

Ringkasan Pengkajian Keamanan Pangan Jagung PRG NK603

I. Pendahuluan

Jagung PRG NK603 mengandung protein CP4 EPSPS termasuk protein CP4 EPSPS L214P yang diekspresikan oleh gen CP4 EPSPS. Gen CP4 EPSPS diperoleh dari hasil isolasi bakteri tanah *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4, yang bertanggung jawab dalam toleransi terhadap herbisida *glyphosate*.

Berdasarkan 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 Jagung PRG NK603 berdasarkan informasi genetik dan informasi keamanan pangan yang terdiri atas kesepadanan substansial, alergenisitas, dan toksisitas sebagaimana diuraikan di bawah ini.

II. Informasi Genetik

A. Elemen Genetik

Jagung PRG NK603 mengandung satu gen interes yaitu CP4 EPSPS (*5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase*) yang bertanggung jawab dalam toleransi terhadap herbisida *glyphosate*.

B. Sumber Gen Interes

Gen CP4 EPSPS adalah hasil isolasi bakteri tanah *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4.

C. Sistem Transformasi

Jagung PRG NK603 dirakit melalui transformasi jagung dengan penembakan partikel mikro (*microparticle bombardment*). Plasmid PV-ZMGT32 yang dipersiapkan untuk membentuk fragmen DNA *MluI* linear ditransformasi pada jagung PRG NK603. Fragmen DNA *MluI* linear tidak mengandung *origin of replication (ori)* dan penanda resistensi antibiotik (*nptII*). Plasmid vektor PV-ZMGT32 mengandung dua kaset gen CP4 EPSPS. Masing-masing kaset mengandung satu kopi gen CP4 EPSPS dengan sekuen pengaturnya (*regulatory sequence*). Kaset CP4 EPSPS yang satu mengandung promotor aktin padi (*p-ract1*) dan *intron ract1*, sekuen peptida transit kloroplas (CTP2, yang berasal dari gen EPSPS *Arabidopsis thaliana*), gen CP4 EPSPS, dan terminator NOS3', sedangkan kaset CP4 EPSPS yang lain mengandung promotor e35S dan intron *ZmHSP70*, sekuen peptida transit kloroplas (CTP2, yang berasal dari gen EPSPS *A. thaliana*), gen CP4 EPSPS, dan terminator NOS3'.

D. Stabilitas Genetik

Stabilitas genetik dan segregasi dilakukan dengan analisis *Southern blot*. Setelah diuji selama beberapa generasi, gen yang disisipkan masih stabil dan berada

didalam genom jagung PRG NK603. Analisis segregasi menunjukkan penyisipan satu *active site* dari gen CP4 EPSPS pada genom jagung PRG NK603 dan tersegregasi sesuai dengan Hukum Mendel. Stabilitas dari penyisipan telah ditunjukkan pada enam generasi penyilangan dan tiga generasi penyerbukan sendiri (*self-pollination*).

Dari hasil pengkajian dapat disimpulkan bahwa gen interes (CP4 EPSPS) yang diintroduksi ke jagung PRG NK603 stabil pada enam generasi penyilangan dan tiga generasi penyerbukan sendiri (*self-pollination*), gen interes (CP4 EPSPS) yang diintroduksi ke jagung PRG NK603 diwariskan mengikuti Hukum Mendel; dan jagung PRG NK603 tidak ada bedanya dengan jagung non PRG kecuali dari sifat toleran herbisida *glyphosate*.

III. Informasi Keamanan Pangan

A. Kesepadanan Substansial

Pengkajian Jagung PRG NK603 terkait dengan kesepadanan substansial telah dipublikasikan secara internasional dalam jurnal berikut ini:

- Arch. Anim. Nutr., Vol. 56, 2002, pp. 229-235
- J. Agric. Food Chem., Vol. 50, 2002, pp. 7235-7243
- J. Anim. Sci., Vol. 81, 2003, pp. 2600-2608
- J. Dairy Sci., Vol. 86, 2003, pp. 1707-1715
- J. Dairy Sci., Vol. 86, 2003, pp. 1734-1741
- Poultry Science, Vol. 82, 2003, pp. 443-453

Publikasi dalam J. Anim. Sci., J. Dairy Sci., dan Poultry Science terkait dengan pengkajian kesepadanan substansial sebagai pakan ternak untuk sapi perah dan unggas.

Sampel untuk pengkajian kesepadanan substansial diambil dari *field trial* yang dilakukan pada tahun 1998 dan 1999. Percobaan ini dilakukan di beberapa tempat di USA antara lain di Illinois, Indiana, Kansas, dan Texas serta beberapa tempat di EU, seperti di Perancis dan Italia.

Analisis komposisi yang dilakukan sangat luas termasuk analisis proksimat, analisis serat (*Acid Detergent Fiber (ADF)*, *Neutral Detergent Fiber (NDF)*), mineral (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P, K, Na, dan Zn), komposisi asam amino, komposisi asam lemak, vitamin E, asam folat, anti nutrisi (asam fitat dan trypsin inhibitor), komposisi metabolit sekunder (asam firulat, asam para kumarat, 2-furaldehida, dan rafinosa). Hasil analisis menunjukkan komposisi jagung PRG NK603 masuk ke dalam 99% interval toleransi dari komponen-komponen 19 jagung hibrida konvensional (non PRG) yang sudah dikomersialkan.

Dari hasil pengkajian dapat disimpulkan bahwa jagung PRG NK603 sepadan secara substansial dengan jagung kontrol pembanding (non PRG).

B. Alergenisitas

Pengkajian Jagung PRG NK603 terkait dengan alergenitas dilakukan terhadap data company report dan publikasi dalam jurnal berikut ini:

- Journal of Nutrition 1996 Vol. 126 : 728-740.
- J. Allergy Clin Immunol 2005 Vol. 116(2) : 403-410.

Jagung ini mengandung protein baru (hasil ekspresi gen yang diklon) CP4 EPSPS dan CP4 EPSPS L214P. Uji kesamaan struktur protein dilakukan pada daerah sisi aktif protein ini dan pada struktur 3 dimensi protein, khususnya pada bagian dengan urutan asam amino yang bersifat homolog.

Kesamaan struktur dan fungsi CP4 EPSPS dan CP4 EPSPS L214P didasarkan pada asam amino prolin pada posisi 214 pada protein EPSPS, pemodelan struktur kristal CP4 EPSPS yang menunjukkan bahwa penggantian L214P tidak mengubah baik struktur sekunder maupun struktur tertier protein CP4 EPSPS maupun aktivitas enzimatis protein ini. Kedua protein ini ekuivalen dalam hal struktural maupun fungsional.

Telah dilakukan studi bioinformatika dengan melampirkan referensi *Technical reports* oleh Silvanovich *et al*, 2009. *Copy Technical Report* disertakan dalam dokumen (*Updated Bioinformatics Evaluation of the CP4 EPSPS Protein Utilizing the AD_2009 and TOX_2009 Database dan Bioinformatic Evaluation of the CP4 EPSPS L214P sequence using the AD_2009 and TOX_2009 Database*). Tidak ditemukan homologi antara kedua protein hasil klon dengan protein yang bersifat alergenik, termasuk gliadin dan glutenin. Database diperoleh dari PIR, SwissProt, EMBL dan GenBank, AD_209 dan TOX_2009. Analisis perbandingan sekuens asam amino protein CP4 EPSPS dan CP4 EPSPS L214P dengan sekuens asam amino 567 protein yang terkait dengan alergen dan penyakit celiac yang ada di database menunjukkan tidak adanya kesamaan. Demikian pula analisis terhadap sekuens 8 asam amino yang berpotensi bereaksi dengan IgE menunjukkan ketidakmiripan antara protein CP4 EPSPS dan CP4 EPSPS L214P dengan protein lain yang diketahui bersifat alergen.

Protein yang diklon mudah dicerna secara *in vitro*. Hasil analisis Western Blot menunjukkan bahwa protein CP4 EPSPS dihancurkan oleh cairan lambung dengan waktu paruh kurang dari 15 detik dan dicerna oleh cairan usus dengan waktu paruh kurang dari 10 menit. Protein CP4 EPSPS L214P juga dapat dicerna oleh cairan lambung dengan waktu paruh kurang dari 15 detik. Hal ini berimplikasi bahwa kedua protein dapat dicerna dengan sangat cepat. Prosedur *in vitro digestion* dan Data SDS PAGE serta Western Blot hasil percobaan ini dilampirkan, demikian pula metoda Western Blot yang dilaporkan dalam *Technical report* dan telah dipublikasikan dalam jurnal ilmiah disertakan salinannya. Referensi metoda evaluasi daya cerna protein dilampirkan, demikian pula salinan jurnal ilmiah/publikasinya.

Kandungan protein CP4 EPSPS dan CP4 EPSPS L214P berjumlah kurang dari 0.01% pada bahan pangan jagung PRG NK603.

Dari kajian alergenitas Jagung PRG NK603 dapat disimpulkan bahwa protein CP4 EPSPS tidak menunjukkan adanya potensi dapat menimbulkan alergi.

C. Toksisitas

Pengujian toksisitas dilakukan melalui tiga pengujian, yaitu simulasi pencernaan dalam cairan lambung dan cairan usus, uji toksisitas akut, dan studi bioinformatika.

1. Simulasi pencernaan dalam cairan lambung dan cairan usus

Hasil pengujian simulasi pencernaan protein CP4 EPSPS dengan cairan lambung dan cairan usus secara *in vitro*, telah disampaikan secara lengkap, sebagai *Company Report* :

- a) *Assessment on the in vitro Digestive Fate of CP4 EPS Synthase* oleh Joel E Ream, Michele R Bailey, John N Leach dan Stephen R Padgett. Penelitian dilaksanakan di The Agricultural Group of Monsanto Company, New Product Division, 700 Chesterfield Parkway North, St Louis, MO 63198.

Kesimpulan: protein CP4 EPSPS dapat dicerna secara cepat dalam cairan lambung dan cairan usus, yang dibuktikan baik dengan analisis Western blot maupun aktivitas enzim. Waktu paruh CP4 EPSPS dalam cairan usus adalah < 10 menit, dibuktikan dengan analisis Western blot. Aktivitas enzim CP4 EPSPS menurun sekitar 5% setelah diinkubasikan dalam cairan usus, dan menurun 91 - 94% setelah diinkubasikan selama 4,5 jam.

- b) *Assessment on the in vitro Digestibility of Purified E. Coli Produced CP4 EPS Protein in Simulated Gastric Fluid* oleh John N Leach, Ronald E Hileman, Jamie J Thorp, Cherian George dan James D Astwood. *Performing laboratory* adalah Monsanto Company, Product Safety Center, 800 North Lindbergh, St Louis, MO 63167.

Kesimpulan: protein CP4 EPSPS yang diproduksi oleh *E. coli* dapat dicerna secara cepat setelah diinkubasikan dalam SGF pada suhu 37°C. Lebih dari 98% protein dapat dicerna dalam waktu 15 detik, yang ditentukan dengan *colloidal blue gel staining*. Lebih dari 95% protein dapat dicerna dalam waktu 15 detik, yang ditentukan dengan analisis Western blot. Aktivitas enzim EPSPS dapat dikurangi sebanyak > 90 % dalam waktu 15 detik selama protein CP4 EPSPS diinkubasikan dalam SGM. Dari ketiga macam metode deteksi, semuanya menunjukkan bahwa protein CP4 EPSPS yang diproduksi oleh *E. coli* dapat didegradasi secara cepat dalam simulasi cairan lambung.

- c) *The Effect of Corn Grain Matrix on the in vitro Digestibility of CP4 EPSPS and CP4 EPSPS L214P Proteins from the Grain of Roundup Ready® Corn Event NK603 in Simulated Gastric Fluid* oleh John N Leach, Cherian George dan James D Astwood. *Performing laboratory* adalah Monsanto Company, Product Safety Center, North Lindbergh, St Louis, MO 63167.

Kesimpulan: Protein CP4 EPSPS dan CP4 EPSPS L214P dapat dicerna dengan cepat setelah diinkubasikan dalam SGF. Sedikitnya 98% protein dapat dicerna dalam waktu 15 detik, yang ditentukan dengan Western blot. Jaringan biji jagung tidak berpengaruh pada daya cerna protein *in vitro*.

2. Uji toksisitas akut

Uji toksisitas akut terhadap protein *E. coli*-produced protein telah dilakukan pada mencit dan hasilnya dilaporkan sebagai *Company Report (Report No. MSL-18267)*. Mencit diberi ransum dan air *ad libitum*, sedangkan protein yang diuji (protein CP4 EPSPS yang diproduksi oleh bakteri *E. coli*) diberikan dengan sonde (*gavage*) pada dosis yang berbeda, sebagai berikut :

An Acute Oral Toxicity Study in Mice with E. coli-produced CP4 EPSPS L214P Protein oleh Kimberly L. Bonnette. *Performing Laboratory* adalah Springborn Laboratories, Inc. (SLI) Ohio Research Center 640 North Elizabeth Street Spencerville, Ohio 45887.

Keterangan:

Protein CP4 EPSPS yang diproduksi oleh jagung PRG NK603 sangat sedikit (< 0,01% dari total protein jagung), sehingga dalam pengujian toksisitas akut digunakan protein CP4 EPSPS yang dihasilkan oleh bakteri *E. coli*.

Hal tersebut didasarkan pada hasil penelitian kesetaraan protein CP4 EPSPS yang dihasilkan *E. coli* dengan protein CP4 EPSPS yang dihasilkan tanaman jagung PRG NK603 (*Assessment of the Equivalence of CP4 EPSPS Protein Expressed in Escherichia coli and in Roundup Ready Corn Lines NK600 and NK603, Thomas C Lee PhD, James D Astwood Ph.D., Monsanto Company Biotechnology Regulatory Science St Louis, MO, 1999*).

Berdasarkan atas kesamaan berat molekul (47kD) dan keidentikan karakteristik imunologi protein pada pendeteksian menggunakan antibodi spesifik untuk protein CP4 EPSPS, Protein CP4 EPSPS yang dihasilkan dari tanaman jagung PRG NK603 terbukti setara dengan protein CP4 EPSPS yang diekspresikan dan dimurnikan dari bakteri *Escherichia coli*.

Hasil uji toksisitas yang diperoleh adalah sebagai berikut:

- Tidak terdapat mencit yang mati selama percobaan berlangsung, baik pada grup kontrol maupun grup perlakuan,
- Tidak terdapat gejala klinis pada semua mencit selama percobaan berlangsung,
- Tidak terdapat perbedaan secara nyata dalam konsumsi ransum antara grup kontrol dan grup perlakuan,
- Tidak terdapat perbedaan secara nyata dalam hal berat badan maupun perubahan berat badan antara grup kontrol dan grup perlakuan,
- Tidak ditemukan adanya kelainan patologis pada organ dalam mencit pada akhir percobaan,

- Berdasarkan perhitungan ditetapkan bahwa NOEL (*No Observed Effect Level*, batas tak ditemukannya dampak) pemberian protein CP4 EPSPS adalah 817 mg/kg berat badan.

Protein CP4 EPSPS yang diekspresikan pada jagung PRG NK603 yang diberikan secara oral, tidak menunjukkan efek toksik pada mencit. Tidak ditemukan homologi antara kedua protein hasil klon dengan protein yang bersifat alergenik, termasuk gliadin dan glutenin.

3. Studi Bioinformatika

Telah dilakukan studi bioinformatika dengan melampirkan referensi *Technical reports* oleh Silvanovich *et al*, 2009. *Copy Technical Report* disertakan dalam dokumen (*Updated Bioinformatics Evaluation of the CP4 EPSPS Protein Utilizing the AD_2009 and TOX_2009 Database dan Bioinformatic Evaluation of the CP4 EPSPS L214P sequence using the AD_2009 and TOX_2009 Database*). Tidak ditemukan homologi antara kedua protein hasil klon dengan protein yang bersifat toksik. Database diperoleh dari PIR, SwissProt, EMBL dan GenBank, AD_209 dan TOX_2009. Analisis terhadap sekuen 8 asam amino yang berpotensi bereaksi dengan IgE menunjukkan ketidakmiripan antara protein CP4 EPSPS dan CP4 EPSPS L214P dengan protein lain yang diketahui bersifat toksik.

Dari hasil pengkajian dapat disimpulkan bahwa protein CP4 EPSPS termasuk dalam golongan zat yang praktis tidak toksik (*practically non toxic*).

IV. Kesimpulan

Atas dasar beberapa uraian tentang informasi genetik dari gen CP4 EPSPS hasil isolasi bakteri tanah *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4 yang disisipkan dalam Jagung PRG NK603; analisis kesepadanan substansial antara komposisi Jagung PRG NK603 dengan jagung bukan PRG; serta alergenitas dan toksisitas dari protein CP4 EPSPS, maka dapat disimpulkan bahwa Jagung PRG NK603 dapat dinyatakan aman untuk dikonsumsi sebagai bahan pangan.

Disarankan bahwa selama Jagung PRG NK603 belum memperoleh sertifikat aman lingkungan, maka jika ditemukan adanya biji jagung yang tumbuh (*tanaman volunteer*) harus segera dimusnahkan. Meskipun demikian, karena hal ini terkait dengan aspek keamanan lingkungan, maka saran ini dapat diabaikan apabila Jagung PRG NK603 telah memperoleh sertifikat keamanan lingkungan.