

# Tanaman Hasil *Genome Editing* dan Tantangan Pengaturan Keamanannya di Indonesia

## (Genome-Edited Plants and the Challenges of Regulating Their Biosafety in Indonesia)

Bahagiawati\*, Dani Satyawan, dan Tri J. Santoso

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia  
Telp. (0251) 8622833; Faks. (0251) 8622833; \*E-mail: bahagiawati@indo.net.id

Diajukan: 31 Mei 2019; Direvisi: 27 November 2019; Diterima: 12 Desember 2019

### ABSTRACT

Genome editing is a precise breeding technique to improve plant properties by editing specific genes that regulate desired trait. Genome editing techniques can be designed so that the resulting plant does not contain foreign genes and the resulting changes in DNA sequences cannot be distinguished from products obtained by conventional gene mutations which have been considered as safe and therefore unregulated. Thus, genome editing products in some countries are also not specifically regulated as GM products even though their assembly process uses recombinant DNA and genetic transformation. Brazil, like Indonesia ratified the Cartagena Protocol, but it issued a special regulation that provides dispensation for several types of genome editing products and exempts them from regulations that apply to transgenic plants. The steps taken by other countries in regulating genome editing products can be taken into consideration in drafting regulations in Indonesia, in order to create a conducive environment that supports the use of this potential technology while at the same time provides assurance regarding its safety to human health and the environment. The purpose of this review was to provide information on the development of genome editing technologies in plant breeding, analyze its risks compared to that of conventional breeding, and compare its biosafety regulation in various countries to provide some considerations for drafting regulations on the risk assessment of genome editing products in Indonesia, as a ratifying country of the Cartagena Protocol.

**Keywords:** Genome editing, CRISPR/Cas9, biosafety, variety release regulation.

### ABSTRAK

Teknik *genome editing* merupakan teknik pemuliaan presisi untuk memperbaiki sifat tanaman dengan cara mengedit gen penyebab sifat tersebut secara spesifik. Teknik ini dapat didesain agar tanaman produknya tidak mengandung gen asing dan perubahan sekuen DNA-nya tidak dapat dibedakan dengan produk hasil mutasi gen yang selama ini dianggap aman dan tidak diregulasi khusus. Oleh karenanya, produk teknik *genome editing* di beberapa negara juga tidak diregulasi khusus seperti tanaman produk rekayasa genetik (PRG), meskipun proses perakitanya menggunakan DNA rekombinan dan transformasi genetik. Brasil, sebagai negara peratifikasi Protokol Cartagena seperti halnya Indonesia, bahkan mengeluarkan peraturan khusus yang memberikan dispensasi pada beberapa jenis produk *genome editing* sehingga tidak perlu melewati regulasi seperti tanaman transgenik. Langkah-langkah yang ditempuh oleh negara-negara lain dalam meregulasi produk *genome editing* dapat dijadikan pertimbangan dalam menyusun regulasi di Indonesia, agar tercipta iklim yang mendukung pemanfaatan teknologi potensial ini dengan tetap memerhatikan dihindarinya dampak negatif terhadap kesehatan manusia dan lingkungan. Tujuan tinjauan ini ialah memberi informasi tentang perkembangan teknik *genome editing* pada tanaman, analisis risiko keamanan hayatinya dibandingkan dengan tanaman produk pemuliaan konvensional, serta perbandingan regulasinya di berbagai negara dalam konteks regulasi produk PRG sebagai bahan pertimbangan penyusunan peraturan penjaminan keamanan hayati di Indonesia yang merupakan negara peratifikasi Protokol Cartagena.

**Kata kunci:** *Genome editing*, CRISPR/Cas9, keamanan hayati, peraturan pelepasan varietas.

## PENDAHULUAN

Sistem seleksi yang menghasilkan tanaman yang superior telah dilakukan selama ribuan tahun dalam bidang pertanian. Dengan dirumuskannya hukum Mendel tentang pewarisan sifat pada tahun 1866, pemuliaan tanaman mulai dirintis dengan menyilangkan genotipe yang superior dengan genotipe lain yang kompatibel untuk mendapatkan sifat-sifat yang lebih baik lagi, seperti peningkatan kualitas produk dan produktivitas, dan/atau perbaikan ketahanan hama dan penyakit (Hartung dan Schiemann 2014).

Setelah diketahui bahwa gen merupakan penyebab adanya sifat-sifat yang menguntungkan dan merugikan, sejak awal abad ke-20 dikembangkanlah pemuliaan dengan mutasi gen atau mutagenesis dengan mempergunakan bahan kimia dan radiasi (Muller 1927). Mutasi yang dihasilkan bersifat acak dan tidak spesifik sehingga DNA yang terdampak dapat mencapai ratusan basa dan bisa memengaruhi beberapa gen sekaligus. Oleh karena itu, mutagenesis harus diteruskan dengan proses seleksi ratusan hingga ribuan mutan untuk mendapatkan mutan dengan sifat yang diinginkan dan mengeliminasi mutan-mutan yang membawa karakter yang tidak diinginkan.

Sejak pertengahan tahun 1990-an, kemajuan dalam bidang biologi molekuler memungkinkan dikembangkan teknologi rekayasa genetik yang dapat menghasilkan tanaman dengan sifat yang tidak dapat dikembangkan melalui pemuliaan konvensional. Dengan teknik ini, sifat yang diinginkan dapat ditambahkan melalui gen yang disisipkan ke dalam genom tanaman target, dan gen tersebut dapat diperoleh dari spesies, genus, kelas, bahkan kerajaan lain (Bahagiawati 2004). Contoh tanaman produk rekayasa genetik (PRG) ini yaitu tanaman kapas Bt yang tahan hama dan padi emas yang mengandung beta karotin (Cressey 2013). Keduanya tidak pernah ditemukan di alam dan mustahil dikembangkan melalui pemuliaan konvensional. Akan tetapi, tidak adanya contoh tanaman semacam itu di alam juga menimbulkan pertanyaan akan pengaruhnya ke kesehatan manusia dan lingkungan.

Untuk memastikan keamanan produk-produk hasil rekayasa genetik ini, disusunlah beberapa peraturan yang bersifat internasional, seperti Protokol Cartagena dan *Codex Alimentarius (Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Derived from Recombinant-DNA Plants, CXG 45-2003)*, yang memberikan pedoman internasional pengkajian keamanan pangan PRG. Hampir setiap negara menyusun peraturan tentang pengkajian keamanan hayati

pemanfaatan PRG dengan mengacu pada sistem baku yang selalu diharmonisasikan, baik dalam forum regional maupun internasional. Selain itu, setiap negara juga mempunyai sistem tersendiri sehingga proses perizinan komersialisasi PRG dapat berbeda antar negara. Meskipun regulasi yang harus dilewati bervariasi, kini lebih dari 100 event PRG telah memperoleh izin pelepasan secara komersial di berbagai negara dan perkembangan penanaman serta pemanfaatan tanaman PRG telah berkembang pesat di dunia. Sejak pertama kali ditanam untuk tujuan komersial di tiga negara pada tahun 1996 dengan luas tanam sekitar 1,6 juta hektar, kini tanaman PRG telah ditanam di 28 negara dengan luas tanam sekitar 189,8 juta hektar, dengan empat komoditas utama, yaitu kapas, jagung, kedelai, dan kanola (James 2017).

Meskipun demikian, proses perizinan pelepasan varietas PRG masih dianggap memerlukan waktu yang lama dan biaya yang besar. Hasil survei menunjukkan bahwa biaya rata-rata untuk proses pengembangan dan pelepasan PRG oleh perusahaan swasta sebesar USD 136 juta dan diperlukan waktu kumulatif 232,4 bulan atau hampir 20 tahun (McDougall 2011). Waktu dan biaya yang harus dikeluarkan untuk satu produk saja tentunya terlalu besar dan di luar kemampuan banyak lembaga penelitian, terutama di negara berkembang, sehingga menghambat kemajuan iptek di bidang rekayasa genetika. Perusahaan raksasa seperti Monsanto bahkan memutuskan untuk tidak lagi mengajukan izin pelepasan di Uni Eropa karena proses perizinannya terlalu lama (Hope 2013). Situasi ini mendorong ilmuwan di berbagai negara untuk mengembangkan teknologi yang dapat menghindari regulasi di atas, yang didasarkan atas kekhawatiran keamanan disisipkannya gen dari organisme berbeda spesies dan tidak mungkin terjadi secara alami.

Pada tahun 2013 mulai dipublikasikan teknik-teknik pemuliaan presisi yang kemudian dikenal dengan istilah *genome editing* (Curtin et al. 2013; Jiang et al. 2013; Qi et al. 2013; Wendt et al. 2013). *Genome editing* adalah suatu metode yang menarget sebuah sekuens DNA di dalam genom suatu organisme sehingga dapat disisipi, diganti, atau dihapus dengan bantuan enzim nuklease yang berfungsi sebagai gunting molekuler (Schinkel dan Schillberg 2016). Salah satu metode *genome editing*, yaitu *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9)*, menjadi populer karena lebih mudah penerapannya (Belhaj et al. 2013). Di beberapa negara, tidak adanya sisipan gen asing dalam produk CRISPR/Cas9 membuatnya dianggap bukan termasuk golongan PRG

sehingga regulasi pelepasannya lebih mudah (Jones 2015; Bogdanove et al. 2018). Saat ini, beberapa produk CRISPR/Cas9 sudah dirakit di luar negeri dan sebentar lagi akan memasuki pasar dunia. Di Indonesia usaha perakitannya juga telah dimulai beberapa tahun lalu, namun masih pada fase awal (Santoso 2015). Mengingat perkembangan produk tanaman hasil *genome editing* ini demikian pesat, Indonesia saat ini perlu untuk mulai merumuskan regulasi yang dipandang cocok untuk pemanfaatan produk hasil *genome editing* ini.

Banyak pendapat menyatakan bahwa *genome editing* pada tanaman berpotensi besar dalam ketahanan pangan yang berkelanjutan untuk menghadapi ancaman perubahan iklim, penambahan penduduk, dan penyusutan lahan pertanian (Bogdanove et al. 2018). Namun, jika regulasi untuk penelitian dan pemanfaatannya diatur seperti regulasi tanaman PRG yang memerlukan waktu lama dan biaya mahal, kondisi tersebut tentu akan menghambat perkembangan dan pemanfaatan teknologi ini (Voytas dan Gao 2014; Jones 2015; Bogdanove et al. 2018). Tinjauan (*review*) ini akan memberikan informasi tentang perkembangan teknik *genome editing* pada tanaman, analisis risiko keamanan hayatinya bila dibandingkan dengan tanaman produk pemuliaan konvensional, serta perbandingan regulasinya di berbagai negara dalam konteks regulasi produk PRG sebagai bahan pertimbangan penyusunan peraturan penjaminan keamanan hayati di Indonesia yang merupakan negara peratifikasi Protokol Cartagena.

#### TEKNIK-TEKNIK *GENOME EDITING* UNTUK PERAKITAN TANAMAN UNGGUL

Teknik *genome editing* merupakan sebuah teknologi untuk memodifikasi sekuen DNA utas ganda tertentu dari milyaran sekuen DNA yang ada di dalam sel hidup (Voytas 2013). Teknologi *genome editing* generasi awal menggunakan perantara oligonukleotida (*oligonucleotide-mediated mutagenesis*, OMM), yang disintesis secara kimiawi dan berfungsi untuk membantu enzim pemulihan DNA dalam menemukan situs spesifik gen dan melakukan penggantian atau penambahan basa DNA (Beetham et al. 1999). Saat ini, generasi terbaru teknologi *genome editing* menggunakan enzim *nuclease* yang telah dimodifikasi dengan situs terarah (*site-directed nucleases*, SDNs; atau kadang-kadang disebut juga *site-specific nucleases*, SSNs), yang mampu melakukan penargetan sangat spesifik pada gen yang diinginkan. Pemotongan utas ganda DNA (*double strand breaks*, DSBs) oleh enzim SDN akan memicu

mekanisme perbaikan/reparasi DNA di dalam sel tersebut. Jenis reparasi yang dilakukan sel selanjutnya dapat diarahkan untuk menghasilkan sejumlah modifikasi sekuen DNA, baik berupa penghilangan sekuen DNA (delesi) maupun penyisipan (insersi) DNA baru dalam berbagai ukuran (Puchta dan Fauser 2013).

Kelas utama SDN diketahui ada empat, yaitu *meganuclease* (MegaN), *zinc finger nucleases* (ZFNs), *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs), dan CRISPR/Cas9 (Abdallah et al. 2015). MegaN adalah endonuklease alami yang dapat mengenali dan memotong sekuen DNA berukuran besar (12–40 bp). Setelah pemotongan terjadi, sel akan mengalami reparasi DNA secara alami untuk rekombinasi atau induksi insersi dan delesi (*indel*). Kelemahan MegaN berupa keterbatasan variasi enzim tersebut dan sekuen targetnya tidak banyak mencakup lokus-lokus yang penting. ZFNs merupakan protein yang mempunyai penempelan spesifik sekuen DNA (3 bp). ZFNs dapat mengedit gen spesifik (20 bp DNA) dari sebuah genom dengan penggabungan 6–8 *zinc finger*. Protein sintetik ini difusikan dengan domain katalitik endonuklease *FokI* untuk menginduksi pemotongan DNA target dan reparasi DNA. Sementara itu, TALENs adalah enzim restriksi artifisial yang digabungkan dengan domain katalitik endonuklease *FokI* dengan monomer yang sesuai dari domain penempelan DNA yang dapat diarahkan pada sekuen nukleotida tertentu pada genom. Setelah berada di inti sel, nuklease artifisial akan menempel pada situs target, domain *FokI* akan mengalami dimerisasi dan menyebabkan pemotongan DNA utas ganda pada sekuen target. Sistem CRISPR/Cas9 merupakan teknologi SDN yang paling mutakhir. Dengan CRISPR/Cas9, penargetan DNA dicapai melalui sebuah RNA penuntun (*guide RNA*) yang basa-basanya berpasangan secara spesifik dengan sekuen target dalam kromosom (Shan et al. 2013). Kompleks pasangan RNA dan DNA ini kemudian dikenali dan dipotong oleh nuklease Cas9.

Hasil akhir pengeditan genom dipengaruhi oleh jalur reparasi (*repair pathway*) yang digunakan dan ketersediaan cetakan untuk reparasi. Dua jalur reparasi DSB yang telah diketahui, yaitu *non-homologous end joining* (NHEJ) dan *homologous recombination* (HR) (Voytas 2013; Bortesi dan Fischer 2015). Dalam mekanisme NHEJ, proses penyambungan kembali kedua utas DNA yang terpotong dapat menyebabkan terjadinya penyisipan atau penghilangan sekuen DNA secara acak. Hal ini dikarenakan sel tidak memiliki rujukan sekuen DNA yang harus dipulihkan atau mendapatkan rujukan yang keliru karena utas DNA masing-masing

menempel pada posisi yang salah. Bila mekanisme NHEJ terjadi pada daerah pengode sebuah gen, dapat dihasilkan mutasi yang berakibat pada rusaknya atau hilangnya fungsi produk gen (protein) tersebut dan dikenal dengan istilah *gene knockout*.

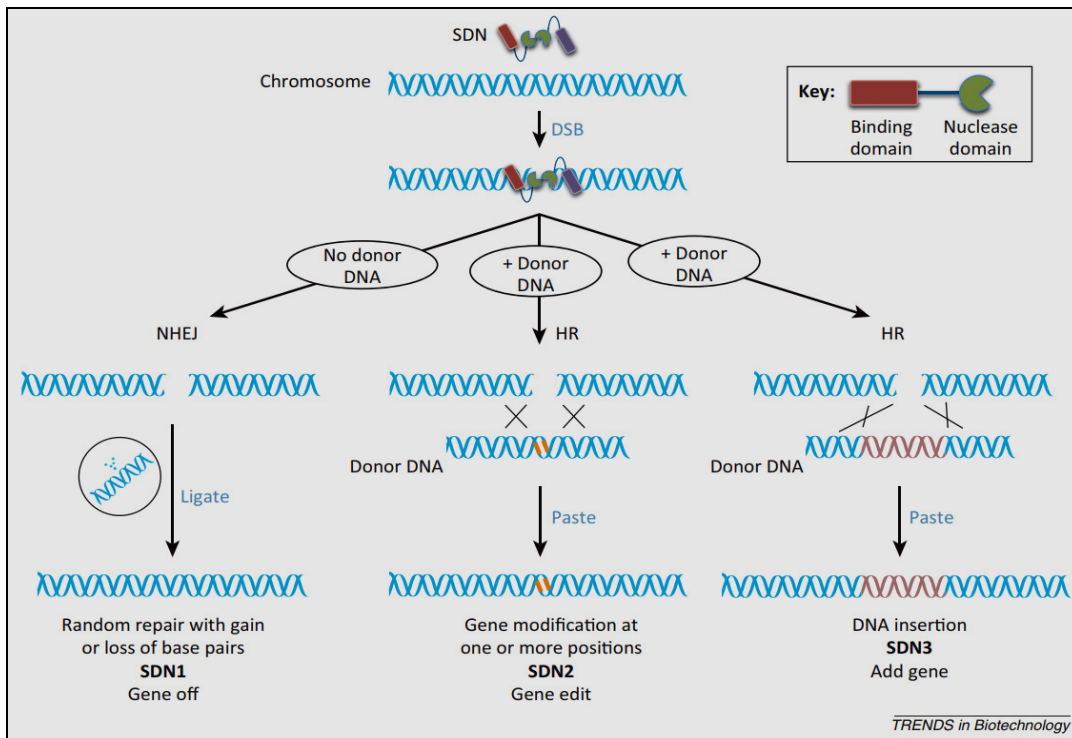
Pada mekanisme HR, sebuah cetakan DNA digunakan sebagai rujukan sekuen DNA yang harus disalin oleh sel saat memperbaiki dan memulihkan kromosom yang digunting. HR dapat digunakan untuk memperoleh modifikasi sekuen DNA terarah dengan mengintroduksi ke sel sebuah SDN untuk mengunting daerah target dan sebuah cetakan yang memiliki sekuen yang mirip dengan daerah yang digunting tersebut. Melalui HR, penambahan (*knock-in*) gen utuh secara terarah juga dapat dilakukan dengan menggunakan cetakan DNA berisikan satu atau lebih gen yang diapit oleh sekuen homolog daerah target (Puchta dan Fauser 2013).

Jalur reparasi DSB inilah yang digunakan para pembuat kebijakan untuk mengategorikan produk-produk *genome editing* menjadi tiga tipe, yaitu SDN-1, SDN-2, dan SDN-3 (Lusser et al. 2011) (Gambar 1). Pada SDN-1, DSB direparasi dengan mekanisme NHEJ yang sering menghasilkan kesalahan kecil yang bersifat acak karena tidak ada cetakan DNA yang diberikan pada sel tanaman. Mekanisme ini paling mirip dengan mutasi alami yang sering ditemukan

dalam pemuliaan berbasis mutasi. Pada SDN-2, mekanisme reparasi DSB yang digunakan ialah HR, cetakan DNA ditambahkan sebagai rujukan bagi sel sehingga perbaikan menghasilkan perubahan DNA berupa substitusi, penambahan, atau penghilangan sedikit basa DNA (Podevin et al. 2013). Mutasi semacam ini juga sulit dibedakan dengan mutasi alami, namun jelas bahwa dalam proses pembentukannya sangat diarahkan oleh manusia. Pada SDN-3, DSB direparasi dengan cara yang sama seperti SDN-2, tetapi cetakannya berisikan sekuen yang lebih panjang, bahkan dapat berupa gen atau promotor utuh. Jadi, hasil akhir SDN-3 serupa dengan transformasi genetik, tetapi lokasi penyisipannya sangat presisi karena ditargetkan pada daerah spesifik pada genom atau menggantikan sekuen yang ada pada daerah target, misalnya untuk keperluan pertukaran promotor (van de Wiel et al. 2017).

### PENELITIAN *GENOME EDITING* DI LUAR NEGERI DAN DI INDONESIA

Sistem CRISPR/Cas9 telah berhasil diaplikasikan untuk memperbaiki sifat-sifat penting pada berbagai tanaman (Tabel 1). Sifat-sifat penting tersebut antara lain ketahanan terhadap penyakit, perbaikan kualitas dan nutrisi tanaman sebagai sumber pangan, dan toleransi tanaman terhadap cekaman abiotik. Penerap-



**Gambar 1.** Tiga tipe *genome editing* yang dibedakan berdasarkan mekanisme reparasi DSB untuk tujuan perumusan regulasi, yaitu SDN-1, SDN-2, dan SDN-3 (Podevin et al. 2013).

an teknologi ini pada beberapa komoditas tanaman telah dilakukan menggunakan berbagai teknik transformasi (transfeksi protoplas, agroinfiltrasi, dan teknik lain untuk menghasilkan tanaman transgenik yang stabil), dengan target gen-gen asli tanaman tersebut ataupun transgen (Bortesi dan Fischer 2015).

Di dunia, terutama di Amerika Serikat, beberapa tanaman hasil *genome editing* telah dikomersialisasikan, antara lain jamur *non-browning* (Waltz 2016), kedelai dengan kandungan asam oleat tinggi (Cohen 2019), dan *waxy corn* (Scheben dan Edwards 2018; Waltz 2018). Penelitian terkait aplikasi *genome editing*, terutama yang menggunakan teknik CRISPR/Cas9, juga telah dimulai di Indonesia. Sebagai contoh, aplikasi teknologi CRISPR telah diuji untuk mengatasi cekaman biotik penyakit ganoderma pada sawit (Budiani et al. 2018) dan mempercepat pembungaan pada anggrek (Ika 2019). Beberapa lembaga penelitian yang telah melakukan rintisan penelitian menggunakan teknik *genome editing* antara lain Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian (BB Biogen) (Santoso et al. 2016), Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia (PPBBI) (Budiani et al. 2018), Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) (Satya Nugroho 2019, komunikasi pribadi) dan Universitas Gadjah Mada (UGM) (Ika 2019). Kegiatan penelitian *genome editing* dengan CRISPR/Cas9 yang sedang dilakukan di BB Biogen meliputi perbaikan tanaman padi untuk sifat *semidwarf*, tahan penyakit hawar daun bakteri, dan peningkatan jumlah bulir padi (Santoso et al. 2016). Di samping itu, BB Biogen juga melaksanakan *genome editing* pada tanaman jeruk, cabai, dan artemisia berturut-turut untuk ketahanan penyakit huang long bing (HLB), ketahanan virus gemini, dan kadar artemisin tinggi (BB Biogen 2018).

### ANALISIS RISIKO HASIL PEMULIAAN TANAMAN DENGAN TEKNIK KONVENSIONAL DAN *GENOME EDITING*

Saat ini, terdapat perdebatan apakah produk *genome editing* perlu diregulasi secara khusus atau diperlakukan sama seperti produk pemuliaan konvensional yang selama ini dianggap aman dan tidak diregulasi khusus, seperti persilangan, mutagenesis, dan fusi protoplas. Regulasi khusus perlu diterapkan bila suatu metode menghasilkan produk yang memiliki potensi bahaya yang berbeda dengan produk hasil metode konvensional. Sebagai titik awal untuk mengkaji keamanan produk-produk *genome editing*, potensi bahaya dapat diprediksi dengan membandingkan komposisi DNA genom tanaman produk *genome editing* dan produk pemuliaan konvensional seperti hasil persilangan dan mutasi.

Perakitan varietas baru menggunakan teknik persilangan sesungguhnya merupakan proses penggabungan DNA dari dua atau lebih tetua. Komposisi DNA keturunannya berbeda-beda bergantung pada desain persilangan dan teknik seleksi yang digunakan (Allard 1999). Sebagai contoh, padi toleran kahat P yang merupakan hasil persilangan balik antara varietas IR64 dan galur NIL14-4 mengandung 7–11% DNA NIL14-4 yang digunakan sebagai tetua donor, meskipun DNA yang diinginkan sebenarnya hanya sebesar 0,07% atau 278.000 basa dalam QTL *Pup1* dari padi Kasalath (Chin et al. 2011). Dalam kasus semacam ini, aman atau tidaknya komposisi DNA baru pada keturunan yang diperoleh tentunya bergantung pada keamanan kedua tetua yang digunakan. Kedua tetua padi tersebut di atas tidak menyintesis zat beracun dalam bulirnya sehingga hasil persilangannya juga aman untuk dikonsumsi. Namun, jika tetuanya beracun, misalnya beberapa jenis ubi kayu yang diketahui mengandung sianida yang cukup tinggi (Nassar dan Ortiz 2007), tentu ada potensi untuk

**Tabel 1.** Gen yang telah diedit dengan menggunakan sistem *genome editing* pada berbagai spesies tanaman.

| Spesies tanaman | Gen target                        | Sistem <i>genome editing</i> | Fungsi                                       | Referensi                  |
|-----------------|-----------------------------------|------------------------------|--|----------------------------|
| Padi            | <i>OsERF922</i>                   | CRISPR/Cas9                  | Peningkatan ketahanan terhadap penyakit blas | Wang et al. 2016           |
| Padi            | <i>SBE11b</i> dan <i>SBE1</i>     | CRISPR/Cas9                  | Kandungan amilosa tinggi                     | Sun et al. 2017            |
| Padi            | <i>OsMATL</i>                     | CRISPR/Cas9                  | Induksi haploid                              | Yao et al. 2018            |
| Gandum          | <i>TaEDR1</i>                     | CRISPR/Cas9                  | Ketahanan terhadap <i>downy mildew</i>       | Zhang et al. 2017          |
| Jagung          | <i>ARGO58</i>                     | CRISPR/Cas9                  | Toleran kekeringan                           | Shi et al. 2017            |
| Jagung          | <i>Wx1</i>                        | CRISPR/Cas9                  | Jagung dengan pati amilopektin tinggi        | Pioneer 2016               |
| Jagung          | <i>Zm DMP</i>                     | CRISPR/Cas9                  | Induksi haploid                              | Zhong et al. 2019          |
| Kedelai         | <i>FAD2-1A</i> dan <i>FAD2-1B</i> | TALENs                       | Peningkatan kandungan minyak pada biji       | Haun et al. 2014           |
| Tomat           | <i>SIWUS</i>                      | CRISPR/Cas9                  | Peningkatan ukuran buah                      | Rodríguez-Leal et al. 2017 |
| Tomat           | <i>SJJAZ2</i>                     | CRISPR/Cas9                  | Resistensi bakteri                           | Ortigosa et al. 2019       |
| Jeruk           | <i>CsLOB1</i>                     | CRISPR/Cas9                  | Ketahanan terhadap kanker jeruk              | Jia et al. 2017            |
| Jamur           | <i>PPO</i>                        | CRISPR/Cas9                  | <i>Anti-browning</i>                         | Waltz 2016                 |

mewariskan DNA pembawa sifat racun itu ke keturunan hasil persilangannya. Dengan demikian, produk hasil persilangan konvensional belum tentu aman karena keamanannya bergantung pada sifat tetua yang digunakan. Metode persilangan selama ini tidak dianggap berbahaya dan analisis risikonya lebih dititikberatkan pada sifat-sifat yang dimiliki kedua tetuanya secara khusus dan sifat spesies yang dimuliakan secara umum.

Metode perakitan varietas lain yang selama ini juga tidak diregulasi secara khusus ialah teknik mutasi DNA. Teknik ini memunculkan sifat-sifat baru dengan cara merusak sekuen DNA yang ada dengan bantuan zat kimia seperti EMS atau radiasi. Perubahan atau mutasi DNA yang dihasilkan meliputi perubahan basa DNA (substitusi, insersi, atau deleksi) ataupun di level kromosom (terbelah, hilang, tergandakan, atau berpindah lokasi) dan terjadi secara acak di berbagai titik secara tidak terkontrol pada tiap sel tanaman yang dimutasi (van de Wiel et al. 2010). Dari berbagai studi, diperkirakan bahwa penggunaan EMS sebagai mutagen mengubah 14 basa dari setiap 1.500 basa DNA pada tanaman Arabidopsis, 1 basa dari 25.000 basa DNA pada gandum, 1 basa dari 60.000 basa DNA pada sawi bunga (*Brassica rapa*), dan 1 basa untuk setiap 500.000 basa pada jagung dan jelai (*barley*) (Pathirana 2011). Jika angka tersebut dikalikan dengan ukuran genom haploid tiap tanaman, maka secara total akan ditemukan 1.260.000 mutasi pada Arabidopsis, 580.000 mutasi pada gandum, 8.083 mutasi pada sawi bunga, 4.600 mutasi pada jagung, dan 10.600 mutasi pada jelai. Jumlah mutasi yang besar dan acak ini berpotensi memunculkan sifat-sifat baru, namun juga sangat berpeluang mengganggu fungsi gen-gen yang ada dan memunculkan sifat yang tidak diinginkan. Meskipun demikian, tanaman yang dikembangkan dari individu dengan kerusakan DNA yang masif seperti di atas dianggap aman dan tidak harus melalui uji keamanan yang rumit seperti tanaman transgenik (Kok et al. 2019).

Dibandingkan dengan teknik persilangan dan mutasi, teknik *genome editing* sejak awal didesain untuk mengubah sekuen DNA tertentu saja secara spesifik (Hsu et al. 2014), meskipun pada kasus tertentu terjadi pula perubahan sekuen DNA di luar target. Fu et al. (2013) melaporkan bahwa akurasi CRISPR/Cas nuklease belum mencapai 100% karena gen-gen nontarget dengan perbedaan sekuen hingga 5 basa juga turut diedit. Untuk genom berukuran besar seperti genom manusia, jumlah sekuen nontarget dengan karakteristik semacam itu dapat mencapai 64 lokasi (Fu et al. 2013) sehingga *genome editing* berbasis CRISPR/Cas agak berisiko jika digunakan

secara medis untuk mengedit genom manusia. Untuk meningkatkan akurasi, Cho et al. (2014) menyarankan penggunaan sekuen target unik dan optimasi RNA penuntun untuk menghilangkan pengeditan di luar target. Di samping itu, cara lain untuk menurunkan atau menghindari risiko yang ditimbulkan oleh Cas9 ialah dengan memodifikasi molekul Cas9 itu sendiri seperti yang ditempuh oleh Kleinstiver et al. (2016) agar molekul Cas9 memiliki akurasi yang lebih tinggi dan tidak mengubah DNA lain di luar target yang telah ditetapkan. Dengan penyempurnaan-penyempurnaan ini, *genome editing* berbasis Cas9 menjadi semakin spesifik dan aman digunakan untuk *genome editing* tanaman, bahkan manusia, dimana pengeditan yang tidak spesifik dan di luar target tidak dapat ditoleransi sama sekali.

Perlu dicatat pula bahwa pengeditan di luar target dalam *genome editing* berbasis CRISPR/Cas9 tidak bersifat acak dan hanya terjadi di sekuen DNA yang mirip dengan gen target (Cho et al. 2014) sehingga relatif mudah untuk dilacak dan ditindaklanjuti bila dianggap berbahaya. Secara teoritis, risiko yang dihadapi justru lebih besar dalam pemuliaan berbasis mutasi DNA karena sifatnya yang acak (Purnhagen et al. 2018) sehingga keseluruhan DNA dalam genom harus disekuensing bila semua perubahan yang tidak spesifik perlu dicek keberadaannya dan dihilangkan. Namun, peraturan produk hasil mutasi tidak mensyaratkan demikian, dan penghilangan sifat-sifat yang tidak diinginkan hanya dilakukan dengan pengamatan sifat secara fisik tanpa ada analisis DNA yang mendalam. Walaupun demikian, dengan pengamatan fisik inipun ternyata *track record* keamanan hayati produk hasil mutasi DNA konvensional sangat baik (Urnov et al. 2018) dan tidak ada insiden yang mengemuka dalam beberapa dekade terakhir sejak produk hasil mutasi DNA pertama dilepas ke masyarakat.

Tanaman hasil *genome editing* yang gen-gen molekuler pengedit genomnya telah dibuang justru mengalami perubahan komposisi DNA yang paling kecil dan mudah dilacak dibanding dengan metode lain yang selama ini dianggap aman seperti persilangan dan mutasi DNA konvensional. Selain itu, tidak ada materi DNA asing yang masuk ke dalam genom tanaman hasil *genome editing* kategori SDN-1, juga SDN-2 dan SDN-3 yang didesain untuk menyerupai mutasi dan gen alami. Oleh karenanya, regulasi yang selama ini mengatur pemuliaan berbasis persilangan dan mutasi konvensional semestinya juga sudah cukup untuk memastikan keamanan produk *genome editing* (Duensing et al. 2018; Urnov et al. 2018). Pengkhususan regulasi untuk produk *genome editing*

mengisyaratkan bahwa ada risiko unik yang hanya mungkin ditimbulkan oleh metode ini. Semestinya, pengambilan kebijakan seperti ini perlu didefinisikan secara jelas dan risiko yang ingin dihindari harus dapat diuji secara ilmiah sebelum dijadikan aturan baku. Rumusan yang jelas dan dapat diuji tentang bahaya unik metode *genome editing* akan memudahkan pengguna metode ini untuk mengambil langkah-langkah pencegahan agar bahaya yang mungkin muncul dapat dihindari. Rumusan yang spesifik tentang bahaya yang hanya ada dalam metode *genome editing* juga akan mencegah penggunaan aturan khusus ini untuk melarang atau mendelegitimasi metode lain yang selama ini dinyatakan aman, seperti pemuliaan berbasis mutasi, mengingat metode mutasi memiliki efek perubahan DNA yang lebih luas dan banyak daripada produk hasil teknik pemuliaan lain (Gambar 2).

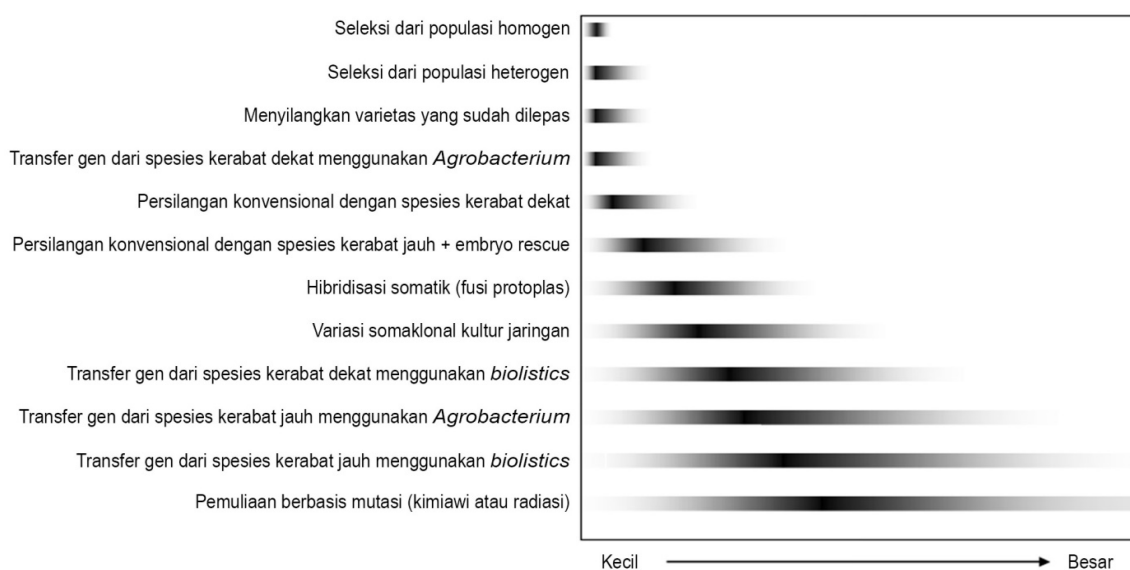
#### PERBANDINGAN REGULASI PRODUK *GENOME EDITING* DI INDONESIA DAN NEGARA-NEGARA LAIN

Dalam proses penyusunan regulasi untuk *genome editing*, regulasi PRG sangat relevan untuk dipertimbangkan mengingat sebagian metode *genome editing* juga menggunakan teknik rekayasa genetik dalam proses perakitannya. Secara umum, negara-negara di dunia mengatur PRG berdasarkan sifat produk atau proses perakitan produk tersebut (Sprink et al. 2016). Regulasi berbasis proses seperti Protokol Cartagena mengatur secara khusus produk

yang dirakit melalui proses tertentu, sedangkan regulasi berdasarkan produk tidak akan melihat metode perakitan, tetapi lebih fokus pada sifat produk yang dihasilkan. Aturan khusus yang diterapkan berupa kajian keamanan hayati, baik dalam aspek kesehatan manusia maupun lingkungan.

Pedoman pengkajian keamanan hayati yang digunakan semua negara telah baku, yaitu *Codex Alimentarius* tahun 2003 (Haslberger 2003). Negara-negara di dunia disarankan untuk mengkaji PRG sesuai dengan pedoman tersebut, walaupun setiap negara mempunyai kerangka kejadian mekanisme yang berbeda-beda. *Codex Alimentarius* menyarankan pengkajian atas tiga kriteria, yaitu informasi genetik (donor dan penerima), kesetaraan substansial, dan toksisitas terhadap kesehatan, ditambah dengan dampak terhadap spesies non-target dan peluang *geneflow* serta *horizontal transfer* untuk benih (keamanan lingkungan).

Indonesia sebagai salah satu negara yang meratifikasi Protokol Cartagena pada tahun 2004 berdasarkan regulasi PRG pada proses atau metode perakitan yang digunakan. Hal ini jelas tertera dalam PP No. 21 Tahun 2005 tentang Pedoman Pengkajian Keamanan Hayati PRG. Indonesia telah menerbitkan beberapa regulasi terkait pemanfaatan PRG ini, antara lain UU No. 16 Tahun 1996 tentang Pangan yang kemudian direvisi dengan UU No. 18 Tahun 2012 yang menyatakan bahwa sebelum diedarkan semua PRG harus terlebih dahulu lolos uji keamanan hayati.



**Gambar 2.** Peluang relatif metode-metode pemuliaan untuk menghasilkan perubahan genetik yang tidak diinginkan ke dalam genom tanaman. Daerah berwarna abu-abu menggambarkan derajat relatif potensi perubahan yang tidak diinginkan, sedangkan daerah berwarna hitam menggambarkan derajat relatif disrupsi genetik yang dapat diakibatkan metode pemuliaan masing-masing menurut Komite Dewan Riset Nasional Amerika Serikat (National Research Council 2004).

Amerika Serikat merupakan salah satu negara yang tidak meratifikasi Protokol Cartagena, namun regulasi PRG-nya sebenarnya juga dipengaruhi oleh proses apa yang digunakan untuk menghasilkan produk tersebut (Kuzma dan Kokotovich 2011). Secara umum, *Code of Federal Regulations Title 7 part 340* mengatur bahwa regulasi dan pengujian ekstra hanya diperlukan apabila pengembangan suatu tanaman melibatkan organisme donor, penerima, vektor ataupun agen vektor yang berasal dari organisme yang dikategorikan sebagai hama atau penyakit tanaman, atau yang tidak diketahui klasifikasinya (Camacho et al. 2014). Dengan demikian, baik tanaman transgenik maupun produk *genome editing* tidak diregulasi khusus selama memenuhi kriteria di atas, meskipun kenyataannya mayoritas tanaman transgenik terkena regulasi karena menggunakan transformasi dengan *Agrobacterium* (bakteri patogen tanaman) dan promotor 35S dari virus patogen tanaman (Marchant dan Stevens 2015).

Camacho et al. (2014) mengompilasi jenis-jenis tanaman yang selama ini tidak diregulasi di AS dan merumuskan garis besar sifat tanaman-tanaman tersebut. Tanaman transgenik hasil metode biolistik yang tidak membawa DNA hama/penyakit tanaman tidak diregulasi. Demikian pula, produk cisgenesis dan intragenesis, yang murni menggunakan DNA tanaman itu sendiri atau kerabat yang dapat disilang, juga lolos dari regulasi selama tidak ditransformasi melalui perantaraan *Agrobacterium*. Keturunan hasil persilangan dengan tanaman transgenik yang tidak mewarisi DNA rekombinan dari tetua transgeniknya juga dianggap tidak perlu diregulasi. Sementara untuk produk *genome editing*, selama *editing* yang dilakukan hanya bersifat delesi, produk akhirnya tidak diregulasi karena tidak ada materi genetik baru yang masuk ke tanaman tersebut. Namun, produk *genome editing* baik yang sifatnya substitusi maupun insersi basa secara kasus per kasus ada kemungkinan harus diregulasi.

**Tabel 2.** Perbandingan perumusan regulasi *genome editing* di berbagai negara di dunia (Eckerstorfer et al. 2019).

| Negara          | Pendekatan penyusunan regulasi saat ini  | Perkembangan penyusunan regulasi <i>genome editing</i>  | Status perizinan produk <i>genome editing</i>   |
|-----------------|--|---|---|
| Afrika Selatan  | Regulasi PRG berlaku juga untuk produk <i>genome editing</i>   | Diskusi untuk mengamandemen aturan tengah berjalan  | Belum ada pengajuan izin pelepasan, ada produk <i>genome editing</i> di Fasilitas Uji Terbatas  |
| Amerika Serikat | Menentukan apakah produk tertentu harus diregulasi khusus  | Konsultasi tentang kebijakan untuk menghilangkan regulasi produk hasil teknik tertentu (contohnya, cisgenesis)  | Telah terbit izin beberapa produk <i>genome editing</i> untuk dilepas tanpa melalui regulasi PRG, beberapa pengajuan izin tengah dievaluasi   |
| Argentina       | Menentukan apakah produk <i>genome editing</i> diregulasi seperti PRG  | Penerbitan resolusi tambahan tahun 2015 ( <i>Resolution No. 173/2015</i> ) yang menentukan kriteria kasus per kasus tentang status regulasi produk <i>genome editing</i>  | Hingga Juni 2018 telah dievaluasi 12 pengajuan izin, 10 izin di antaranya produk <i>genome editing</i> (kebanyakan tanaman), dan kebanyakan diputuskan untuk tidak diregulasi seperti PRG |
| Australia       | Menentukan apakah proses <i>genome editing</i> diregulasi seperti PRG  | <i>Office of the Gene Technology Regulator</i> mengusulkan amandemen teknis aturan yang ada, sedang dalam proses konsultasi   | Belum ada pengajuan izin pelepasan tak terbatas ( <i>unconfined release</i> ), namun ada uji lapang produk <i>genome editing</i>  |
| Brasil          | Menentukan apakah produk <i>genome editing</i> diregulasi seperti PRG  | Penerbitan resolusi tambahan pada Januari 2018 ( <i>Normative Resolution No. 16</i> ) yang mirip dengan resolusi tambahan Argentina tahun 2015                            | Ada produk <i>genome editing</i> di Fasilitas Uji Terbatas, dua rasi produk <i>genome editing</i> dievaluasi dengan aturan baru dan diputuskan untuk tidak diregulasi                     |
| Kanada          | Menentukan apakah produk <i>genome editing</i> memiliki sifat baru   | Pengkajian kembali hal-hal yang diperlukan untuk analisis risiko tengah dilakukan   | Beberapa izin pelepasan telah diberikan (seperti kentang cisgenik, <i>rapeseed</i> hasil <i>genome editing</i> )  |
| Norwegia        | Menentukan apakah teknik pemuliaan baru tertentu perlu diregulasi seperti PRG  | Diskusi teknis untuk menentukan langkah yang perlu diambil (berpedoman pada Uni Eropa)  | Belum ada pengajuan izin pelepasan, ada produk <i>genome editing</i> di Fasilitas Uji Terbatas  |
| Selandia Baru   | Seluruh produk <i>genome editing</i> diregulasi seperti PRG, perkecualian hanya diberikan pada mutasi kimiawi atau radiasi | Pemerintah menganut kebijakan bahwa keputusan teknis ada di <i>New Zealand Environmental Protection Agency</i> , dan tidak ada rencana perubahan aturan dalam waktu dekat | Pemanfaatan <i>genome editing</i> sebatas di level penelitian, beberapa produk telah diputuskan untuk diregulasi seperti PRG  |
| Swiss           | Menentukan apakah jenis <i>genome editing</i> tertentu perlu diregulasi seperti PRG  | Diskusi dengan <i>stakeholder</i> untuk menggali informasi dalam menyusun regulasi masa depan   | Belum ada pengajuan izin, ada uji lapangan beberapa produk <i>genome editing</i>  |
| Uni Eropa       | Menentukan apakah jenis <i>genome editing</i> tertentu perlu diregulasi seperti PRG  | Tidak ada perubahan aturan ( <i>Directive 2001/18/EC</i> ), namun Mahkamah Uni Eropa memutuskan bahwa <i>genome editing</i> diregulasi seperti PRG                        | Tidak ada pengajuan izin pelepasan atau penjualan di level Eropa, tapi ada beberapa uji lapang produk hasil <i>genome editing</i>   |



Pendekatan regulasi yang berbeda dilakukan oleh Kanada, yang meskipun tercatat sebagai negara yang menandatangani pengajuan Protokol Cartagena, namun akhirnya tidak meratifikasi protokol tersebut (Convention on Biological Diversity 2018). Sistem regulasi di Kanada berbasis produk dan bukan proses perakitan tanamannya (Eckerstorfer et al. 2019). Izin pelepasan varietas baru harus melewati regulasi khusus ketika varietas yang akan dilepas memiliki sifat baru (*novel trait*) yang belum ada sebelumnya, tanpa memandang metode yang digunakan untuk merakitnya (Tabel 2). Sebagai contoh, sifat ketahanan terhadap herbisida biasanya selalu dianggap sebagai sifat baru dan diregulasi khusus, meskipun tanaman tersebut dihasilkan dari metode persilangan tradisional. Hal ini dikarenakan evaluasi keamanan lingkungan di sana dirancang untuk mencegah dampak negatif seperti tanaman menjadi gulma atau invasif, sifat baru ditransfer ke kerabat liar, tanaman menjadi pengganggu tanaman lain, tanaman atau produk gennya membahayakan spesies non-target, atau tanaman mengancam keanekaragaman hayati (Smyth dan McHughen 2008). Dengan demikian, pemulia tanaman yang menggunakan teknik *genome editing* di Kanada hanya perlu mempertimbangkan sifat yang ingin ditambahkan pada tanamannya karena regulasi yang ada lebih ditekankan pada sifat tersebut dan bukan pada metode penyisipannya. Apabila sifat yang ditambahkan sebelumnya sudah ada di alam pada spesies yang sama, produknya tidak diatur secara khusus.

Di negara-negara peratifikasi Protokol Cartagena, tanpa adanya peraturan khusus tentang produk *genome editing* maka tanaman hasil teknologi ini dapat ditafsirkan mengikuti regulasi PRG (Whelan dan Lema 2015). Hal ini disebabkan karena proses *genome editing* melibatkan teknik rekombinan DNA secara *in vitro* yang dalam Protokol Cartagena merupakan proses yang harus diregulasi khusus pelepasannya. Brasil merupakan salah satu negara peratifikasi Protokol Cartagena yang menerbitkan regulasi khusus untuk produk *genome editing* yang dituangkan dalam *National Biosafety Technical Commission Normative Resolution* No. 16 Tanggal 15 Januari 2018 (National Biosafety Technical Commission 2018). Resolusi normatif ini mengatur bahwa CTNBio, komisi teknis keamanan hayati Brasil, dapat secara kasus per kasus memutuskan beberapa tanaman produk inovasi pemuliaan tanaman seperti *genome editing* untuk tidak diregulasi seperti PRG. Produk inovasi pemuliaan yang dapat diajukan harus memiliki minimal salah satu karakteristik berikut:

1. Tidak mengandung DNA/RNA rekombinan jika merupakan keturunan tanaman PRG.
2. Produk diperoleh melalui teknik DNA/RNA yang tidak bermultiplikasi dalam sel hidup.
3. Produk hasil teknik penghasil mutasi spesifik pada sekuen tertentu yang menyebabkan bertambahnya atau hilangnya fungsi gen, namun terbukti tidak mengandung DNA/RNA rekombinan.
4. Produk hasil teknik yang mengakibatkan ekspresi DNA/RNA rekombinan untuk sementara maupun permanen, namun tidak ada introgresi DNA/RNA tersebut pada produk akhir.
5. Produk hasil teknik yang menggunakan DNA/RNA yang tidak memodifikasi genom inang secara permanen, atau terserap secara sistemik maupun non-sistemik.

Resolusi tersebut juga mengatur bahwa ada beberapa dokumen yang harus diserahkan untuk dapat mengajukan pengecualian ini pada CTNBio. Beberapa informasi berikut ini tentang tetua produk harus disampaikan:

1. Identitas teknologi genetik, tujuan, dan target penggunaan tanaman dan produk turunannya.
2. Klasifikasi taksonomis mendetail tanaman yang diajukan.
3. Klasifikasi risiko PRG sesuai Resolusi Normatif No. 2 Tanggal 27 November 2006.
4. Gen-gen atau elemen genetik yang dimanipulasi, asal organismenya, dan fungsinya.
5. Strategi genetik yang digunakan untuk menghasilkan modifikasi serta peta genetik mendetail konstruk yang digunakan.
6. Karakterisasi molekuler hasil manipulasi genetik (tetua ataupun produk akhir), dan jika memungkinkan ditambah informasi tentang jumlah sekuen/alel yang dimanipulasi, lokasi sekuen/alel tersebut dalam genom (jika tersedia), dan identifikasi modifikasi *off-target* jika ada.
7. Detail produk ekspresi segmen genom yang dimanipulasi.

Turunan tetua di atas ataupun produk akhir harus dilengkapi beberapa keterangan sebagai berikut:

1. Bukti tidak adanya DNA/RNA rekombinan berdasarkan analisis molekuler.
2. Kemungkinan DNA/RNA yang digunakan, baik secara topikal maupun sistemik, untuk terekombinasi dan terinsersi ke spesies target ataupun non-target.

3. Apakah produk yang diajukan telah dilepas secara komersial di negara lain.
4. Jika produk menggunakan prinsip *gene drive* untuk menyebarkan sifat ke populasi organisme tersebut, perlu dijelaskan cara untuk memonitornya menggunakan minimal dua pendekatan.
5. Bagaimana kemungkinan adanya efek samping teknologi yang mungkin muncul dalam produk yang dikaji.

Dari persyaratan-persyaratan di atas, jelas bahwa masih ada prosedur yang cukup kompleks untuk mendapatkan pengecualian dalam menjalani regulasi produk PRG di Brasil, meskipun persyaratan tersebut masih lebih ringan daripada regulasi PRG secara keseluruhan. Langkah Brasil ini juga menunjukkan bahwa negara peratifikasi Protokol Cartagena seperti Indonesia juga dapat menerbitkan aturan pengecualian untuk produk-produk tertentu agar tidak harus menjalani regulasi seperti PRG. Sampai saat ini, banyak negara di dunia yang sedang merevisi dan menyusun regulasi untuk PRG dan produk hasil *genome editing* dengan memerhatikan regulasi yang berlaku di negara lain, terutama Amerika Serikat, Kanada, Australia, Uni Eropa, Argentina, dan Brasil. Namun demikian, hanya negara-negara Uni Eropa yang mengategorikan seluruh produk *genome editing* sebagai PRG (Purnhagen et al. 2018).

### KESIMPULAN

*Genome editing* merupakan teknologi terbaru untuk merakit tanaman unggul, yang meskipun dalam prosesnya menggunakan teknologi rekombinan DNA, produk akhirnya dapat didesain untuk tidak mengandung DNA asing. Beberapa produknya tidak dapat dibedakan, baik secara fisik maupun genetik, dengan tanaman hasil mutasi konvensional sehingga di beberapa negara produk-produk tersebut dianggap aman dan tidak diatur sebagai tanaman PRG. Aturan yang telah dirumuskan di negara-negara lain untuk tanaman hasil *genome editing* dapat dipertimbangkan untuk diadopsi di Indonesia, terutama aturan yang diterapkan di negara sesama peratifikasi Protokol Cartagena dan pemilik mega biodiversitas seperti Brasil. Jika seluruh produk *genome editing* diperlakukan seperti PRG, nasib teknologi ini akan mengikuti teknologi rekayasa genetic yang penerapannya hingga kini terhambat, baik di dunia maupun di Indonesia. Padahal *genome editing* berpotensi untuk mempercepat proses pemuliaan komoditas-komoditas pertanian guna menjamin keberlangsungan ketahanan pangan, di era di mana perubahan iklim ber-

langsung begitu cepat dan memengaruhi laju peningkatan produksi pertanian di Indonesia dan dunia.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ide dan sebagian isi tinjauan ini berdasarkan informasi yang didapatkan penulis saat menghadiri “APEC High Level Policy Dialogue on Agricultural Biotechnology (HLPDAB) Two-Part Workshop on Regulatory Cooperation and Genome Editing” pada 1–3 Agustus 2018 di Brisbane, Australia. Penulis mengucapkan terima kasih kepada proyek “US-APEC Technical Assistance to Advance Regional Integration” (US-ATAARI) atas *sponsorship* yang diberikan kepada penulis untuk menghadiri *workshop* tersebut.

### KONTRIBUTOR PENULISAN

Ketiga penulis memberikan kontribusi yang setara sebagai kontributor utama naskah ini. BW: kontributor utama, konsep naskah, abstrak, pendahuluan, kesimpulan, dan koherensi isi naskah secara keseluruhan. DS: kontributor utama, analisis risiko dan perbandingan regulasi. TJS: kontributor utama, teknik *genome editing* dan penelitiannya di dunia dan Indonesia.

### DAFTAR PUSTAKA

- Abdallah, N.A., Prakash, C.S. & McHughen, A.G. (2015) Genome editing for crop improvement: Challenges and opportunities. *GM Crops & Food*. [Online] 6 (4), 183–205. Available from: doi:10.1080/21645698.2015.1129937 [Accessed 30 August 2019].
- Allard, R.W. (1999) *Principles of plant breeding*. [e-book] New York, John Wiley & Sons. Available from: [https://books.google.co.id/books?hl=en&lr=&id=74hdQoEc8XsC&oi=fnd&pg=PA1&dq=%22plant+breeding%22+genetic+segregation&ots=CkluE4S7Tu&sig=DAE-tvo8ar1jq5bz3-UOIKMs5Ag&redir\\_esc=y#v=onepage&q=%22plant+breeding%22+genetic+segregation&f=false](https://books.google.co.id/books?hl=en&lr=&id=74hdQoEc8XsC&oi=fnd&pg=PA1&dq=%22plant+breeding%22+genetic+segregation&ots=CkluE4S7Tu&sig=DAE-tvo8ar1jq5bz3-UOIKMs5Ag&redir_esc=y#v=onepage&q=%22plant+breeding%22+genetic+segregation&f=false) [Accessed 28 August 2019].
- Amirhusin, B. (2004) Perakitan tanaman transgenik tahan hama. *Jurnal Litbang Pertanian*, 23 (1), 1–7.
- BB Biogen (2018) *Laporan kinerja Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian 2017*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian. Bogor, BB Biogen.
- Beetham, P.R., Kipp, P.B., Sawycky, X.L., Arntzen, C.J. & May, G.D. (1999) A tool for functional plant genomics: Chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause *in vivo* gene-specific mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

- [Online] 96 (15), 8774–8778. Available from: doi:10.1073/pnas.96.15.8774 [Accessed 13 May 2019].
- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S. & Nekrasov, V. (2013) Plant genome editing made easy: Targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods*. [Online] 9 (1), 39. Available from: doi:10.1186/1746-4811-9-39 [Accessed 27 May 2019].
- Bogdanove, A.J., Donovan, D.M., Elorriaga, E., Kuzma, J., Pauwels, K., Strauus, S.H. & Voytas, D.F. (2018) Genome editing in agriculture: Methods, applications and governance. *CAST Issue Paper*, 60.
- Bortesi, L. & Fischer, R. (2015) The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*. [Online] 33 (1), 41–52. Available from: doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2014.12.006 [Accessed 13 May 2019].
- Budiani, A., Putranto, R.A., Riyadi, I., Sumaryono, Minarsih, H. & Faizah, R. (2018) Transformation of oil palm calli using CRISPR/Cas9 system: Toward genome editing of oil palm. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. [Online] 183 (1). Available from: doi:10.1088/1755-1315/183/1/012003 [Accessed 13 May 2019].
- Camacho, A., Van Deynze, A., Chi-Ham, C. & Bennett, A.B. (2014) Genetically engineered crops that fly under the US regulatory radar. *Nature Biotechnology*. [Online] 32 (11), 1087–1091. Available from: doi:10.1038/nbt.3057 [Accessed 4 April 2019].
- Chin, J.H., Gamuyao, R., Dalid, C., Bustamam, M., Prasetyono, J., Moeljopawiro, S., Wissuwa, M. & Heuer, S. (2011) Developing rice with high yield under phosphorus deficiency: *Pup1* sequence to application. *Plant Physiology*. [Online] 156 (3), 1202–1216. Available from: doi:10.1104/pp.111.175471 [Accessed 28 March 2019].
- Cho, S.W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H.S., Bae, S. & Kim, J.S. (2014) Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome research*. [Online] 24 (1), 132–141. Available from: doi:10.1101/gr.162339.113 [Accessed 29 March 2019].
- Cohen, J. (2019) Fields of dreams. *Science*. [Online] 365 (6452), 422–425. Available from: doi:10.1126/science.365.6452.422 [Accessed 4 September 2019].
- Convention on Biological Diversity (2018) *Parties to the Cartagena protocol and its supplementary protocol on liability and redress*. [Online] Available from: <https://bch.cbd.int/protocol/parties/> [Accessed 4 April 2019].
- Cressey, D. (2013) Transgenics: A new breed. *Nature*. [Online] 497 (7447), 27–29. Available from: doi:10.1038/497027a [Accessed 4 April 2019].
- Curtin, S.J., Anderson, J.E., Starker, C.G., Baltes, N.J., Mani, D., Voytas, D.F. & Stupar, R.M. (2013) Targeted mutagenesis for functional analysis of gene duplication in legumes. In: Rose, R. (ed.) *Legume genomics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol. 1069. [e-book] Totowa, N.J., Humana Press, pp. 25–42. Available from: doi:10.1007/978-1-62703-613-9\_3 [Accessed 13 May 2019].
- Duensing, N., Sprink, T., Parrott, W.A., Fedorova, M., Lema, M.A., Wolt, J.D. & Bartsch, D. (2018) Novel features and considerations for ERA and regulation of crops produced by genome editing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. [Online] 6, 79. Available from: doi:10.3389/fbioe.2018.00079 [Accessed 13 May 2019].
- Eckerstorfer, M.F., Engelhard, M., Heissenberger, A., Simon, S. & Teichmann, H. (2019) Plants developed by new genetic modification techniques—Comparison of existing regulatory frameworks in the EU and non-EU countries. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. [Online] 7, 26. Available from: doi:10.3389/fbioe.2019.00026 [Accessed 13 May 2019].
- Fu, Y., Foden, J.A., Khayter, C., Maeder, M.L., Reyon, D., Joung, J.K. & Sander, J.D. (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*. [Online] 31 (9), 822–826. Available from: doi:10.1038/nbt.2623 [Accessed 29 March 2019].
- Hartung, F. & Schiemann, J. (2014) Precise plant breeding using new genome editing techniques: Opportunities, safety and regulation in the EU. *The Plant Journal*. [Online] 78 (5), 742–752. Available from: doi:10.1111/tbj.12413 [Accessed 28 March 2019].
- Haslberger, A.G. (2003) Codex guidelines for GM foods include the analysis of unintended effects. *Nature Biotechnology*. [Online] 21 (7), 739–741. Available from: doi:10.1038/nbt0703-739 [Accessed 29 August 2019].
- Haun, W., Coffman, A., Clasen, B.M., Demorest, Z.L., Lowy, A., Ray, E., Retterath, A., Stoddard, T., Juillerat, A., Cedrone, F., Mathis, L., Voytas, D.F. & Zhang, F. (2014) Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnology Journal*. [Online] 12 (7), 934–940. Available from: doi:10.1111/pbi.12201 [Accessed 24 May 2019].
- Hope, C. (2013) Major GM food company Monsanto 'pulls out of Europe'. *The Telegraph*. [Online] Available from: <https://www.telegraph.co.uk/news/earth/environment/10186932/Major-GM-food-company-Monsanto-pulls-out-of-Europe.html> [Accessed 9 April 2019].
- Hsu, P.D., Lander, E.S. & Zhang, F. (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. [Online] 157 (6), 1262–1278. Available from: doi:10.1016/J.CELL.2014.05.010 [Accessed 28 August 2019].
- Ika (2019) *Mengenal CRISPR/Cas9, teknik baru pemuliaan tanaman*. [Online] Tersedia pada: <https://ugm.ac.id/id/newsPdf/18552-mengenal-crispr-cas9-teknik-baru-pemuliaan-tanaman> [Diakses 1 Desember 2019].
- James, C. (2017) *Global status of commercialized biotech/GM crops in 2017: Biotech crop adoption surges as*

- economic benefits accumulate in 22 years. ISAAA Brief 53.* Ithaca, N.Y., ISAAA.
- Jia, H., Zhang, Y., Orbović, V., Xu, J., White, F.F., Jones, J.B. & Wang, N. (2017) Genome editing of the disease susceptibility gene *CsLOB1* in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnology Journal*. [Online] 15 (7), 817–823. Available from: doi:10.1111/pbi.12677 [Accessed 24 May 2019].
- Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B. & Weeks, D.P. (2013) Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Research*. [Online] 41 (20), e188. Available from: doi:10.1093/nar/gkt780 [Accessed 13 May 2019].
- Jones, H.D. (2015) Future of breeding by genome editing is in the hands of regulators. *GM Crops & Food*. [Online] 6 (4), 223–232. Available from: doi:10.1080/21645698.2015.1134405 [Accessed 30 August 2019].
- Kleinstiver, B.P., Pattanayak, V., Prew M.S., Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Zheng, Z. & Joung, J.K. (2016) High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*. [Online] 529 (7587), 490–495. Available from: doi:10.1038/nature16526 [Accessed 29 March 2019].
- Kok, E.J., Glandorf, D.C.M., Prins, T.W. & Visser, R.G.F. (2019) Food and environmental safety assessment of new plant varieties after the European Court decision: Process-triggered or product-based? *Trends in Food Science & Technology*. [Online] 88, 24–32. Available from: doi:10.1016/J.TIFS.2019.03.007 [Accessed 28 August 2019].
- Kuzma, J. & Kokotovich, A. (2011) Renegotiating GM crop regulation. *EMBO Reports*. [Online] 12 (9), 883–888. Available from: doi:10.1038/embor.2011.160 [Accessed 30 August 2019].
- Lusser, M., Parisi, C., Rodriguez Cerezo, E. & Plan, D. (2011) *New plant breeding techniques: state-of-the-art and prospects for commercial development*. [Online] Publications Office of the European Union. EUR Scientific and Technical Research Reports. Available from:doi:10.2791/54761 [Accessed 30 August 2019].
- Marchant, G.E. & Stevens, Y.A. (2015) A new window of opportunity to reject process-based biotechnology regulation. *GM Crops & Food*. [Online] 6 (4), 233–242. Available from: doi:10.1080/21645698.2015.1134406 [Accessed 30 August 2019].
- McDougall, P. (2011) *The cost and time involved in the discovery, development and authorisation of a new plant biotechnology derived trait*. [Online] Available from:https://croplife.org/wp-content/uploads/2014/04/Getting-a-Biotech-Crop-to-Market-Phillips-McDougall-Study.pdf [Accessed 30 August 2019].
- Muller, H.J. (1927) Artificial transmutation of the gene. *Science*. [Online] 66, 84–87. Available from: doi:10.2307/1651551 [Accessed 9 April 2019].
- Nassar, N.M.A. & Ortiz, R. (2007) Cassava improvement: Challenges and impacts. *The Journal of Agricultural Science*. [Online] 145 (02), 163. Available from: doi:10.1017/S0021859606006575 [Accessed 29 March 2019].
- National Biosafety Technical Commission (2018) *National Biosafety Technical Commission normative resolution no. 16, of January 15, 2018*. [Online] Available from: https://agrobiobrasil.org.br/wp-content/uploads/2018/05/Normative-Resolution-16-of-January-15-2018.pdf [Accessed 4 April 2019].
- National Research Council (2004) *Safety of genetically engineered foods: Approaches to assessing unintended health effects*. Washington, D.C., National Academies Press.
- Ortigosa, A., Gimenez-Ibanez, S., Leonhardt, N. & Solano, R. (2019) Design of a bacterial speck resistant tomato by CRISPR/Cas9-mediated editing of *SlJAZ2*. *Plant Biotechnology Journal*. [Online] 17 (3), 665–673. Available from: doi:10.1111/pbi.13006 [Accessed 4 April 2019].
- Pathirana, R. (2011) *Plant mutation breeding in agriculture*. Plant Sciences Reviews. Oxfordshire, UK, CAB International.
- Pioneer (2016) *DuPont announces intentions to commercialize first CRISPR-Cas product: Press release*. [Online] Available from: https://www.pioneer.com/home/site/about/news-media/news-releases/template.CONTENT/guid.1DB8FB71-1117-9A56-E0B6-3EA6F85AAE92 [Accessed 8 November 2018].
- Podevin, N., Davies, H.V., Hartung, F., Nogué, F. & Casacuberta, J.M. (2013) Site-directed nucleases: A paradigm shift in predictable, knowledge-based plant breeding. *Trends in Biotechnology*. [Online] 31 (6), 375–383. Available from: doi:10.1016/j.tibtech.2013.03.004 [Accessed 4 April 2019].
- Puchta, H. & Fauser, F. (2013) Gene targeting in plants: 25 years later. *The International Journal of Developmental Biology*. [Online] 57 (6–7–8), 629–637. Available from: doi:10.1387/ijdb.130194hp [Accessed 13 May 2019].
- Purnhagen, K.P., Kok, E., Kleter, G., Schebesta, H., Visser, R.G.F. & Wesseler, J. (2018) EU court casts new plant breeding techniques into regulatory limbo. *Nature Biotechnology*. [Online] 36 (9), 799–800. Available from: doi:10.1038/nbt.4251 [Accessed 29 March 2019].
- Qi, Y., Li, X., Zhang, Y., Starker, C.G., Baltus, N.J., Zhang, F., Sander, J.D., Reyon, D., Joung, J.K. & Voytas, D.F. (2013) Targeted deletion and inversion of tandemly arrayed genes in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. [Online] 3 (10), 1707–1715. Available from: doi:10.1534/g3.113.006270 [Accessed 13 May 2019].
- Rodríguez-Leal, D., Lemmon, Z.H., Man, J., Bartlett, M.E. & Lippman, Z.B. (2017) Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing. *Cell*. [Online] 171 (2), 470–480.e8. Available from: doi:10.1016/J.CELL.2017.08.030 [Accessed 24 May 2019].

- Santoso, T.J. (2015) CRISPR, teknologi pengeditan genom terarah untuk pengembangan tanaman non-transgenik. *Warta Biogen*, 11 (2), 9–12.
- Santoso, T.J. et al. (2016) *Introduksi konstruk CRISPR-Cas9/Gen GA20 Ox-2 ke padi dan identifikasi mutan-mutan padi melalui analisis molekuler dan sekuensing. Laporan Akhir Penelitian TA 2016*. Bogor, BB Biogen.
- Scheben, A. & Edwards, D. (2018) Bottlenecks for genome-edited crops on the road from lab to farm. *Genome Biology*. [Online] 19 (1). Available from: doi:10.1186/s13059-018-1555-5 [Accessed 24 May 2019].
- Schinkel, H. & Schillberg, S. (2016) Genome editing: Intellectual property and product development in plant biotechnology. *Plant Cell Reports*. [Online] 35 (7), 1487–1491. Available from: doi:10.1007/s00299-016-1988-9 [Accessed 24 May 2019].
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., Zhang, K., Liu, J., Xi, J.J., Qiu, J.L. & Gao, C. (2013) Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*. [Online] 31 (8), 686–688. Available from: doi:10.1038/nbt.2650 [Accessed 13 May 2019].
- Shi, J., Gao, H., Wang, H., Lafitte, H.R., Archibald, R.L., Yang, M., Hakimi, S.M., Mo, H. & Habben, J.E. (2017) ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnology Journal*. [Online] 15 (2), 207–216. Available from: doi:10.1111/pbi.12603 [Accessed 24 May 2019].
- Smyth, S. & McHughen, A. (2008) Regulating innovative crop technologies in Canada: The case of regulating genetically modified crops. *Plant Biotechnology Journal*. [Online] 6 (3), 213–225. Available from: doi:10.1111/j.1467-7652.2007.00309.x [Accessed 8 April 2019].
- Sprink, T., Eriksson, D., Schiemann, J. & Hartung, F. (2016) Regulatory hurdles for genome editing: Process- vs. product-based approaches in different regulatory contexts. *Plant Cell Reports*. [Online] 35 (7), 1493–1506. Available from: doi:10.1007/s00299-016-1990-2 [Accessed 29 March 2019].
- Sun, Y., Jiao, G., Liu, Z., Zhang, X., Li, J., Guo, X., Du, W., Du, J., Francis, F., Zhao, Y. & Xia L. (2017) Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. *Frontiers in Plant Science*. [Online] 8, 298. Available from: doi:10.3389/fpls.2017.00298 [Accessed 24 May 2019].
- Urnov, F.D., Ronald, P.C. & Carroll, D. (2018) A call for science-based review of the European court's decision on gene-edited crops. *Nature Biotechnology*. [Online] 36 (9), 800–802. Available from: doi:10.1038/nbt.4252 [Accessed 29 March 2019].
- Voytas, D.F. (2013) Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annual Review of Plant Biology*. [Online] 64 (1), 327–350. Available from: doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105552 [Accessed 13 May 2019].
- Voytas, D.F. & Gao, C. (2014) Precision genome engineering and agriculture: Opportunities and regulatory challenges. *PLoS Biology*. [Online] 12 (6), e1001877. Available from: doi:10.1371/journal.pbio.1001877 [Accessed 13 May 2019].
- Waltz, E. (2016) Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature*. [Online] 532 (7599), 293–293. Available from: doi:10.1038/nature.2016.19754 [Accessed 24 May 2019].
- Waltz, E. (2018) With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time. *Nature biotechnology*. [Online] 36 (1), 6–7. Available from: doi:10.1038/nbt0118-6b [Accessed 24 May 2019].
- Wang, F., Wang, C., Liu, P., Lei, C., Hao, W., Gao, Y., Liu, Y.G. & Zhao, K. (2016) Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene *OsERF922*. *PLoS ONE*. [Online] 11 (4), e0154027. Available from: doi:10.1371/journal.pone.0154027 [Accessed 24 May 2019].
- Wendt, T., Holm, P.B., Starker, C.G., Christian, M., Voytas, D.F., Brinch-Pedersen, H. & Holme, I.B. (2013) TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants. *Plant Molecular Biology*. [Online] 83 (3), 279–285. Available from: doi:10.1007/s11103-013-0078-4 [Accessed 13 May 2019].
- Whelan, A.I. & Lema, M.A. (2015) Regulatory framework for gene editing and other new breeding techniques (NBTs) in Argentina. *GM Crops & Food*. [Online] 6 (4), 253–265. Available from: doi:10.1080/21645698.2015.1114698 [Accessed 30 August 2019].
- van de Wiel, C., Schaart, J., Niks, R. & Visser, R. (2010) *Traditional plant breeding methods*. [Online] Wageningen UR Plant Breeding. Report 338. Available from: <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/141713> [Accessed 28 August 2019].
- van de Wiel, C.C.M., Schaart, J.G., Lotz, L.A.P. & Smulders, M.J.M. (2017) New traits in crops produced by genome editing techniques based on deletions. *Plant Biotechnology Reports*. [Online] 11 (1), 1–8. Available from: doi:10.1007/s11816-017-0425-z [Accessed 13 May 2019].
- Yao, L., Zhang, Y., Liu, C., Liu, Y., Wang, Y., Liang, D., Liu, J., Sahoo, G. & Kelliher, T. (2018) *OsMATL* mutation induces haploid seed formation in *indica* rice. *Nature Plants*. [Online] 4 (8), 530–533. Available from: doi:10.1038/s41477-018-0193-y [Accessed 13 May 2019].

Zhang, H., Zhang, J., Lang, Z., Botella, J.R. & Zhu, J.K. (2017) Genome editing—Principles and applications for functional genomics research and crop improvement. *Critical Reviews in Plant Sciences*. [Online] 36 (4), 291–309. Available from: doi: 10.1080/07352689.2017.1402989 [Accessed 24 May 2019].

Zhong, Y., Liu, C., Qi, X., Jiao, Y., Wang, D., Wang, Y., Liu, Z., Chen, C., Chen, B., Tian, X., Li, J., Chen, M., Dong, X., Xu, X., Li, L., Li, W., Liu, W., Jin, W., Lai, J. & Chen, S. (2019) Mutation of *ZmDMP* enhances haploid induction in maize. *Nature Plants*. [Online] 5 (6), 575–580. Available from: doi:10.1038/s41477-019-0443-7 [Accessed 13 May 2019].

---