

# In Situ Hybridization: GISH and FISH

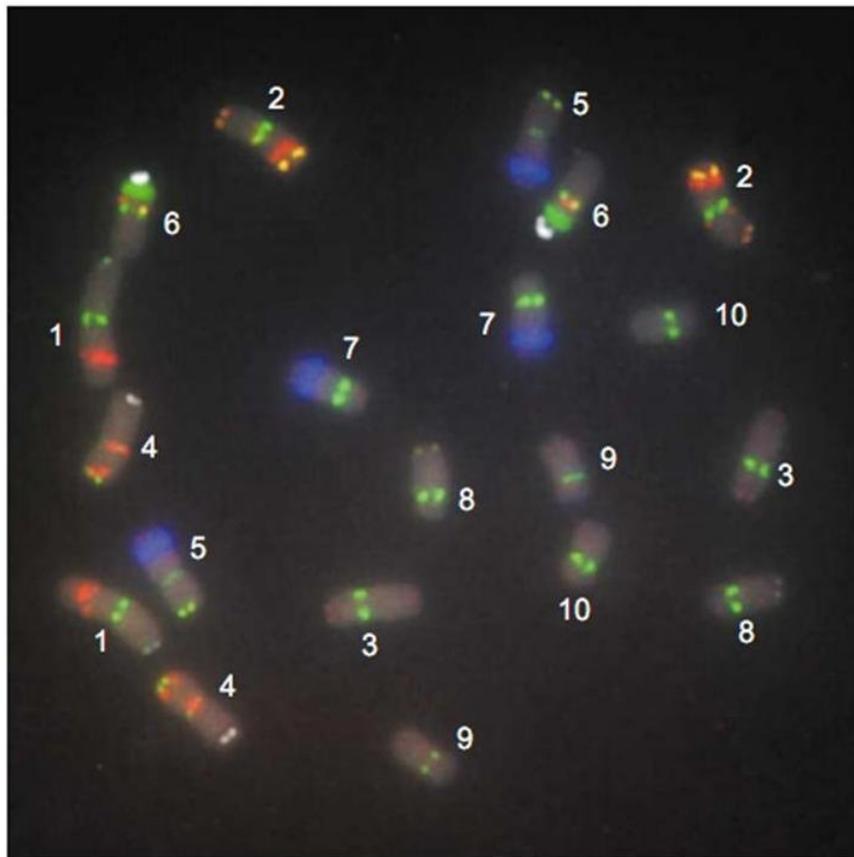
## PENDAHULUAN

Analisis sitogenetika klasik sudah mulai digantikan penggunaan dengan teknik in situ hybridization. In situ hybridization merupakan teknik cytochemical untuk menentukan letak spesifik sekuen DNA atau RNA dalam suatu organisme (McFadden, 1995). In situ hybridization (ISH) sudah banyak digunakan dan merupakan teknik yang sangat penting dalam berbagai penelitian molekuler. Teknik ini dapat memungkinkan kita untuk menentukan lokasi fisik sekuen DNA di dalam kromosom dengan tepat. Teknik ini memanfaatkan sekuens DNA yang berulang sebagai label radioactive atau biotinylatel probes untuk menentukan letak sekuens tersebut di dalam kromosom (Devi, et al. 2005).

Prosedur dalam mengidentifikasi kromosom dengan ISH memungkinkan kita untuk dapat menggunakan sinyal berpendar yang dapat mengidentifikasi sekuen, kromosom, segment kromosom yang spesifik atau seluruh set kromosom dalam gambaran yang mudah dilihat dan baik (Kato, et al. 2005). Penting bagi kita untuk dapat membedakan penyebaran sekuen berulang pada genom, gambaran perpasangan genom pada sel tunggal, dan untuk menganalisis perilaku kromosom. Teknik – teknik sitogenetika merupakan komponen yang sangat diperlukan dalam mempelajari organisasi suatu genom dan asosiasinya dengan dengan kromatin.

## FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION

Teknik in situ hybridization telah mengalami berbagai macam modifikasi. Salah satunya adalah dengan dipergunakannya molekul berpendar dalam teknik tersebut (Devi, et al. 2005). Lokasi yang diberi molekul tersebut, nantinya akan berpendar dan akhirnya pendarannya dapat dilihat dengan menggunakan fluorescent microscop. Hal inilah yang membuat lokasi fisik gen pada kromosom dapat dengan tepat ditentukan. Teknik ini biasa disebut sebagai Fluorescent In Situ Hybridization (FISH). Kelebihan teknik ini dibandingkan dengan teknik ISH adalah dapat lebih cepat dalam mendeteksi lokasi gen atau DNA, memiliki resolusi yang tinggi, dan sensitif. Hasil analisa dengan FISH dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Hasil Analisa FISH pada 10 Pasang Kromosom Jagung

Teknik FISH biasa digunakan untuk membedakan kromosom nonhomolog di dalam genom (Kato, et al. 2005). Prosedur ini penting untuk mendeteksi adanya kerusakan pada kromosom, untuk menentukan kasus aneuploid, untuk mempelajari perilaku kromosom, dan untuk menentukan lokasi fisik sekuen DNA berluang pada genom, lokus, atau gen introgesi. FISH dapat dipakai untuk mendeteksi sekuen nucleid acid dengan label probe berpendar yang disatukan secara spesifik untuk melengkapi sekuen target dalam sel utuh.

Terdapat 2 metode pewarnaan dalam FISH, yaitu metode langsung dan metode tidak langsung (Devi, et al. 2005). Metode langsung dengan menggunakan fluorochrome-labelled nucleotide sebagai penanda probe, sedangkan metode tidak langsung menggunakan biotin, digoxigenin, dan dinitrophenol (DNP) sebagai reporter molekul yang nanti akan terdeteksi oleh fluorochrome-conjugated avidin atau antibodi. Metode langsung tidak menggunakan immunochemical sehingga dapat lebih cepat dan menghasilkan resolusi yang baik. Berikut adalah tahapan – tahapan dalam menggunakan FISH (Moter and Gobel, 2000):

#### 1. Probe dan labeling

Probes untuk FISH harus spesifik, sensitif, dan mudah untuk masuk ke dalam jaringan. Terdapat tiga tipe probe, yaitu oligonucleotide, double-stranded DNA, dan single – stranded DNA (Mcfadden, 1995). Tipe probe oligonucleotide berukuran antara 15 dan 30 bp. Probe yang pendek dapat lebih mudah mengakses target, tetapi ia hanya dapat membawa sedikit label. Terdapat cara yang berbeda dalam melakukan labeling. Cara langsung atau cara tidak langsung. Cara langsung lebih umum digunakan karena lebih cepat, murah, dan mudah.

#### 2. Fluorescent dyes

Pewarna yang umum digunakan untuk FISH dalam microbiology adalah turunan dari fluorescein (fluorescein-isothiocyanate, 5-(6)carboxyfluorescein-N-hydroxyuccimide-ester) dan turunan dari rodamine (Tetramethyl-rhodamine-isothiocyanate, texas red) dan baru – baru ini menggunakan pewarna cyanine seperti Cy3 dan Cy5. Pendaran berwarna biru dapat dihasilkan oleh diamidines aromatic seperti 4,6-diamidino-2-phenylidole dihydrochloride (DAPI).

3. Ribosomal RNA (rRNA) sebagai target untuk FISH

Molekul rRNA yang umum digunakan dalam bidang mikrobiologi adalah 16S rRNA. Molekul lainnya yang umum digunakan adalah seperti 5S dan 18S-5,8S-26S rRNA

4. Fixation

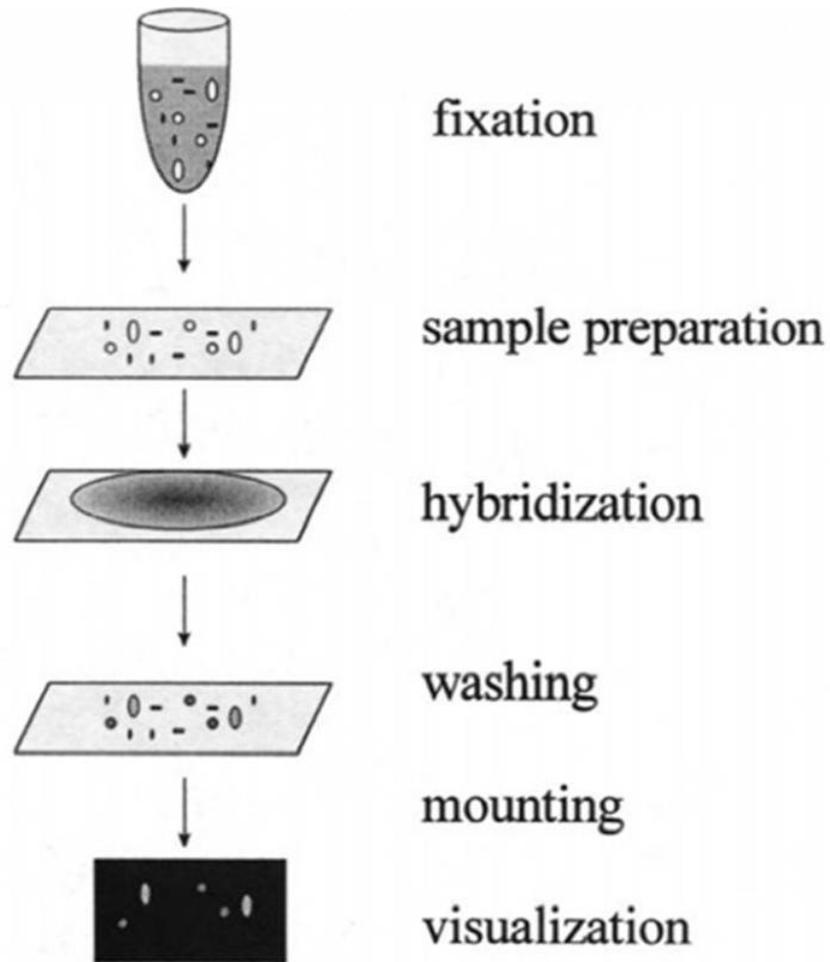
Fiksasi dapat dibantu dengan menggunakan agen pengndap seperti etanol dan metanol, agen cross-linking seperti aldehid, atau kombinasi antara keduanya. Fiksasi yang baik sangat menentukan hasil dari FISH. Fiksasi yang baik harus bisa mendapatkan penetrasi probe yang baik, semaksimal mungkin dalam menyimpan RNA target, dan menjaga keutuhan sel dan morfologinya. Umumnya, larutan 3 -4 % (v/v) formaldehid atau paraformaldehid baik untuk makteri geram-negatif, sedangkan untuk organisme geram positif dapat digunakan etanol (50%), etanol:formalin (9:1) atau perlakuan pemanasan.

5. Spesimen preparation dan pretreatment

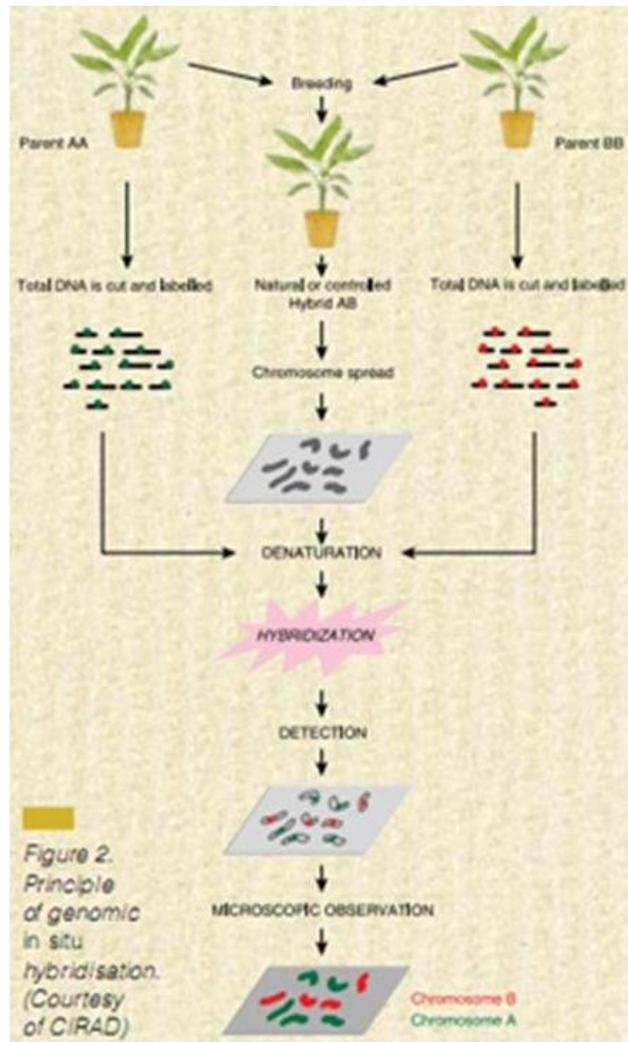
Spesimen yang lebih baik dapat diperoleh dengan memberikan agen pelapis pada permukaannya. Bahan kimia yang dapat digunakan diantaranya adalah gelatin. Pra perlakuan yang dapat dilakukan diantaranya adalah dengan perlakuan enzimatik dengan isozyme dan lysostaphin. Prosedur pra perlakuan dapat meningkatkan kemampuan probe untuk mengakses target dan mengurangi banding yang tidak spesifik.

6. Hybridization

Hibridisasi harus dilakukan dalam kondisi yang tepat. Hibridisasi merupakan step yang penting dalam prosedur FISH. Hibridisasi dilakukan di chamber yang gelap dan lembab. Temperatur yang digunakan antara 37°C - 50°C. Waktu yang digunakan bervariasi antara 30 menit sampai beberapa jam. Kemudian, dibilas dengan air destilasi. Untuk mengurangi jumlah racun dapat digunakan beberapa konsentrasi garam atau bahkan formamide. Terakhir, slide dibilas kembali dengan air dingin, kemudian keringkan, pasang, dan dokumentasi. Berbagai tahapan – tahapan tersebut dapat dilihat pada gambar 2 dan 3



Gambar 2. Tahapan – Tahapan Analisa FISH pada Mikroorganisme



Gambar 3. Hasil Analisa FISH pada Tanaman Pisang

Lusiyanti, et al (2006) menjelaskan bahwa secara umum, proses FISH diawali dengan dehidrasi slide yang telah ditetesi larutan kromosom metafase ke dalam larutan serial etanol 70%, 90 % dan 100 % selama waktu tertentu. Selanjutnya slide dikeringkan (aged) di atas hot-plate suhu 65°C selama 1,5 jam. Di lain pihak whole chromosome probe sebanyak 1 µl dalam buffernya divortex dan disentrifuse kemudian didenaturasi pada suhu 65°C dan disimpan dalam waterbath suhu 37°C selama 45 menit (30-60 menit). Slide berisi kromosom didenaturasi dengan menginkubasinya dalam larutan formamida dalam water-bath suhu 65°C selama 1,5 menit dan dicuci berturut-turut dengan serial alkohol 70% dingin, 90% dua kali dan 100 % selama 5 menit.

Proses hibridisasi dilakukan dengan meneteskan probe pada slide yang telah didenaturasi kemudian ditutup dengan coverslip serta bagian pinggir diolesi lem kuning untuk mencegah udara masuk (penguapan). Slide diletakkan dalam lunch box berwarna gelap dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 16 jam. Setelah proses hibridisasi, coverslip dibuka dan slide direndam dalam waterbath suhu 45°C selama 30 menit. Selanjutnya direndam berturut-turut dalam kopleng jar berisi stringency wash solution dua kali, larutan 1x SSC dua kali dan akhirnya larutan detergen selama 4 menit. Setelah dikeringkan, slide ditetesi dengan DAPI dan pengamatan translokasi dilakukan di bawah mikroskop epi-fluorescence. Prosedur teknik FISH dapat berbeda-beda tergantung dari produsen probe kromosom yang digunakan.

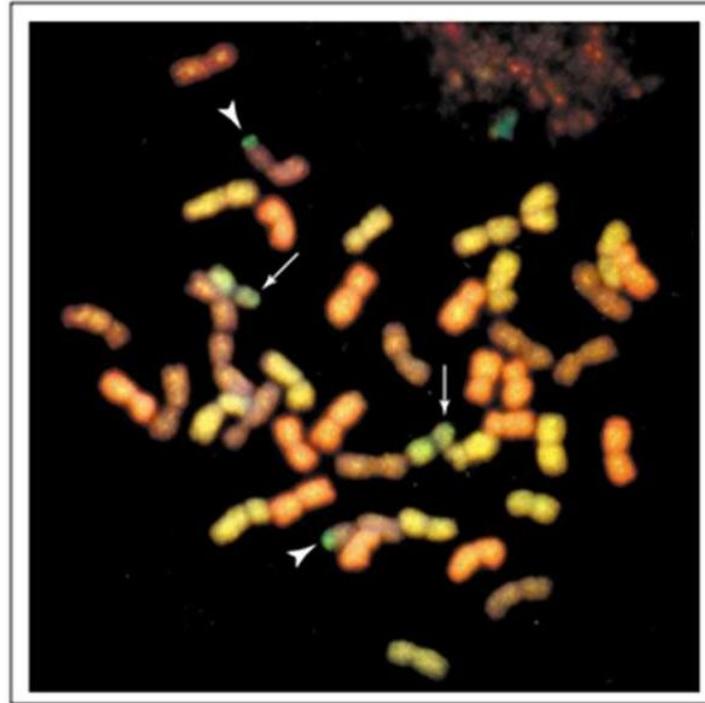
Prosedur FISH juga telah banyak mengalami modifikasi. Hal ini sangat tergantung mengenai tujuan yang ingin dicapai oleh masing – masing peneliti. Modifikasi – modifikasi tersebut diantaranya adalah : 1) Tyr-FISH, 2) Three-dimensional FISH using optical-sectioning microscopy, 3) FISH on super-stretched chromosomes, dan 4) FISH on DNA fibers ( Jiang and Gill, 2006)

## GENOME IN SITU HYBRIDIZATION

Selain menggunakan molekul berpendar, modifikasi juga dapat dengan menggunakan total genom DNA sebagai probe dalam in situ hybridization yang biasa disebut Genomic in situ hybridization (GISH) (Devi, et al. 2005). Metode ini digunakan untuk memeriksa penyebaran genomik DNA interspesies dan organisasi sekuensnya. Banyak dari sekuens DNA dalam 2 atau lebih genom dipelajari karena memiliki cukup perbedaan sehingga penggunaan probe genom dapat digunakan untuk membedakan di antara mereka.

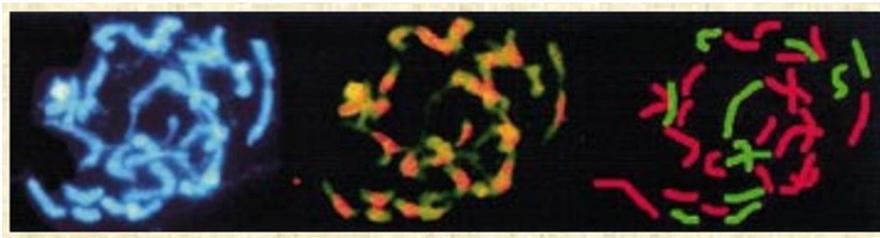
Metode GISH secara luas digunakan dalam teknik sitogenetika sebagai metode langsung untuk membedakan genom tetua dan menganalisis organisasi genom pada hibrida interspesifik, spesies aloploid, lintasan introgesi interspesifik (Kato, et al. 2005). Penanda seluruh DNA genomik digunakan sebagai probe pada teknik ini. Label tersebut digunakan bersama dengan unlabel DNA genomik dari spesies lain sebagai agen penghalang. Sekuen kromosom yang umumnya untuk kedua spesies berkontribusi untuk menganalisis spesimen yang digabungkan dengan unlabel DNA menyebabkan label probe hanya untuk satu dari dua set kromosom.

Genom gandum yang aloploid secara luas dipelajari dengan GISH (gambar 4). Teknik memungkinkan kita untuk mengidentifikasi kromatin alien yang terintrogesi dari spesies yang berbeda sehingga baik digunakan untuk mempelajari perpasangan dan rekombinasi kromosom antara genom yang berbeda. Membedakan antara dua genom yang jauh lebih mudah dibandingkan dengan membedakan dua genom yang berasal dari genus yang sama. Oleh karenanya itu, agak sulit untuk mengidentifikasi tiga genom yang mirip pada gandum yang aloheksaploid.



Gambar 4. Hasil Analisa GISH pada Tanaman Gandum

Pendekatan baru dilakukan untuk mengatasi hal tersebut yaitu dengan melabel seluruh DNA genomik *Thinopyrum intermedium* dan *Triticum urartu* dengan digoxigenin-11-dUTP dan melabel seluruh DNA genomik *Aegilops tauschii* dengan biotin-16-dUTP dengan metode nick-translation. Teknik ini merupakan teknik yang cukup baik yang dapat digunakan untuk membedakan genom konstitutif dan variasi dalam alopoliplid pada berbagai jenis tanaman. Selain pada gandum, teknik GISH juga telah digunakan pada genom tanaman pisang (Harrison, et al., 1998) (Gambar 5).



Gambar 5. Hasil Analisa GISH pada Tanaman Pisang

## PENGUNAAN FISH DAN GISH

Penggunaan in situ hybridization mamalia sudah jauh lebih berkembang dibandingkan penggunaannya pada tanaman. Namun, sekarang teknik – teknik tersebut telah digunakan untuk penelitian pada tanaman, khususnya pada program pemuliaan tanaman. Pertama kali teknik ini digunakan pada tanaman gandum, namun sekarang teknik- teknik ini sudah berhasil digunakan pada berbagai tanaman, baik monokotil atau dikotil. Beberapa penggunaan teknik – teknik tersebut diantaranya adalah:

a. Pemetaan kromosom

FISH telah digunakan pada banyak tanaman untuk mengidentifikasi kromosom secara akurat dengan menggunakan sekuens spesifik antar spesies, ribosomal gen (rRNA), dan sekuens – sekuens DNA yang unik. FISH menggunakan fluorochrome memungkinkan untuk menggambarkan poliploidi yang satu famili, seperti 5S dan 18S-5,8S-26S rRNA untuk menentukan lokasi mereka di dalam kromosom. Lokasi fisik gen seperti 5S dan 18S-26S rRNA dalam kromosom sudah dilaporkan terdapat pada gandum (Mukai, Endo, and Gill, 1990), tomat, barley, bawang putih, dan lain – lain. Pada kapas, banyak copy gen dipetakan oleh kromosom pada saat meiosis. Baru – baru ini, FISH digunakan untuk memetakan ribosomal gen (rRNA), mikrosatellite, dan transposable DNA pada bit. FISH juga sudah digunakan untuk memetakan tandem sekuens berulang MR68 pada kromosom jagung dan juga digunakan untuk menentukan lokasi sekuens DNA berulang pada sub lengan kromosom pada *Bassica* sp. Hal ini memungkinkan kita untuk dapat mengidentifikasi dan memberikan informasi baru tentang struktur genom dan evolusinya.

b. Analisis Genom

GISH memungkinkan kita untuk melakukan karakterisasi genom atau kromosom tanaman hibrida, spesies aloploid, dan rekombinasi kromosom hasil persilangan, sehingga kita dapat menguraikan keturunan dari tanaman hibrida dan tanaman poliploid tersebut.

Multicolour FISH (mFISH) dengan memanfaatkan probe seluruh DNA genome memungkinkan pendekatan untuk membedakan setiap genom. mFISH menggunakan berbagai macam pewarna berpendar untuk mewarnai probe yang berbeda dalam satu waktu. Hal ini menjadikan teknik ini menjadi sangat baik untuk investigasi homologi genome antara spesies poliploid dan nenek moyangnya yang diploid. Teknik ini juga memungkinkan kita untuk dapat mengidentifikasi seluruh kromosom tertentu pada genom amphidiploid.

c. Hubungan filogenetik

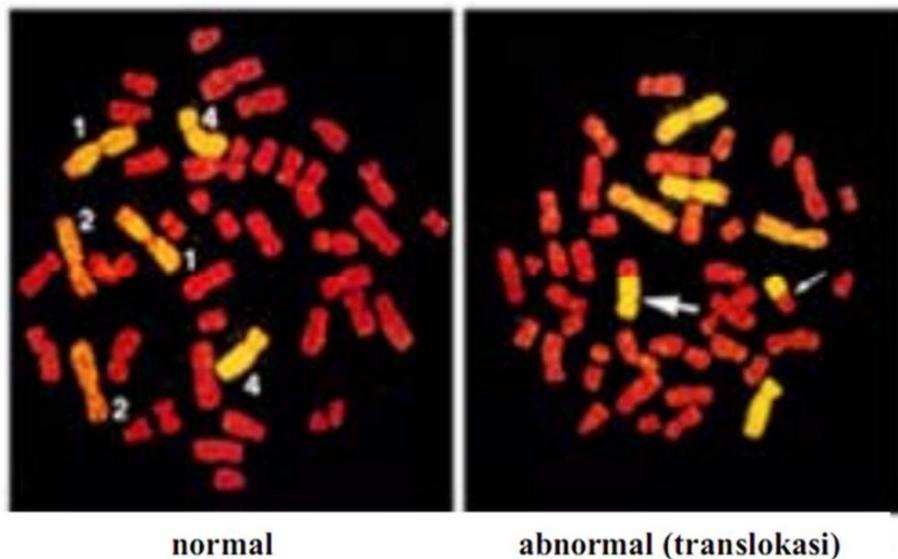
GISH sangat baik untuk digunakan dalam mempelajari filogenetika dan taksonomi. Hal ini karena GISH dapat membedakan dan mengetes hubungan genom dari tanaman liar dengan tanaman budidaya, sehingga kita bisa mendapatkan informasi yang menarik mengenai DNA diantara kedua spesies tersebut. GISH juga memberikan data mengenai distribusi fisik dari sekuens tersebut, baik yang seperti biasa atau berbeda antara spesies untuk probe dan spesies yang digunakan untuk mendukung probe DNA. Informasi – informasi tersebut dapat digunakan untuk mendukung dan memperbaiki berbagai teori mengenai filogenetika, hibridisasi, dan diversifikasi dari tanaman spesies. Selama pemuliaan tanaman masih meliputi rekonstitusi genom, maka informasi – informasi tersebut akan terus diperlukan.

d. Deteksi kromatin alien

FISH dan GISH dapat digunakan untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi kromosom alien, segmen kromosom, dan gen pada program pemuliaan tanaman. Metode tersebut dapat menggambarkan dan menghitung hal – hal tersebut pada hibrida liar dan amphidiploid tidak hanya pada saat metafase tetapi juga pada saat interfase. FISH telah digunakan untuk mengidentifikasi amphidiploid parsial yang berasal dari persilangan gandum dengan *Thinopyrum intermedium* dan *Lophopyrum elongatum* dengan ketahanan terhadap BYDV dan mosaik virus. GISH telah digunakan untuk mengkonfirmasi keberadaan substitusi alien monosomic pada kromosom H. *Bulbosum*

e. Deteksi Aberasi Kromosom (gambar 6)

In situ hybridization memfasilitasi kita untuk dapat mendiagnosis dan mengidentifikasi kerusakan kromosom pada manusia dan hewan. Teknik memungkinkan kita untuk mengidentifikasi kerusakan kecil pada kromosom yang tidak dapat terdeteksi oleh teknik banding yang biasa. FISH dapat dengan akurat mengidentifikasi hampir semua trisomik pada autosom dan kromosom sex abnormal pada manusia, sedangkan GISH telah digunakan untuk mendeteksi translokasi kromosom akibat fusi antara *Nicotiana glauca* dan protoplas *Petunia hybrida* hasil iradiasi sinar gamma.



Gambar 6. Hasil Analisa In Situ Hybridization pada Translokasi Kromosom

f. Menentukan kromosom spesifik pada tanaman

Dasar penentuan kariotipe adalah ukuran kromosom, indeks sentromer, bentuk banding. Namun, dasar – dasar tersebut kurang dapat digunakan untuk kromosom yang memiliki morfologi yang mirip. FISH atau PRINS (primed in situ labelling) dapat menjadi solusi permasalahan tersebut. FISH telah digunakan untuk menganalisis struktur dari kromosom B pada gandum, sedangkan GISH telah digunakan menggambarkan lebih baik kemiripan antara kromosom A dan B pada gandum.

Teknik – teknik tersebut sudah sangat membantu untuk secara simultan memetakan berbagai DNA sekuens yang berbeda dan alokasi gen pada genom. Metode probe genom melengkapi berbagai metode analisis genom yang sudah ada, memberikan data novel genom dan hubungan diantaranya, termasuk identifikasi terhadap tetua atau nenek moyang dari persilangan yang tidak diketahui atau pada berbagai spesies poliploid, informasi mengenai wilayah genomik pada berbagai spesies yang berbeda, dan memungkinkan identifikasi yang lebih jelas mengenai parpasangan saat meiosis dan translokasi diantara genom dalam poliploid dan hibrida. Penggunaan FISH pada variasi somaklonal sangat membantu dalam mengidentifikasi dan mengerti perubahan kromosom selama proses kultur jaringan

Namun, masih terdapat keterbatasan pada teknik – teknik ini. mFISH hanya dapat digunakan dengan baik apabila setidaknya diketahui nenek moyang spesiesnya. Selain itu, mFISH juga kurang sensitif dan menggambarkan tingkatan resolusi yang lebih rendah dibandingkan FISH. Genom yang memiliki hubungan yang dekat dalam alopoliploidi tidak dapat teridentifikasi dengan baik dengan metode GISH

## DAFTAR PUSTAKA

- McFadden, G. I. 1995. In situ hybridization. *Methods in Cell Biology*. 49:165-184.
- Devi, J., J. M. Ko, B. B. Seo. 2005. FISH and GISH: Modern cytogenetic techniques. *Indian Journal of Biotechnology*. 4:307-315.
- Kato, A., J. M. Vega, F. Han, J. C. Lamb, and J. A. Birchler. 2005. Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. *Current Opinion in Plant Biology*. 8:148-154.
- Moter, A. And U. B. Gobel. 2000. Invited review fluorescent in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. 41:85-112
- Lusiyanti Y., I. Indrawati, dan S. Purnami. 2006. Pengenalan teknik FISH untuk deteksi aberasi kromosom translokasi akibat radiasi pengion. *Buletin Alaura*. 8 (2) : 53 – 63.
- Jiang, J. and B. S. Gill. 2006. Current status and the future of hybridization (FISH) in plant genome research. *GENOME*. 49:1057-1068.
- Mukai Y., T. R. Endo, and B. S. Gill. 1990. Physical mapping of the 5S rRNA multigene family in common wheat. *The Journal of Heredity*. 81(4):290-295
- Harisson, P. H., J. Osuji, R. Hull, G. Harper, A. D'hont, and F. Carreel. 1998. Fluorescent in situ fluorescence in situ hybridization of plant chromosomes: illuminating the Musa genome. *INIBAP Annual Report*. Montpellier. P.26 – 29.