

Analisis Kromosom dengan Teknik *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) dan *Genomic In Situ Hybridization* (GISH) dalam Pemuliaan Tanaman Kopi (*Coffea* sp.)

Obrina Eninta Br Bukit¹⁾ dan Ari Wibowo²⁾

¹⁾Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Pembangunan Nasional Veteran Yogyakarta. Jl. Padjajaran Jl. Ring Road Utara No.104, Ngropoh, Condongcatur, Kec. Depok, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55283

²⁾Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, Jl. PB Sudirman 90 Jember, Jawa Timur 68118

Sitogenetika adalah studi tentang struktur kromosom dan tingkah laku kromosom selama proses mitosis dan meiosis. Penggunaan teknik pewarnaan kromosom *fluorescence in situ hybridization* (FISH) dan *genomic in situ hybridization* (GISH) sangat berguna dalam menganalisis kromosom kopi yang berukuran kecil. Teknik-teknik ini memungkinkan untuk melakukan deteksi persilangan antar spesies menggunakan probe yang bersifat berpendar, sehingga memudahkan dalam penelusuran persilangan, pemetaan kromosom, deteksi kromosom asing, dan studi evolusi kopi. Selain itu, penggunaan metode FISH juga memungkinkan melakukan pengamatan secara langsung pada level kromosom yang sulit dilakukan dengan teknik lain karena keterbatasan ukuran dan bentuk kromosom yang hampir sama diantara spesiesnya.



Tanaman kopi (*Coffea* sp.) merupakan salah satu komoditas dari subsektor perkebunan yang memiliki peranan penting bagi perekonomian nasional, yaitu sebagai sumber devisa, penyedia lapangan kerja, dan sebagai sumber pendapatan bagi petani maupun bagi pelaku ekonomi lainnya yang terlibat dalam agribisnis kopi. Saat ini perkembangan kopi di Indonesia terus mengalami kemajuan yang cukup signifikan. Hal ini menjadi harapan bagi Indonesia untuk menjadi produsen kopi terbesar di dunia, dan Indonesia memiliki kopi spesialti di mata dunia⁽¹⁾.

Dari aspek luasan lahan kopi, Indonesia merupakan negara kedua setelah Brazil. Namun dari aspek produksi, Indonesia merupakan negara produsen biji kopi peringkat keempat terbesar di dunia setelah Brazil, Vietnam, dan Kolombia. Perkebunan kopi di Indonesia menurut penggunaannya dibedakan menjadi perkebunan besar (PB), dan perkebunan rakyat (PR). Perkebunan besar terdiri dari perkebunan besar negara (PBN), dan perkebunan besar swasta (PBS). Total keseluruhan luas lahan kopi di Indonesia mencapai 1.265.930 ha dengan total produksi

774.940 ton. Produksi ini berasal dari perkebunan rakyat sebesar 95,64%, sementara sisanya perkebunan besar milik negara (PBN) sebesar 2,07%, dan Perkebunan besar milik swasta (PBS) sebesar 2,29%⁽²⁾.

Di antara hampir 100 spesies yang ditemukan, kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) dan kopi Robusta (*Coffea canephora* var. Robusta) mendominasi perdagangan dunia. Kopi Arabika mendominasi 70% konsumsi kopi dunia dan sisanya diisi oleh kopi Robusta⁽³⁾. Kopi Arabika tumbuh dengan baik di dataran tinggi tropis dengan kualitas tinggi, sementara kopi Robusta tumbuh di dataran rendah dengan kualitas lebih rendah. Di Indonesia, kopi merupakan komoditas ekspor terbesar setelah kelapa sawit dan kelapa. Karenanya, pengembangan kopi menjadi salah satu prioritas dalam pembangunan pertanian. Pengembangan kopi secara nasional berdampak positif terhadap peningkatan perekonomian masyarakat yang melibatkan sekitar 1,96 juta rumah tangga (RT) petani⁽⁴⁾.

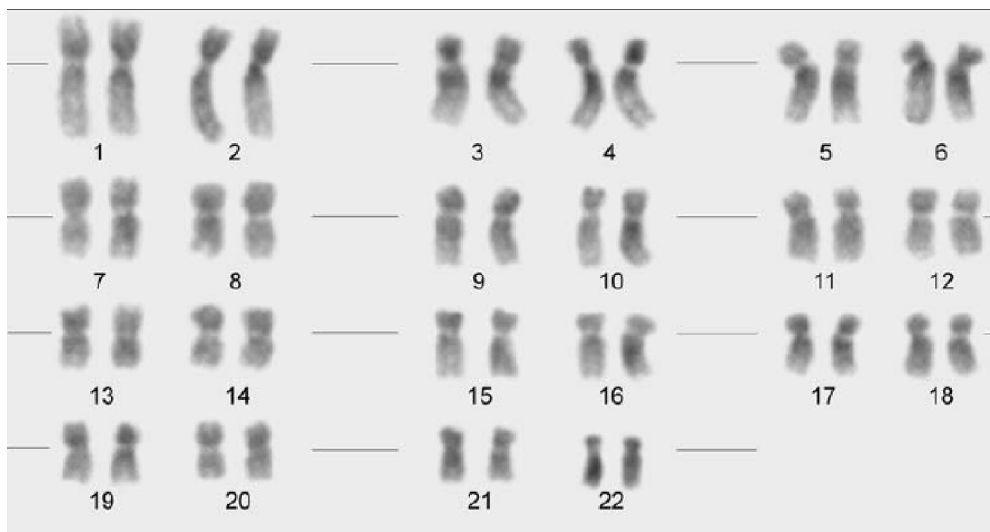
Jumlah spesies yang ditemukan dalam genus *Coffea* L., famili Rubiaceae, dan suku Coffeae, masih belum diketahui. Namun, menurut sebagian besar referensi tentang taksonomi kopi, genus kopi terdiri dari 100 spesies tanaman⁽⁵⁾. Ada dua jenis jumlah kromosom yang dimiliki oleh spesies kopi, menurut penelitian sitogenetika. Pertama adalah diploid ($2n = 2x = 22$), hanya dimiliki oleh kopi Arabika (*Coffea arabica* L.)⁽⁶⁾ dan yang kedua adalah tetraploid ($2n = 4x = 44$) yang dimiliki kopi Robusta dan spesies kopi lainnya⁽⁷⁾. Panjang kromosom tanaman kopi antara 1,5 dan 3,5 μm ⁽⁶⁾,

dan karakter morfologinya hampir identik. Kromosom kopi Robusta memiliki ukuran antara 0,85-2,38 μm dan memiliki bentuk kromosom 8 submetasentrik dan 3 metasentrik⁽⁷⁾. Sedangkan panjang kromosom kopi Arabika berkisar 2,06-5,03 μm dengan bentuk kromosom 5 metasentrik, 16 submetasentrik, dan 1 akrosentrik⁽⁸⁾ (Gambar 1).

Proses pengecatan kromosom khusus yang dikenal sebagai FISH dilakukan dengan menggunakan probe kromosom lengkap (pelacak) yang dilabel dengan pewarna, seperti biotin, atau campuran beberapa pewarna yang ditemukan pada kromosom yang diamati⁽⁹⁾. Metode sitogenetika yang dikenal sebagai *fluorescence in situ hybridization* (FISH) digunakan untuk menentukan letak urutan DNA tertentu pada kromosom organisme. Metode *in situ hybridization* untuk identifikasi kromosom memungkinkan penggunaan sinyal berpendar untuk mengidentifikasi sekuen DNA, kromosom, segmen kromosom tertentu, atau seluruh set kromosom dalam gambaran yang mudah dilihat⁽¹⁰⁾. Posisi sekuen DNA target pada kromosom dapat diidentifikasi melalui teknik hibridisasi fluorescens in situ (FISH). Banyak tanaman penting dapat ditemukan kromosom dengan metode FISH.

Pemanfaatan Teknik FISH

Fluorescence in situ hybridization (FISH) adalah teknik penting dalam sitogenetika karena dapat divisualisasikan DNA/RNA yang berasosiasi dengan area tertentu atau seluruh bagian kromosom melalui FISH pada berbagai macam preparat kromosom⁽¹¹⁾.



Gambar 1. Kariogram kromosom kopi Arabika hasil pewarnaan dengan Giemsa 5%⁽⁸⁾

Selain itu, FISH dapat digunakan untuk mempelajari struktur, mutasi, dan evolusi di tingkat individu kromosom dan seluruh genom⁽¹¹⁾.

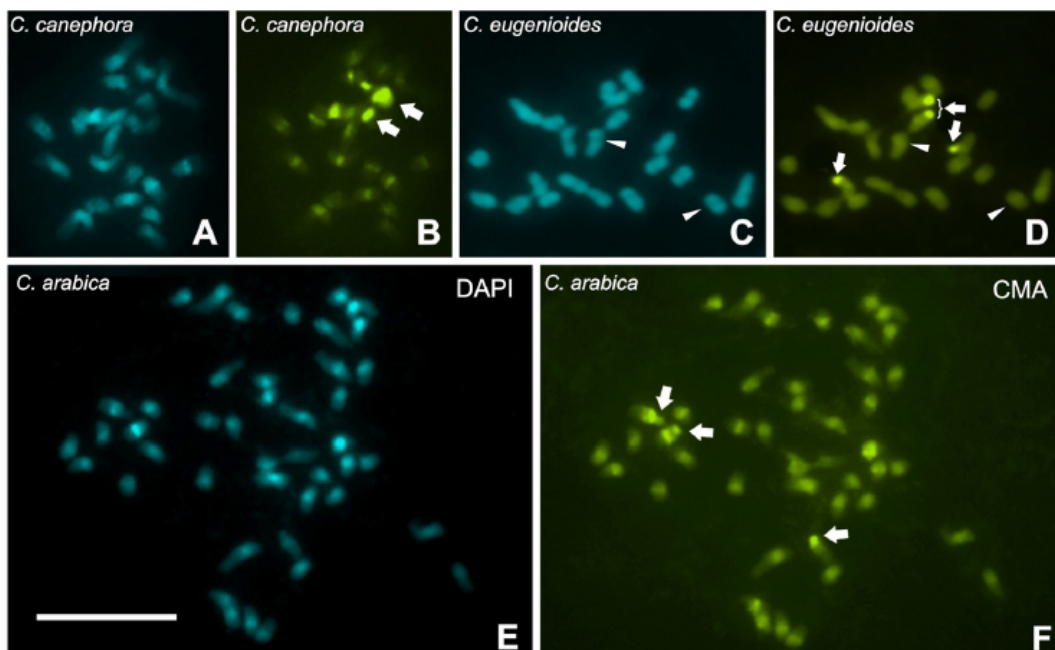
Teknik FISH dikembangkan oleh Dr. R. Amann di Jerman sebagai metode yang digunakan untuk mendeteksi aberasi kromosom. FISH merupakan teknik sitogenetik molekuler yang saat ini digunakan secara luas untuk pemetaan gen, diagnosis penyakit keturunan, dan deteksi perubahan jumlah gen kopi dalam sel malignan. Umumnya teknik ini digunakan apabila analisis sitogenetik konvensional tidak memungkinkan untuk mendeteksi atau meyakinkan ketidaknormalan kromosom. Teknik FISH secara luas digunakan untuk studi kromosom dan mutasi atau delesi gen, selain itu, juga banyak digunakan dalam praktek pada seluruh bidang onkologi dan ilmu kedokteran lain seperti deteksi kekebalan bakteri terhadap obat⁽¹²⁾.

Secara garis besar, teknik FISH digunakan dalam *prenatal screening*, onkologi, diagnosa klinis, dan pertanian. Selain digunakan untuk mengetahui besarnya dosis radiasi yang diterima seseorang, teknik FISH juga digunakan di berbagai bidang lain. Metode FISH memiliki keunggulan dibandingkan dengan metode hibridisasi in situ lainnya karena mendeteksi lokasi gen atau DNA lebih cepat, lebih sensitif, dan memiliki resolusi yang lebih tinggi. Teknik FISH telah banyak digunakan untuk memeriksa kromosom di berbagai tanaman⁽¹³⁾.

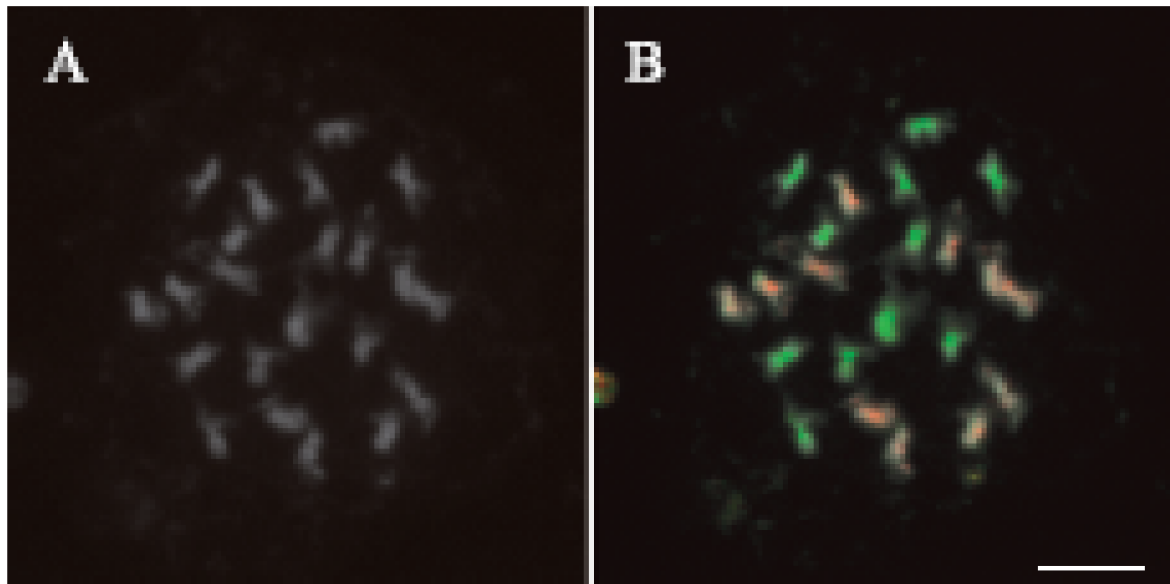
Untuk melakukan analisis DNA dan kromosom pada tanaman kopi, teknik *fluorescence in situ hybridization* (FISH) dapat digunakan (Gambar 2). Dengan menggunakan probe DNA yang telah dilabel dengan pewarna fluoresen (berpendar). Para peneliti dapat mengidentifikasi dan memetakan sekuens DNA tertentu pada kromosom tanaman kopi. Dengan demikian, teknik FISH dapat digunakan dalam penelitian genetika tanaman kopi, termasuk pemetaan gen khusus atau analisis struktur kromosom. Namun, dikarenakan ukuran kromosom kopi yang kecil, analisis rDNA sulit dilakukan. Oleh karena itu, penelitian tentang jumlah dan letak rDNA pada tanaman kopi masih jarang dipublikasikan⁽¹³⁾.

Pemanfaatan Teknik GISH

Di bidang pemuliaan tanaman, modifikasi teknik FISH lebih sering dimanfaatkan dalam bentuk *genomic in situ hybridization* (GISH). Keturunan hasil persilangan antar dua tetua yang berbeda spesies atau genus umumnya sering divalidasi keberhasilan persilangannya dengan menggunakan teknik GISH. Selain itu, GISH juga bermanfaat untuk menganalisis tanaman allopoliploid dan keturunan tanaman hasil silang-balik (*backcross*). Teknik GISH digunakan untuk mengevaluasi introgressi gen asing dari tetua donor berupa penambahan kromosom dari spesies lain terhadap genom tanaman



Gambar 2. Pemanfaatan metode FISH dalam analisis kromosom *Coffea canephora* (A,B), *Coffea eugenioides* (C,D), dan *Coffea arabica* (E,F)⁽¹⁴⁾



Gambar 3. Pemanfaatan analisis GISH untuk mendeteksi kromosom tetua persilangan pada tanaman F1 Hibrida. (A) Pewarnaan dengan DAPI. (B) Probe GISH menunjukkan 11 kromosom diturunkan dari *J. curcas* (merah) dan *J. integerrima* (hijau). Skala bar = 2,5 μm ⁽¹⁹⁾

poliploid tanpa mengganggu keseimbangan genom tanaman tersebut (*addition lines* atau *substitution lines*), analisis komposisi genom, dan penyusunan kembali dua genom tanaman yang berbeda spesies (*intergenomic rearrangement*)^(15; 16; 17; 18; 19) (Gambar 3).

Teknik GISH digunakan untuk melakukan analisis kromosom kopi hasil persilangan antarspesies yang menghasilkan hibrida triploid dari kopi Arabika (ET 30) dan Robusta (IF 181)⁽²⁰⁾. Selain itu metode GISH, juga digunakan untuk menganalisis hasil persilangan alami antara kopi Liberika dan kopi Arabika (S.288), tanaman hibrida hasil persilangan dari kedua jenis kopi tersebut. Tanaman hibrida ini memiliki 33 kromosom yang terdiri dari 22 kromosom dari kopi Arabika dan 11 kromosom dari kopi Robusta. Pemetaan genetik, penelusuran leluhur, dan analisis evolusi tanaman dapat dilakukan dengan metode GISH.

Penutup

Sitogenetika adalah studi tentang struktur kromosom dan tingkah laku kromosom selama proses mitosis dan meiosis. Penggunaan teknik pewarnaan *kromosom fluorescence in situ hybridization* (FISH) dan *genomic in situ hybridization* (GISH) sangat berguna untuk menganalisis kromosom kopi yang berukuran kecil. Analisis kromosom pada tanaman kopi adalah proses untuk mengidentifikasi,

mengamati, dan menganalisis kromosom dalam sel tanaman kopi. Hal ini dilakukan untuk memahami struktur kromosom, jumlah kromosom, serta variasi genetik yang terdapat pada tanaman kopi. Analisis kromosom dapat memberikan informasi penting dalam pemuliaan tanaman kopi, seperti mengidentifikasi sifat-sifat genetik yang diinginkan atau mengembangkan varietas kopi baru.

Sumber Pustaka

- ¹⁾Wahyudi, E.; R. Martini; T.E. Suswatiningsih (2018). Perkembangan Perkebunan Kopi di Indonesia. *Jurnal Masepi*, 3(1), 1–20.
- ²⁾Ditjenbun (2022). Statistik Perkebunan Unggulan Nasional 2020-2022. Direktorat Jenderal Perkebunan, Kementerian Pertanian Republik Indonesia. Jakarta, Indonesia.
- ³⁾Damatta, F.M. & J.D.C. Ramalho (2006). Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: A review. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 55–81.
- ⁴⁾BPS (2017). *Jumlah Rumah Tangga Usaha Perkebunan Tanaman Tahunan Menurut Provinsi dan Jenis Tanaman*. Badan Pusat Statistik. Jakarta, Indonesia.
- ⁵⁾Pinto-Maglio, C.A.F. (2006). Cytogenetics of coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 37–44.
- ⁶⁾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.
- ⁷⁾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.

- ⁸Clarindo, 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.
- ⁹Ried, T.; E. Schrock & J. Wienberg (1998). Chromosome painting: A useful art. *Human Molecular Genetic*, 7 (10), 1619–1626.
- ¹⁰Kato, 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.
- ¹¹Jiming, J. (2019). Fluorescence in situ hybridization in plants: recent developments and future applications. *Chromosome Research*, 27, 153–165.
- ¹²Yanti, L.; I. Indrawati & S. Pumami (2006). Pengenalan teknik FISH untuk deteksi aberasi kromosom translokasi akibat pengion. *Jurnal Buletin Alara*, 8(2), 53–63.
- ¹³Wibowo, A. (2019). Teknik Analisa Kromosom pada Tanaman Kopi. *Warta Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia*, 31(2), 1–6.
- ¹⁴Nunes, R.C.; S.O. Arias; D. Cruzillat; L.A. Mueller; S.R. Strickler; P. Descombes; C. Fournier; D. Moine; A. de Kochko; P.M. Yuyama; A.L.L. Vanzela & R. Guyot (2018). Structure and distribution of centromic retrotransposons at diploid and allotetraploid *Coffea* centromic and pericentromeric regions. *Frontiers In Plant Science*, 9, 175.
- ¹⁵Schwarzacher, T. (2003). DNA, chromosomes, and in situ hybridization. *Genome*, 46(6), 953–62.
- ¹⁶Ramzan, F.; A. Younis & K.B. Lim (2017). Application of genomic in situ hybridization in horticultural science. *Hindawi: International Journal of Genomics*, 7561909, 1–12.
- ¹⁷Bailey, P. John; S.T. Bennett; M.D. Bennett & C.A. Stace (1993). Genomic in situ hybridization identifies parental chromosomes in the wild grass hybrid x *Festulpa hubbardii*. *Heredity*, 71(4), 335–41.
- ¹⁸Markova, M. & B. Vyskot (2010). New horizons of genomic in situ hybridization. *Cytogenetic and Genome Research*, 126(4), 368–75.
- ¹⁹Fukuhara, S.; N. Muakrong; S. Kikuchi; P. Tanya; H. Sassa; T. Koba & P. Srinives (2016). Cytological characterization of an interspecific hybrid in jatropha and its progeny reveals preferential uniparental chromosome transmission and interspecific translocation. *Breeding Science*, 66(5), 838–44.
- ²⁰Herrera, 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.



Kopi Arabika Varietas Komasti SK Mentan
No 200/kpts/SR.120/1/2013

KOMASTI

Komposit Andung Sari Tiga

Varietas Komasti (Komposit Andungsari Tiga) terdiri dari 6 genotipe yang secara morfologi serupa/identik tetapi secara genetik memiliki gen ketahanan berbeda sehingga ketahanannya tidak mudah terpatahkan serta lebih toleran terhadap perubahan kondisi lingkungan karena variabilitas genetik enotipegenotipe penyusunnya. Potensi produktivitas 2,1 ton/ha untuk populasi 2000 ph/ha, tanaman kokoh, tahan serangan angin. Rentan serangan bubuk buah kopi. Rentan nematoda *Radopholus similis* dan *Pratylenicus coffeae*. Ukuran biji besar, berbentuk oval, mutu seduhan bagus dengan nilai kesukaan 7,5.



Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia