

Teknik Analisis Kromosom pada Tanaman Kopi

Ari Wibowo¹⁾

¹⁾ Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, Jl. PB Sudirman 90 Jember 68118

Analisis kromosom sangat penting dalam mempelajari evolusi dan pemetaan genetik untuk pengembangan proses pemuliaan tanaman. Kopi terdiri dari banyak spesies tanaman dan didominasi oleh karakteristik menyerbuk silang kecuali kopi arabika yang dapat menyerbuk sendiri. Hal tersebut dapat memungkinkan adanya persilangan alami antar spesies kopi. Untuk menganalisis tetua persilangan, analisis kromosom sangat dibutuhkan. Penelitian tentang kromosom tanaman kopi masih jarang dilakukan karena ukurannya yang kecil dan bentuknya yang hampir sama. Teknik pewarnaan kromosom *Fluorescence In Situ Hybridization* dan *Genomic In Situ Hybridization* sangat berguna untuk analisis kromosom kopi yang kecil dan mampu menganalisis adanya persilangan antar spesies menggunakan *probe* yang dapat berpendar. Selain penelusuran tetua, kedua teknik tersebut juga dapat digunakan untuk mempelajari pemetaan kromosom, mendeteksi kromosom alien, dan proses evolusi.

Kromosom merupakan struktur makromolekul yang berisi DNA dimana informasi genetik dalam sel tersimpan dan merupakan alat transportasi materi genetik yang sebagian besar bersegregasi menurut hukum Mendel. Hukum Mendel menyebutkan bahwa pada proses pembentukan gamet (sel kelamin), keturunannya menerima masing-masing gamet dari kedua induknya saat proses pembuahan¹⁾. Sifat dari keturunan merupakan gabungan sifat dari kedua tetuanya. Kromosom yang merupakan gabungan dari materi-materi gen, terletak di dalam nukleus dengan jumlah yang sama dalam suatu individu. Setiap kromosom mempunyai dua kromatid yang saling berhadapan dan lokasi tersebut merupakan lokasi gen (lokus) yang berisi alel-alel sebagai penyandi protein maupun enzim

yang menjaga dan mempengaruhi sistem biokimia pada organisme. Kromosom terdiri dari dua bagian penting, yaitu sentromer, yang menghubungkan dua lengan dan merupakan pusat kromosom yang berbentuk bulat dan lengan kromosom, yang mengandung kromonema dan gen yang berjumlah dua buah (sepasang)²⁾.

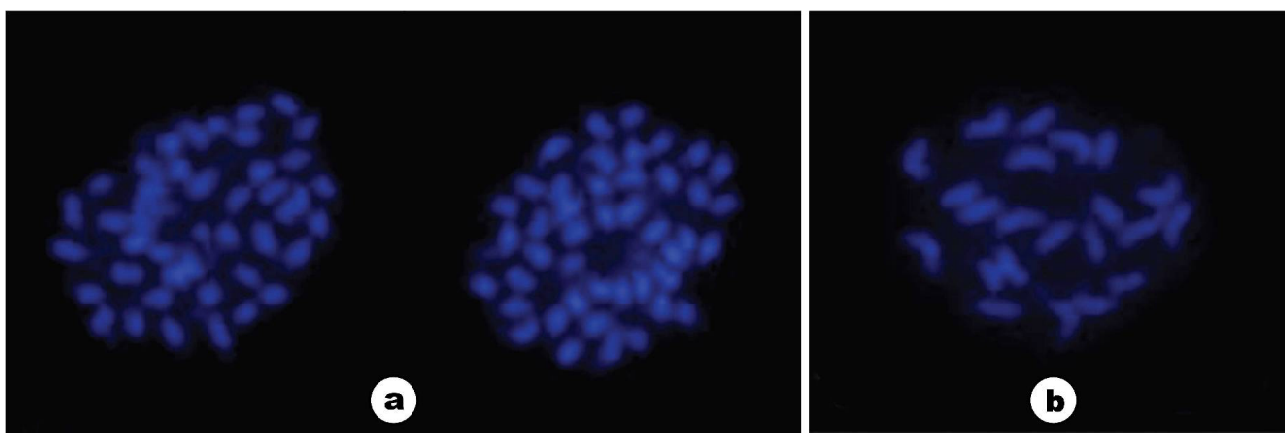
Karakterisasi kromosom dapat digunakan untuk menentukan perbedaan genetik antar spesies tanaman. Semakin dekat hubungan antar spesies tanaman maka kesamaan jumlah kromosom semakin tinggi karena jumlah kromosom yang berada dalam inti sel bersifat stabil untuk setiap spesies³⁾. Karakterisasi kromosom dapat dilakukan dengan mengkaji pembelahan sel mitotik karena karakter morfologi tanaman dalam pembelahan sel tersebut lebih stabil dan terlihat jelas. Namun kromosom juga dapat diamati pada fase awal

pembelahan meiosis. Bagian tanaman yang biasa digunakan untuk pembuatan slide kromosom adalah ujung akar tanaman dan kuncup bunga (primordia bunga). Identifikasi kromosom secara morfologi disebut juga kariotipe. Kariotipe sangat penting dalam menentukan identitas organisme seperti mengidentifikasi unit taksonomi, keanekaragaman biologi, analisis proses evolusi, dan untuk menentukan ketidaknormalan genetik dari suatu organisme. Jumlah kromosom suatu individu juga dapat diketahui dari kegiatan kariotipe.

Selama ini jumlah spesies dalam genus *Coffea* L., famili Rubiaceae, suku Coffeaceae masih belum pasti. Namun sebagian besar referensi tentang taksonomi kopi menyebutkan bahwa genus tersebut terdiri atas 100 spesies tanaman⁴⁾. Penelitian sitogenetika menyebutkan bahwa spesies kopi mempunyai dua macam jumlah kromosom, yaitu tetraploid ($2n = 4x = 44$) yang dimiliki hanya oleh kopi arabika (*Coffea arabica* L.)⁵⁾ dan diploid ($2n = 2x = 22$) yang dimiliki oleh kopi robusta dan spesies kopi yang lain⁶⁾. Perbedaan lainnya adalah tanaman kopi arabika mampu melakukan penyerbukan sendiri sedangkan spesies kopi lainnya membutuhkan tanaman berbeda varietas/klon untuk melakukan penyerbukan. Kajian kromosom pada tanaman kopi sulit dilakukan karena ukuran kromosom yang kecil dan keseragaman kariotipe. Panjang kromosom tanaman kopi berkisar antara $1,5-3,5 \mu\text{m}$ ⁵⁾ dan mempunyai karakter morfologi hampir sama satu dengan lainnya. Bahkan Pierozzi⁶⁾ melaporkan ukuran kromosom kopi robusta berkisar antara $0,85-2,38 \mu\text{m}$ dengan bentuk kromosom 8

submetasentrik dan 3 metasentrik. Sedangkan panjang kromosom kopi arabika berkisar antara $2,06-5,03 \mu\text{m}$ dengan bentuk kromosom 5 metasentrik, 16 submetasentrik, dan 1 akrosentrik⁷⁾. Ukuran kromosom ini hampir sama dengan ukuran kromosom melon (*Cucumis melo* L.) yaitu $1,1-1,9 \mu\text{m}$ ⁸⁾ dan sedikit lebih kecil dari ukuran kromosom mentimun (*Cucumis sativus* L.) yaitu $2,15-6,86 \mu\text{m}$ ⁹⁾. Bentuk kromosom kopi arabika dan robusta dapat dilihat pada gambar di bawah. Pengamatan kromosom telah menggunakan teknik pewarnaan.

In situ hybridization merupakan teknik *cytochemical* untuk menentukan letak spesifik sekuen DNA atau RNA dalam suatu organisme. Teknik tersebut sudah banyak digunakan dan mempunyai peranan penting dalam penelitian molekuler. Dengan menggunakan teknik tersebut, peneliti mampu menentukan lokasi spesifik sekuen DNA di dalam kromosom dengan tepat. *In situ hybridization* memanfaatkan sekuen DNA berulang sebagai label radioaktif atau *biotinylated probes* dalam menentukan letak sekuen pada kromosom. Prosedur identifikasi kromosom dengan *in situ hybridization* memungkinkan penggunaan sinyal berpendar yang dapat mengidentifikasi sekuen DNA, kromosom, segmen kromosom spesifik atau seluruh set kromosom dalam gambaran mudah dilihat dan bagus¹⁰⁾. Pengelompokan penyebaran sekuen berulang pada genom sangat penting untuk menganalisis perilaku kromosom. Lokasi yang diberi molekul akan berpendar sehingga dapat dilihat menggunakan mikroskop *fluorescent* dan lokasi fisik gen pada kromosom dapat dengan

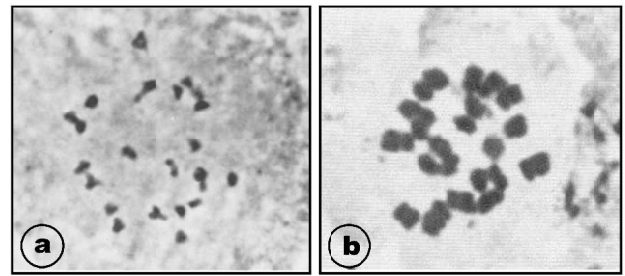


Kromosom; kopi arabika (*Coffea arabica*) (a) dan kopi robusta (*Coffea canephora*) (b)⁵⁾

tepat ditentukan. Tahapan-tahapan penting dalam penggunaan teknik *in situ hybridization* adalah pembuatan slide kromosom, kariotipe kromosom, dan pemilihan teknik pewarnaan kromosom.

Pembuatan Slide Kromosom

Bagian tanaman yang umum digunakan dalam pembuatan slide kromosom adalah ujung akar tanaman. Akar yang digunakan merupakan akar tunggang yang masih aktif membelah dan biasanya berasal dari benih yang sedang berkecambah. Ujung akar (*root-tip*) dipotong sekitar 0,5-1,0 cm pada bagian yang berwarna putih dan difiksasi menggunakan larutan fiksasi dengan komposisi etanol : asam asetat, yaitu 3:1 kemudian disimpan dalam lemari pendingin bersuhu 4°C minimal selama 4 hari. Fiksasi akar bertujuan untuk mematikan sel tanpa merubah komposisi dari sel tersebut. Sebelum membuat slide kromosom, ujung akar dicuci terlebih dahulu dengan air distilasi selama 30 menit dan dihidrolisis menggunakan 0,25% HCl selama 10 menit¹¹⁾. Ujung akar kemudian dicuci dengan larutan bufer sitrat 0,01 mol/L (sodium sitrat-asam sitrat, pH 4,5). Slide kromosom dibuat dengan memotong sepanjang 0,5 mm ujung akar pada gelas preparat kemudian diberi 25 µl larutan enzim (1% selulase RS, 1% maserase R10, 1% pektoliase Y23, dan 0,2% driselase dalam bufer sitrat, pH 4,6) dan diinkubasi selama 40-50 menit pada suhu 37°C. Larutan enzim yang tersisa dibersihkan kemudian bagian meristem akar ditetesi dengan 10 µl asam asetat 60%. Preparat dibiarkan beberapa menit sampai ujung akar terlihat pucat kemudian ditutup menggunakan kaca penutup (*cover slip*) dengan sedikit ditekan menggunakan ujung jari agar merata. Slide kemudian diamati di bawah mikroskop untuk melihat kromosom tanaman. Setelah kromosom terlihat, slide kemudian disimpan pada lemari pendingin -80°C sampai digunakan kembali. Slide kromosom dapat dibuat dari dua pembelahan sel yaitu saat pembelahan mitosis, biasanya menggunakan bagian tanaman yang sedang aktif tumbuh (ujung akar), dan saat pembelahan meiosis, saat tanaman aktif membentuk kuncup bunga.

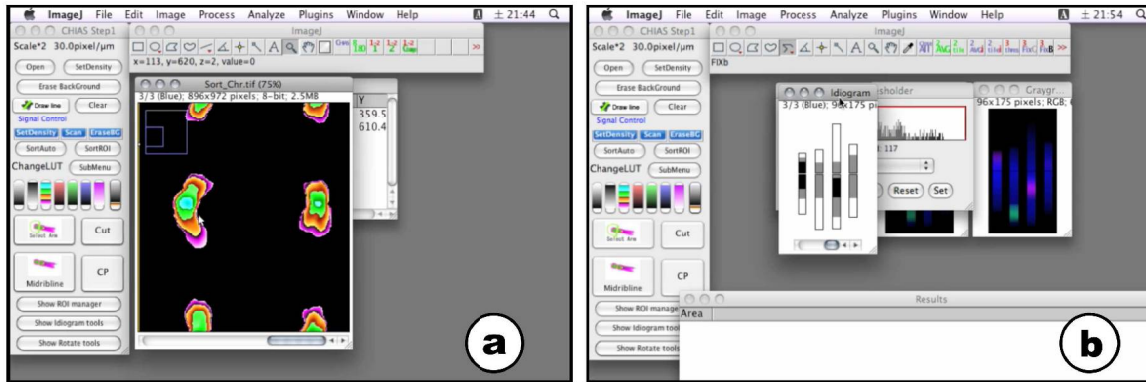


Hasil pengamatan kromosom kopi menggunakan mikroskop; penelitian tahun 1985¹²⁾ (a) dan penelitian tahun 1999⁶⁾ (b)

Kariotipe Kromosom

Analisis kariotipe merupakan gambaran kromosom dari suatu individu yang ditunjukkan dengan bentuk kromosom dan jumlah kromosom. Analisis tersebut sangat penting untuk mengetahui desain kromosom makhluk hidup. Kegiatan kariotipe dilakukan dengan mengamati kromosom suatu makhluk hidup yang telah memanfaatkan teknik pewarnaan dan menggunakan mikroskop untuk mengamati pemendarannya. Salah satu fungsi mempelajari karakter kromosom adalah dapat mengetahui tahapan evolusi dari suatu organisme. Kariotipe sangat penting dalam menentukan identitas organisme dalam mengidentifikasi dan mengetahui unit taksonomi, keanekaragaman biologi, analisis proses evolusi, dan ketidaknormalan genetik dari suatu organisme. Penyusunan kariotipe membutuhkan pengamatan karakter morfologi kromosom pada objek yang diamati. Deskripsi kariotipe pada suatu jenis organisme dapat meliputi jumlah kromosom, total ukuran kromosom (ukuran genom, panjang relatif dan absolut kromosom), simetri tiap kromosom yang ditunjukkan oleh posisi sentromer tiap kromosom, jumlah dan posisi satelit yang berhubungan dengan *nucleolar-organizing regions*, dan distribusi segmen-segmen heterokromatin¹³⁾.

Perkembangan teknologi yang semakin berkembang ini, analisis kariotipe dapat dilakukan dengan mudah menggunakan sebuah perangkat lunak. *Chromosome Image Analyzing System* (CHIAS IV) merupakan perangkat lunak untuk menganalisis kromosom organisme terutama untuk kromosom tanaman. Dengan perangkat lunak ini, para peneliti dapat menganalisis



Contoh pengukuran panjang lengan (a) dan pembuatan idiogram kromosom (b) menggunakan perangkat lunak CHIAS IV

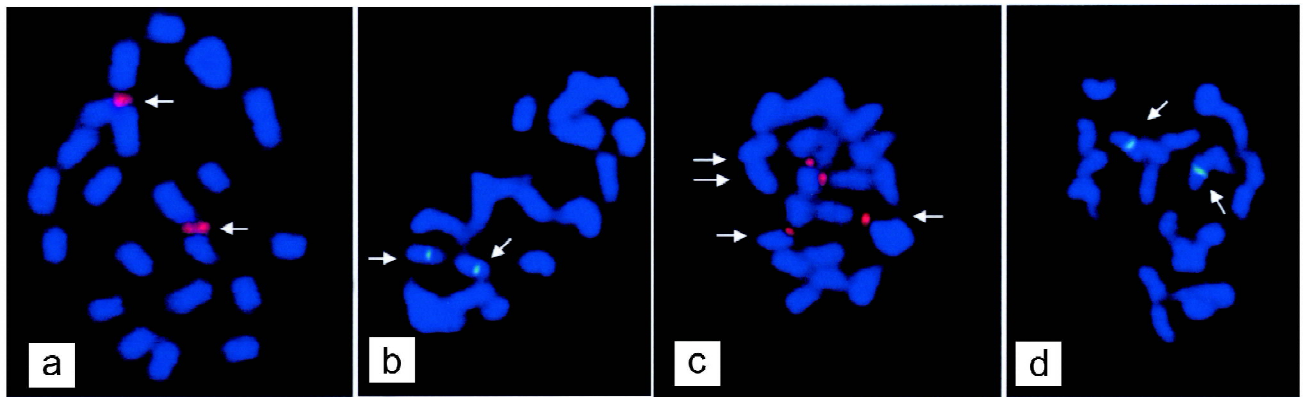
kromosom dalam waktu cepat dan karakter kuantitatif kromosom dapat diukur secara otomatis. Pada gambar kromosom yang terlihat jelas, CHIAS IV dapat membantu menentukan letak sentromer sehingga secara otomatis dapat mengukur lengan pendek dan lengan panjang kromosom serta mampu menggambarkan idiogram kromosom. Contoh analisis kromosom menggunakan perangkat lunak CHIAS IV dapat dilihat pada gambar di atas.

Metode FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*)

Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) merupakan metode sitogenetika yang dikembangkan untuk mendeteksi letak spesifik urutan DNA pada kromosom suatu organisme. Kato¹⁰⁾ tahun 2004 menyebutkan bahwa prosedur identifikasi kromosom dengan *in situ hybridization* memungkinkan penggunaan sinyal berpendar yang dapat mengidentifikasi sekuen DNA, kromosom, segmen kromosom spesifik atau seluruh set kromosom dalam gambaran yang mudah dilihat dan bagus. Pengelompokan penyebaran sekuen berulang pada genom sangat penting untuk menganalisis perilaku kromosom. Lokasi yang diberi molekul akan berpendar sehingga dapat dilihat menggunakan mikroskop *fluorescent* dan lokasi fisik gen pada kromosom dapat dengan tepat ditentukan. *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) merupakan metode untuk melakukan deteksi posisi sekuen DNA target pada kromosom. Metode FISH juga dapat digunakan untuk identifikasi kromosom di banyak tanaman penting. Kelebihan

metode FISH dengan teknik *in situ hybridization* yang lain adalah teknik ini lebih cepat mendeteksi lokasi gen atau DNA, lebih sensitif, dan mempunyai resolusi yang tinggi. Metode FISH telah banyak digunakan untuk menganalisis kromosom di berbagai komoditas tanaman.

Salah satu target sekuen DNA yang sering dikaji menggunakan metode FISH adalah jumlah dan posisi rDNA di kromosom tanaman. Pada tanaman mentimun misalnya, FISH digunakan untuk mendeteksi letak dan jumlah rDNA pada berbagai macam jenis mentimun. Mentimun di Indonesia mempunyai variasi dalam jumlah rDNA terutama sinyal 45S⁹⁾. Sinyal 45S yang terdeteksi berjumlah antara 8-10 sinyal. Mentimun yang telah dilakukan seleksi berulang kali dan sudah berbentuk galur murni, mempunyai sinyal 45S berjumlah genap (8 atau 10 sinyal) sedangkan dua jenis mentimun hibrida yang diamati di penelitian tersebut mempunyai sinyal 45S rDNA berjumlah ganjil (9 sinyal). Adanya jumlah sinyal 45S rDNA pada tanaman galur murni dan hibrida tersebut dapat menjadi pedoman untuk mengkaji jumlah sinyal rDNA di beberapa jenis tanaman kopi karena tanaman kopi mempunyai dua jenis yaitu menyerbuk sendiri dan menyerbuk silang. Lombello & Pinto-Maglio¹⁴⁾ melaporkan bahwa *Coffea humilis* mempunyai 1 pasang sinyal 45S rDNA (gambar a) dan 1 pasang sinyal 5S rDNA (gambar b) sedangkan *Coffea sp.* mempunyai 2 pasang sinyal 45S rDNA (gambar c) dan 1 pasang sinyal 5S rDNA (gambar d). Kedua jenis kopi tersebut mempunyai jumlah sinyal 45S rDNA yang berbeda. Penelitian tentang jumlah dan letak rDNA pada tanaman kopi masih jarang dipublikasikan



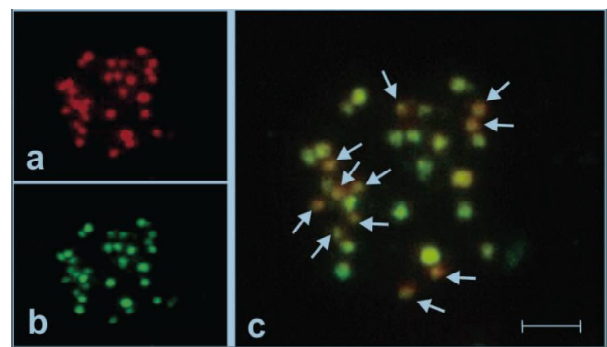
Deteksi sinyal 45S rDNA (merah) dan 5S rDNA (hijau) dengan teknik FISH; sinyal 45S rDNA (a), 5S rDNA pada *Coffea humilis* A. Cheval (b), sinyal 45S rDNA (c), dan 5S rDNA pada *Coffea* sp. Moloundou (d)¹⁴⁾

karena ukuran kromosom kopi yang kecil sehingga sulit untuk dianalisis.

Metode GISH (*Genomic In Situ Hybridization*)

Hampir sama dengan FISH, *Genomic In Situ Hybridization* (GISH) juga menggunakan molekul berpendar namun *probe* yang digunakan merupakan total genom DNA. Metode ini biasa digunakan untuk menganalisis penyebaran genom DNA interspesies dan organisasi sekuen DNANYa. Kajian sitogenetika dengan teknik GISH sering dimanfaatkan untuk membedakan genom tetua dan organisasi genom pada tanaman hibrida interspesies. Genom tetua betina dan tetua jantan diwarnai dengan probe yang berbeda sehingga tampilan kromosom hasil analisis akan menunjukkan warna kromosom yang berbeda. Dalam sitogenetika kopi, teknik GISH dapat dimanfaatkan untuk mendeteksi persebaran kromosom hasil persilangan dua jenis kopi yang berbeda. Herrera (2007) menganalisis kromosom kopi hasil persilangan antarspesies antara kopi arabika (ET 30) dan robusta (IF 181) yang menghasilkan keturunan hibrida triploid¹¹⁾. Dengan metode GISH, tanaman hibrida hasil persilangan kedua jenis kopi tersebut terdeteksi mempunyai 33 kromosom yang merupakan gabungan kedua tetuanya yang terdiri atas 22 kromosom berasal dari kopi arabika dan 11 kromosom dari kopi robusta (gambar di bawah). Selain hasil persilangan antar spesies, penelitian tersebut juga menganalisis tanaman kopi arabika introgres (S.288) hasil persilangan alami antara kopi arabika dan kopi liberika. Pada

kromosom tanaman kopi arabika introgres, terdapat 4 pasang kromosom yang mempunyai fragmen DNA dari kopi liberika. Dengan metode GISH, para peneliti mampu melakukan pemetaan genetik, penelusuran leluhur, dan mempelajari proses evolusi tanaman.



Penggunaan metode GISH pada kromosom kopi hibrida hasil persilangan kopi arabika dan robusta; probe genom tetua kopi arabika dilabeli dengan warna merah (a); probe genom tetua kopi robusta dilabeli dengan warna hijau (b); GISH menunjukkan adanya 11 kromosom yang berasal dari kopi robusta pada kromosom kopi hibrida antar spesies (c)¹¹⁾

Penutup

Tanaman kopi mempunyai ukuran kromosom yang kecil dan memiliki keseragaman bentuk kromosom sehingga sulit untuk diidentifikasi. Tanaman kopi mempunyai banyak spesies dan peluang terjadinya persilangan alami antar spesies sangatlah tinggi. Teknik FISH dan GISH yang menggunakan warna berpendar dan *probe* sebagai penanda sangat cocok untuk analisis kromosom yang berukuran kecil dan mendeteksi adanya persilangan antar spesies. Kedua teknik tersebut akan dapat memberikan informasi-informasi penting terkait sitogenetika tanaman

kopi. Para peneliti juga dapat mengkaji pemetaan kromosom, organisasi genom, proses evolusi tanaman, mendeteksi kromosom alien (asing) dan menentukan spesies leluhur tanaman.

Sumber Pustaka

- ¹⁾Crowder, L.V. (2015). Genetika Tumbuhan. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- ²⁾Suryo (1995). Sitogenetika. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- ³⁾Stace, C.A. (1979). Plant Taxonomy and Biosystematics. 2nd Edition. Edward Arnold, London.
- ⁴⁾Pinto-Maglio, C.A.F. (2006). Cytogenetics of coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18 (1), 37–44.
- ⁵⁾Herrera, J.C.; G. Camayo; G. De-La-Torre; N. Galeano; E. Salcedo; L.F. Rivera & A. Duran (2013). Identification and distribution of *copia*-like retrotransposon sequences in the coffee (*Coffea L.*) genome. *Agronomia Colombiana*, 31 (3), 269–278.
- ⁶⁾Pierozzi, N.I.I.; C.A.F. Pinto-Maglio & N.D. Cruz (1999). Characterization of somatic chromosomes of two diploid species of *Coffea L.* with acetic orcein and C-band techniques. *Caryologia* 52, 1–8.
- ⁷⁾Clarindo, W.R. & C.R. Carvalho (2008). First *Coffea arabica* karyogram showing that this species is a true allotetraploid. *Plant Systematics and Evolution* 274, 237–241.
- ⁸⁾Daryono, B.S. & D.A. Kumalawati (2011). Identification of local melon (*Cucumis melo L. var. Bartek*) based on chromosomal characters. *HAYATI Journal of Biosciences* 18 (4), 197–200.
- ⁹⁾Wibowo, A.; A.B. Setiawan; A. Purwanto; S. Kikuchi & T. Koba (2018). Cytological variation of rRNA genes and subtelomeric repeat sequences in Indonesia and Japanese cucumber accessions. *Chromosome Sciences* 21, 81–87.
- ¹⁰⁾Kato, A.; J.C. Lamb & J.A. Birchler (2004). Chromosome painting using repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 13554–13559.
- ¹¹⁾Herrera, J.C.; A. D'Hont & P. Lashermes (2007). Use of fluorescence in situ hybridization as a tool for introgression analysis and chromosome identification in coffee (*Coffea arabica L.*). *Genome* 50, 619–626.
- ¹²⁾Owuor, J.B.O. (1985). Interspecific hybridization between *Coffea arabica L.* and tetraploid *C. canephora P. Ex. F_R*. II meiosis in *F₁* hybrids and backcrosses to *C. arabica*. *Euphytica* 34, 355–360.
- ¹³⁾Levin, D.A. (2002). The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution. Oxford University Press, London.
- ¹⁴⁾Lombello, R.A. & C.A.F. Pinto-Maglio (2004). Heterochromatin and rDNA sites in *Coffea L.* chromosomes revealed by FISH and CMA/DAPI. I: *C. humilis*, *C. kapakata*, *C. sp. Moloundou*, *C. stenophylla*. *International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics* 57 (1), 11–17.



Outlet Kopi dan Kakao

Food & Resto

Varian Kue Kering



Roker Monde
(Roti Kering Cokelat)

Netto : 170 gram
Harga : 19.800,-



Roker Wijen
(Roti Kering Cokelat)

Netto : 110 gram
Harga : 17.600,-



Roker
(Roti Kering Salju)

Netto : 230 gram
Harga : 19.800,-



Roker
(Cokelat Cookies)

Netto : 90 gram
Harga : 13.200,-



Rockie
(Real Chocolate Cookies)

Netto : 150 gram
Harga : 27.500,-



Info Pemesanan :
0822 – 3113 - 8567 : Hendy
0852 – 3610 – 7626 : Rico

 Outlet Kopi dan Kakao

 Aneka Food Kopi Kakao

 <http://Bitly/viccojember>

 <http://bit.ly/2JAV1TJ>