlakuan ransum yang mengandung bungkil kedelai, meliputi Kedelai PRG *event* MON 89788 dan kontrolnya (A3244) dari Jackson County (Arkansas), serta kedelai referensi, yaitu A2804, A3559, A4324, ST3870, A2824,

dan A3469 dari Jackson County (Arkansas), Clinton County dan Jefferson County (Iowa).

Pada studi ini digunakan ayam broiler Ross x Ross 308 jantan dan betina berumur 1 hari dari *Welp's Hatchery, Inc.* (Bancroft, Iowa). Tiap perlakuan diulang sebanyak 10 kali. Tiap kandang berisi 10 ekor ayam broiler jantan dan betina (5 ekor jantan dan 5 ekor betina). Tiap perlakuan terdiri atas 100 ekor sehingga berjumlah 800 ekor.

Studi dilaksanakan selama 42 hari, meliputi tiga fase, yaitu *starter*, *grower*, dan *finisher*. Ransum untuk tiap-tiap fase diformulasikan mengandung kalori yang sama (*isocaloric*) dengan kandungan bungkil kedelai yang hampir sama, yaitu 33% untuk ransum *starter* dan 30% untuk ransum *grower* dan *finisher*. Penyusunan ransum mengikuti standar industri dan rekomendasi persyaratan gizi dari NRC. Selama studi, air minum dan ransum tersedia *ad libitum*.

Pengamatan harian dilakukan terhadap fasilitas kandang seperti pencahayaan, air minum, pakan, ventilasi, dan suhu. Pengamatan terhadap kondisi ayam meliputi konsumsi pakan, BB, dan performa yang ditentukan dari rata-rata pertambahan BB pada hari ke-42, dan kematian. Semua ayam yang bertahan hidup kemudian diterminasi dan dibedah. Lemak yang terdapat pada organ dalam dipisahkan dan ditimbang.

Hasil studi menunjukkan tidak ada perbedaan performa secara nyata antara ayam broiler yang diberi pakan mengandung bungkil Kedelai PRG *event* MON 89788 dan kontrolnya. Performa ayam broiler sebanding dan menunjukkan hasil karkas dan komposisi daging yang sama.

Disimpulkan bahwa ransum yang mengandung bungkil Kedelai PRG *event* MON 89788 sama kualitasnya dengan yang mengandung bungkil kedelai kontrol atau referensi dalam hal mendukung pertumbuhan ayam broiler. Dengan demikian, ransum mengandung bungkil Kedelai PRG *event* MON 89788 aman dan bergizi sama seperti kedelai non-PRG.

#### **IV. KESIMPULAN**

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

1. Kedelai PRG *event* MON 89788 mengandung satu gen sisipan *cp4 epsps* (*5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase*) yang mengode protein CP4 EPSPS, stabil sampai tujuh generasi, mengikuti pola pewarisan hukum Mendel dan tidak mengandung sekuens *backbone* dari plasmid transformasi PV-GMGOX20.
2. Kedelai PRG *event* MON 89788 sepadan secara substansial dengan kedelai non-PRG dan tidak bersifat toksik.

3. TTKH PRG Bidang Keamanan Pakan menilai bahwa Kedelai PRG *event* MON 89788 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* MON 89788 perlu dikaji ulang.
5. Apabila setelah ditetapkan aman pakan kemudian Kedelai PRG *event* MON 89788 terbukti menimbulkan dampak negatif terhadap kesehatan ternak, pemohon wajib melakukan tindakan pengendalian dan penanggulangan, serta menarik Kedelai PRG *event* MON 89788 dari peredaran.
6. Kedelai PRG *event* MON 89788 tidak boleh dibudidayakan sampai ditetapkan aman lingkungan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Axelos, M., Bardet, C., Liboz, T., Le Van Thai, A., Curie, C., and Lescure, B. 1989. *The gene family encoding the Arabidopsis thaliana translation elongation factor EF-1-alpha: Molecular cloning, characterization and expression*. Molecular and General Genetics, 219:106–112.
- Coruzzi, G., Broglie, R., Edwards, C., and Chua, N.H. 1984. *Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase*. The EMBO Journal, 3:1671–1679.
- Davis, S.W. 2006. *Comparison of broiler performance and carcass parameters when fed diets containing soybean meal produced from MON 89788, control or reference soybeans*. Colorado Quality Research, Inc., 400 East County Road 72, Wellington, CO 80549, USA.
- Dickinson, E.C., Pineda, N.G., Scanlon, N.K., Whetsell, A.J., and Masucci, J.D. 2006. *Molecular analysis of glyphosate-tolerant soybean MON 89788*. Study number: 05-01-30-20 MSL-20160. Monsanto Company, Product Characterization Center, Biotechnology Regulatory Sciences, 800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167, USA.
- Harrison, L.A., Bailey, M.R., Naylor, M.W., Ream, J.E., Hammond, B.G., Nida, D.L., Burnette, 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*. Journal of Nutrition, 126(3):728–740.
- ILSI. 2004. *Crop composition database, version 2.0*. International Life Science Institute, Washington, D.C. [Online] <http://www.cropcomposition.org> [Accessed January 18, 2006].
- Leach, J.N., Hileman, 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*. Report number: MSL-17566. Monsanto Company, Product Safety Center, 800 North Lindbergh Blvd, St. Louis, MO 63167, USA.

- Lundry, D.R., Riordan, S.G., Breeze, M.L., and Sorbet, R. 2006. *Amended report for MSL-20163: Composition analyses of soybean forage and seed collected from MON 89788 grown in the United States during the 2005 field season*. Unpublished Monsanto study report: MSL-20300. Performing laboratories: Monsanto Company, Product Safety Center, 800 North Lindbergh Blvd, St. Louis, MO 63167, USA.
- Martinell, B.J., Julson, L.S., Mills, L., Emler, C.A., Huang, Y., Mc Cabe, D.E., and Williams, E.J. 2000. *Soybean Agrobacterium transformation method*. United States Patent, Patent number: US6,384,301 B1, May 7, 2002.
- Naylor, M.W. 1993. *Acute oral toxicity study of CP4 EPSPS protein in albino mice*. Report number: MSL-13077. Monsanto Company, Product Characterization Center, Biotechnology Regulatory Sciences, 800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167, USA.
- Padgett, S.R., Re, D.B., Barry, G.F., Eichholtz, D.E., Delannay, X., Fuchs, R.L., Kishore, G.M., and Fraley, R.T. 1996. *New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready™ gene*. In: Duke, S.O. (ed.) *Herbicide-resistant crops: Agricultural, environmental, economic, regulatory, and technical aspects*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 53–84 pp.
- Pearson, W.R. and Lipman, D.J. 1988. *Improved tools for biological sequence comparison*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 85:2444–2448.
- Richins, R.D., Scholthof, H.B., and Shepherd, R.J. 1987. *Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group)*. Nucleic Acids Research, 15:8451–8466.
- Skottke, K. and Silvanovich, A. 2019. *Updated bioinformatics evaluation of CP4 EPSPS utilizing the AD\_2019, TOX\_2019, and PRT\_2019 databases*. Regulatory project ID: REG-2019-0156. Monsanto Company, Monsanto Regulatory, 700 Chesterfield Parkway, West Chesterfield, MO 63017, USA.