

## Kloning gen *LEAFY* kakao dari jaringan bantalan bunga aktif

*Cloning of cacao LEAFY gene from the active flower cushions*

Tetty CHAIDAMSARI<sup>1+)</sup> Rita HAYATI<sup>2+)</sup> Auzar SYARIEF<sup>2)</sup>,  
Aswaldi ANWAR<sup>2)</sup>, Djoko SANTOSO<sup>1\*)</sup>

<sup>1)</sup> Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Bogor 16151, Indonesia

<sup>2)</sup> Fakultas Pertanian Universitas Andalas, Padang 25163, Indonesia

### Summary

Attempts to improve productivity of cacao plantations lead us to study the molecular mechanism of flowering. In the model species *Arabidopsis thaliana* as well as some other species, *LEAFY* is a central regulatory gene for the transition of shoot apical meristems to flowering meristems. Different from that of *Arabidopsis*, cacao inflorescence is a cauliflorous type, by which flowers can develop repeatedly from the same flower cushion on the trunk. In this research, a *LEAFY* homolog was isolated from active flower cushion with RT-PCR using a pair of DNA primer specifically designed to isolate its complete cds. Gel electrophoresis examination indicated the presence of a 1.2 kb amplicon. Purified from the gel, this DNA fragment was cloned into competent cells of *E. coli* XL1 Blue using pGEM-T Easy cloning vector at an orientation according to the T7 promoter of the plasmid. Sequence analysis using BLASTX, showed that the amplicon was *LEAFY* (*LFY*) homolog. Alignment analysis using Clustal W indicated that the *cTcLFY* highly homologous to those from other perennial crops such as citrus, grape, apple and poplar. The highest homology (conserved region) was found in the C terminal of the encoded proteins.

[Key words: *cTcLFY*, *Theobroma cacao* L., flowering gene].

\*) Penulis korespondensi,

+ ) Penulis berkontribusi sepadan

### Ringkasan

Usaha untuk meningkatkan produktivitas perkebunan kakao telah mendorong penelitian molekuler tentang mekanisme pembungaan kakao. Pada tanaman model *Arabidopsis thaliana* dan lainnya, *LEAFY* merupakan gen kunci dalam transisi meristem tunas jadi meristem bunga. Berbeda dengan sistem pada *Arabidopsis*, pembungaan kakao termasuk tipe cauliflorous, bunga dapat muncul dari bantalan bunga yang sama sepanjang tahun. Dalam penelitian ini homolog *LFY* diisolasi dari bantalan bunga aktif menggunakan RT-PCR dengan sepasang primer spesifik yang dirancang berdasarkan sekuen DNA di kedua ujung gen tersebut. Pemeriksaan gel elektroforesis menunjukkan adanya amplicon tunggal berukuran 1,2 kb. Setelah dimurnikan dari gel, amplicon dapat diklon ke dalam sel kompeten *E. coli* galur XL1 Blue menggunakan vektor pGEM-T Easy dengan orientasi yang sesuai dengan promoter T7 dari vektor. Analisis BLASTX sekuen DNA membuktikan bahwa amplicon tersebut adalah homolog dari gen *LEAFY*. Analisis penjajaran dengan menggunakan ClustalW menunjukkan bahwa gen *cTcLFY* tersebut memiliki homologi yang tinggi dengan gen sejenis dari tanaman keras lainnya seperti tanaman jeruk, anggur, apel dan poplar. Homologi tertinggi (*daerah terkonservasi*) terdapat pada ujung (terminal) C dari protein yang disandinya.

## Pendahuluan

Perkebunan kakao memiliki peranan ekonomi dan sosial yang cukup penting bagi Indonesia, dan merupakan salah satu komoditas perkebunan yang direvitalisasi. Pekebun kecil mendominasi kepemilikan dan pengelolaannya, mencapai 80% dari total areal 776.900 Ha. Namun demikian produktivitasnya relatif masih rendah. Produktivitas rata-rata per tahun dari kebun kakao Indonesia hanya sekitar 0,6 ton biji kering per hektar (Indonesia, Direktorat Jenderal Perkebunan, 2002). Angka ini setara dengan empat hingga lima kali lebih rendah daripada potensinya, yang mencapai lebih dari 3 ton biji kering per hektar per tahun (Duke, 1983).

Produktivitas tanaman kakao bervariasi dan dipengaruhi oleh genotipe bibit dan faktor lingkungan termasuk teknik budidayanya. Produksi akhir berkorelasi positif dengan jumlah atau densitas buah matang yang dipanen per hektar per jumlah biji per buah serta ukuran bijinya (Abdullah *et al.*, 1986). Densitas buah kakao dapat dikendalikan melalui tiga tahapan perkembangan reproduktif, yaitu pembungaan, pembuahan dan pendewasaan buah. Tanaman kakao dapat menghasilkan bunga sepanjang tahun dengan puncaknya terjadi pada musim hujan. Di pulau Jawa, pembungaan mulai terjadi di bulan Nopember (awal musim hujan) dan mencapai puncaknya antara bulan Desember hingga bulan Januari pada tahun berikutnya (Tjasadhardja, 1987).

Tanaman kakao memiliki tipe bunga cauliflorous. Bunga dapat terjadi secara konsisten dari bantalan bunga pada batang dan cabang pohon kakao. Bantalan ini berkembang dari ketiak daun (*leaf axils*). Bunga yang muncul dari kuntum yang kecil biasanya mengalami aborsi (Lent, 1966).

Bunga yang tidak terpolinasi saat pembukaannya juga akan teraborsi dalam waktu 24 jam (McKelvie, 1956). Sebatang pohon kakao dewasa yang sehat dapat menghasilkan lebih dari 10.000 bunga per tahun. Sekitar 10% dari bunga tersebut terpolinasi, dan 20% dapat menjadi buah dan berkembang (Wood, 1972). Pada kebanyakan perkebunan kakao di Indonesia, jumlah buah yang terpanen jauh lebih rendah. Menurut Iswanto *et al.* (1999), densitas buah bervariasi antara 33 hingga 40 per pohon kakao.

Perbaikan perkembangan reproduktif kakao diarahkan untuk tujuan meningkatkan produktivitas kebun. Usaha ini diawali dengan mempelajari mekanisme molekuler dari pembungaan kakao. Gen *LFY* menjadi gen yang utama karena peranannya dalam proses pembungaan. Pada *Arabidopsis*, *LFY* dan *API* menginduksi transisi dari pertumbuhan vegetatif menjadi bunga. Peranan *LFY* secara mutualistik diperkuat oleh ekspresi gen *API* (Liljegren *et al.*, 1999). Determinasi dari fenotipe pembungaan oleh *LFY* telah dibuktikan secara *in vitro*. Ekspresi ectopik *LFY* dalam kultur sel *in vitro* dilaporkan dapat menginduksi pembungaan (Wagner *et al.*, 2004). Tulisan ini melaporkan hasil penelitian kloning dan karakterisasi dari *cTcLFY* dari jaringan bantalan bunga aktif kakao.

## Bahan dan Metode

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan tanaman dan bahan kimia. Bahan tanaman yang digunakan adalah jaringan bantalan bunga aktif dari tanaman kakao lindak. Bahan kimia terdiri dari Nitrogen cair N<sub>2</sub> cair, Kloroform

### *Kloning gen LEAFY kakao dari jaringan bantalan bunga aktif*

Isoamilalkohol, Etanol absolut, NaOH, NaCl, PVP,  $\beta$ -merkaptotanol kualitas p.a. diperoleh dari Merck atau Sigma melalui rekanan lokal. Bahan kimia kualitas biologi molekuler seperti DEPC-treated water, Natrium asetat, Lithium Chloride, Phenol, CTAB, EDTA, dan Tris-HCl dibeli dari Sigma. Untuk Sintesis *First-Strand* DNA menggunakan kit *SuperScript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase* (Invitrogen).

#### *Perancangan primer*

Primer dirancang dengan program Primer tiga yang tersedia pada situs web <http://frodo.mit.edu/>. Sekuen gen LFY tanaman yang digunakan untuk merancang primer diantaranya yaitu *Citrus sinensis*, *Vitis vinifera*, dan *Arabidopsis thaliana*. Hasil perancangan tersebut berupa urutan oligonukelotida dengan beberapa data yang penting untuk diketahui dalam pelaksanaan proses PCR, seperti;  $T_m$  (*melting temperature*), jumlah basa, kandungan GC, dan yang lainnya.

#### *Isolasi RNA total*

RNA total diisolasi dari bantalan bunga aktif kakao menggunakan prosedur yang diuraikan oleh Chaidamsari *et al.*, (2006) dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 1 gram jaringan dihaluskan dengan nitrogen cair dan dihomogenkan dengan bufer ekstraksi (EDTA 20 mM pH 8,0; CTAB 2%, NaCl 2 M, Tris HCl 100 mM pH 8,0; PVP) dan 1%  $\beta$ -merkaptotanol pada suhu 65°C selama satu jam dan pengocokan setiap 15 menit. Setelah satu jam tabung didinginkan pada suhu kamar, kemudian diekstraksi dengan kloroform:isoamilalkohol (24:1) dengan volume yang sama dan dikocok

hingga kedua lapisan membentuk emulsi. Campuran ekstraksi tersebut kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 20.000 xg selama 15 menit pada suhu ruang. Supernatan diekstraksi kembali dengan 1 volume berturut-turut dengan campuran campuran fenol:kloroform:isoamilalkohol (25:24:1), kloroform:isoamilalkohol (24:1), dan disentrifugasi pada kondisi yang sama dengan sebelumnya. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan 10 M LiCl hingga konsentrasi 3 M, dan kemudian diinkubasi pada suhu 4°C *over night*. Endapan RNA yang sudah dimalamkan selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 20.000 x g selama 30 menit pada 4°C. Pelet yang dihasilkan dilarutkan dengan 500  $\mu$ L DEPC-treated water. Selanjutnya diekstraksi kembali dengan fenol, campuran fenol:kloroform: isoamil-alkohol, dan kloroform: isoamil-alkohol masing-masing sebanyak 1 volume, disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 x g selama 15 menit pada suhu 4 °C. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikro baru, dan ditambahkan tiga kali volume etanol absolut dan 0,1 volume Na-asetat 3 M pH 5,8. Setelah diendapkan selama tiga jam pada suhu -70 °C, selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 15.000 x g selama 30 menit pada suhu 4°C. RNA dicuci dengan 70% etanol dingin, dikeringkan dengan *speed vac* dan dilarutkan dengan 30  $\mu$ L DEPC-treated water.

#### *RT-PCR*

Sintesis cDNA utas pertama dilakukan menggunakan kit *SuperScript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase* (Invitrogen). Proses pemanasan dan inkubasi dilakukan dengan mesin PCR (Biometra T-personal). Sintesis

first strand menggunakan 2 µg RNA total bantalan bunga aktif. Prosedur yang digunakan sesuai dengan yang di manual *SuperScript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase* (Invitrogen). Setelah diinkubasikan pada suhu 42 °C selama 50 menit, reaksi dinonaktifkan dengan pemanasan 70°C selama 15 menit, selanjutnya ditambahkan 1 µL RNase H dan diinkubasi pada 37°C selama 20 menit. Setelah itu cDNA utas pertama yang terbentuk selanjutnya digunakan sebagai *template* untuk amplifikasi fragmen gen *LFY*, menggunakan primer spesifik *LFY*.

Sebanyak 1 µL *template* dari bantalan aktif bunga kakao diamplifikasi dengan primer spesifik yang dirancang untuk gen *LFY*. Sampel diamplifikasi menggunakan mesin PCR Biometra T-personal dengan program sebagai berikut: *initial* denaturasi pada suhu 94 °C, lima menit dilanjutkan denaturasi pada suhu 94 °C selama 45 detik, *annealing* 50 °C selama 45 detik, ekstensi 72 °C selama lima menit. Hasil amplifikasi diverifikasi pada gel agarose 1% menggunakan *Axyprep DNA gel extraction kit* (Axygen). Pita DNA yang ukurannya sesuai dengan yang diharapkan selanjutnya diekstraksi dari gel. Hasil ekstraksi selanjutnya diligasi pada vektor kloning dalam hal ini *pGEM-T Easy*.

#### *Kloning fragmen DNA amplikon dengan pGEM-T Easy*

Hasil ligasi menggunakan enzim T4 DNA ligase tersebut, ditransformasikan ke dalam kompeten *E. coli* XL1 *Blue*. Sel yang telah ditransformasi kemudian disebarkan (*plated*) di atas medium padat LB agar yang mengandung ampisilin sebagai marker seleksi dan diinkubasi semalam.

Koloni yang terbentuk adalah sel *E. coli* yang berhasil ditransformasi. Sel yang tidak berhasil ditransformasi akan mati akibat perlakuan ampisilin. Dua jenis koloni akan terbentuk pada cawan Petri. Koloni yang berwarna putih menunjukkan sel yang mengandung plasmid yang berhasil disisipi. Koloni yang berwarna biru mengandung plasmid yang tidak berhasil disisipi. Koloni putih kemudian diamplifikasi dengan primer universal yaitu M13 Forward dan M13 Reverse dengan kondisi PCR sebagai berikut *initial* denaturasi pada suhu 94°C, tiga menit dilanjutkan dengan denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* 55°C selama satu menit, ekstensi 72 °C selama dua menit. Hasil reaksi PCR ini diperiksa pada gel agarosa.

#### *Sekuensing dan analisis DNA*

Untuk keperluan sekuensing, koloni yang positif mengandung plasmid tersisipi, selanjutnya dikulturkan dalam medium LB yang mengandung ampisilin selama semalam pada suhu 37°C dengan pengocokan 150 rpm. DNA plasmid yang diperoleh selanjutnya disekuensi di lembaga Charoen-Pokphand Jakarta. DNA disekuensi menggunakan primer M13-Forward dan M13-Reverse. Sekuen DNA yang diperoleh dianalisis identitasnya dengan program bioinformatika *online Blast*

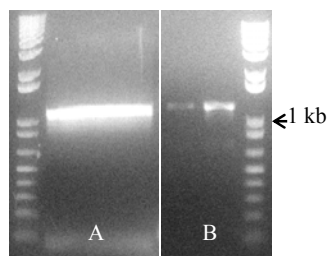
### **Hasil dan Pembahasan**

#### *Isolasi dan kloning*

Isolasi klon cDNA dari RNA total jaringan bantalan bunga aktif tanaman kakao dilakukan dengan pendekatan RT-PCR. Hasil amplifikasi cDNA utas tunggal

menggunakan primer spesifik memberikan pita DNA tunggal yang kuat dengan ukuran sekitar 1,2 kb (Gambar 1 panel kiri). Pemeriksaan kembali dari amplikon yang telah dimurnikan dari gel agarosa memberikan amplikon murni dengan ukuran yang konsisten 1,2 kb (Gambar 1 panel kanan). Ukuran ini mirip dengan cds dari gen-gen yang berfungsi sejenis dari spesies tanaman lainnya. Sebagai contoh adalah 1,179 kb pada *FLORICAULA/LEAFY*-like protein 3 dari *Buddleja davidii* (Adkins *et al.*, 2005); 1,250 kb pada *LEAFY/FLORICAULA* dari *Solanum tuberosum* (Guo *et al.*, 2006); 1,194 kb pada *LEAFY* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) dari *Citrus sinensis* (Pillitteri *et al.*, 2004).

Dibandingkan dengan ukuran klon genomiknya, ukuran klon cDNA ini (1,2 kb) lebih kecil sekitar setengah dari ukuran *gTcLFYg* yaitu 2,5 kb (Santoso *et al.*, 2004). Di dalam *gTcLFY* tersebut terdapat empat intron yang ukurannya bervariasi dan menyisipinya di beberapa tempat yang berbeda diantara lima ekson. Di dalam sel-sel eukariot adanya intron di dalam genomnya merupakan karakteristik yang membedakan-



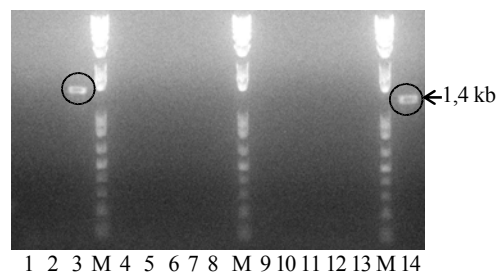
Gambar 1. RT-PCR dengan primer spesifik *LFY*. A & B elektroforesis gel preparatif, dan DNA yang dimurnikan dari gel preparatif.

Figure 1. RT-PCR with *LFY* specific primer. A & B are preparative gel electrophoresis and DNA purified from the gel.

nya dari prokariot. Pada proses ekspresi gen, sebelum ditranslasikan menjadi protein, intron-intron tersebut dihilangkan (*splicing*) dari mRNANYa.

Koloni yang tumbuh pada media seleksi diduga kuat membawa konstruk gen target. Untuk menguji adanya gen ini dilakukan PCR koloni menggunakan universal primer M13. Hasil pengujian ini ditampilkan pada Gambar 2. Data elektroforesis tersebut membuktikan bahwa proses ligasi, transformasi dan seleksi telah berhasil. Hal ini ditunjukkan dengan adanya pita DNA yang ukurannya sekitar 1,4 kb (lihat lajur 3 dan 14). Namun demikian efisiensi proses tersebut tergolong rendah karena dari 14 sampel yang ditampilkan, hanya dua yang positif. Ada berbagai faktor yang dapat menyebabkan rendahnya efisiensi proses. Meskipun demikian hal ini untuk tujuan penelitian ini bukanlah masalah karena sudah ada yang diduga kuat positif.

Ukuran pita DNA dari PCR koloni ini sedikit lebih besar daripada amplikon sebenarnya. Hal ini karena primer yang digunakan dalam RT-PCR ini adalah primer universal M13 forward dan M13 reverse.



Gambar 2. PCR koloni dengan primer universal M13 (1-14). Lingkaran adalah DNA dari koloni Positif.

Figure 2. Colony PCR using M13 universal primers (1-14). Circled bands are from positive Colonies.

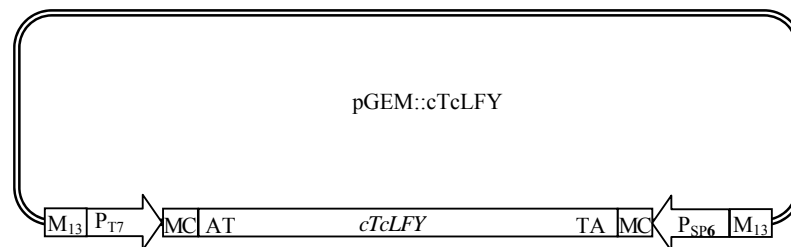
Posisi kedua primer tersebut pada pGEM-T terletak masing-masing kurang lebih 100 bp dari MCS ke arah yang berlawanan. Dengan demikian tambahan nukleotida yang teramplifikasi dengan primer universal tersebut sekitar 200 bp. Koloni yang diduga kuat positif dan terkonfirmasi membawa DNA sisipan teramplifikasi yang berukuran sesuai, kemudian DNA plasmid diisolasi dan dimurnikan dari klon yang positif untuk karakterisasi lebih lanjut.

#### Karakterisasi dan identifikasi gen *cTcLFY*

Salah satu karakteristik yang ingin diketahui adalah orientasi dari *cTcLFY* putatif pada peta plasmid rekombinan yang diperoleh. Karakterisasi dilakukan dengan menganalisis hasil sekuensing, yaitu posisi relatif antara sekuen DNA sisipan terhadap sekuen kontaminan dari vektor kloning. Hasil analisis untuk karakteritik tersebut ditampilkan pada Gambar 3. Hasil ini menunjukkan bahwa kodon permulaan ATG (*start codon*) teletak dekat dengan ujung promoter T7 yang berarti jauh dari promoter SP6. Dengan demikian sebaliknya adalah kodon akhir TAA (stop kodon) jauh dari ujung promoter T7 yang berarti dekat

dengan ujung promoter SP6. Orientasi ini diperlukan antara lain untuk mempermudah atau memastikan proses modifikasinya misalnya ketika ingin diuji fungsi dari gen interes tersebut melalui proses transformasi.

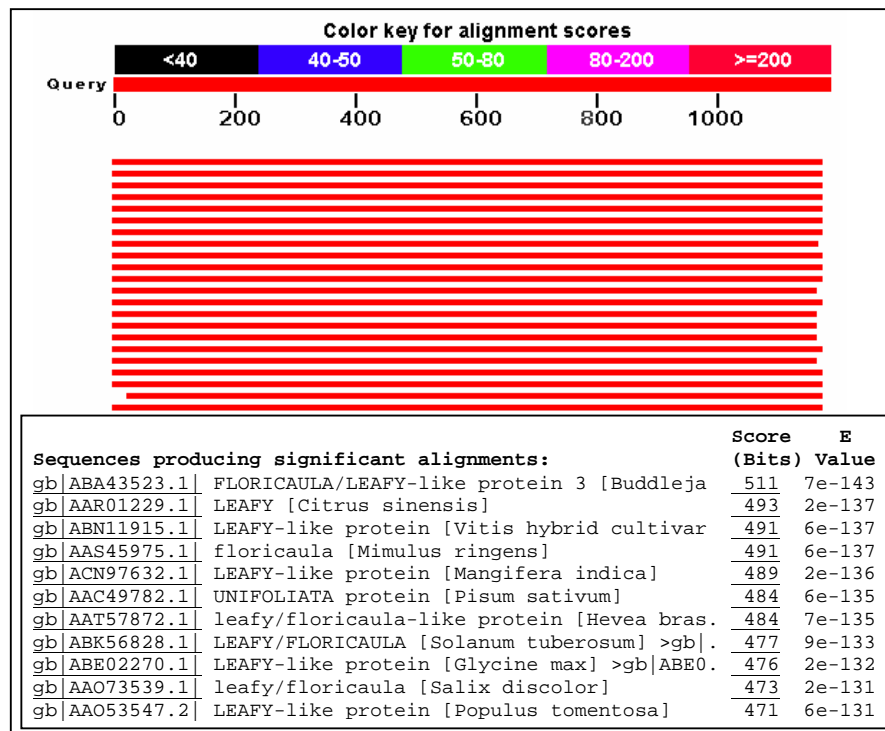
Untuk memastikan identitas sekuen DNA yang diperoleh, dilakukan analisis BlastX. Analisis penjajaran ini membandingkan antara sekuen asam amino tertranslasi dari klon cDNA tersebut dengan seluruh sekuen asam amino yang ada di GenBank. Hasil analisis penjajaran ini ditampilkan pada Gambar 4. Berdasarkan warna kunci nilai penjajaran menunjukkan bahwa sekuen asam amino dari sekuen entri memiliki tingkat homologi tinggi dengan sekuen asam amino yang ada di GenBank, yaitu ditunjukkan dengan adanya warna merah yang dominan (nilai tertinggi,  $\geq 200$ ). Demikian juga kalau dilihat *score bits* dan *E Value*-nya. Dengan tanaman tahunan jeruk (*Citrus sinensis*) dan poplar (*Populus tomentosa*) masing-masing *E-Value* nya mencapai  $2e-137$  dan  $6e-131$ . Nilai ini jelas menunjukan tingkat homologi yang tinggi. Secara teoritis analisis semacam ini apabila memberikan kisaran skor  $\geq 50$  bits dengan *E-value*  $\geq e-04$  menunjukkan tingkat kemiripan yang cukup tinggi (Claveri *et al.*, 2003; Jaya *et al.*, 2001). Dengan demikian



Gambar 3. Orientasi gen *cTcLFY* dalam plasmid rekombinan pGEM:: *cTcLFY* sesuai dengan promoter T7.

Figure 3. The orientation of *cTcLFY* in the recombinant plasmid of pGEM:: *cTcLFY* is under T7 promoter.

Kloning gen *LEAFY* kakao dari jaringan bantalan bunga aktif



Gambar 4. Hasil analisis Blast X dari sekuen asam amino (*deduced sequence*) dari klon putatif *cTcLFY* dari bantalan bua aktif tanaman kakao.

Figure 4. Blast X analysis of the deduced amino acid sequence of the putative *cTcLFY* of the cacao active Cushion.

dari analisis ini, dapat disimpulkan bahwa identitas amplikon yang diperoleh dari transkrip kakao tersebut adalah homolog gen *LEAFY*, atau *cTcLFY*.

Analisis tingkat homologi sekuen asam amino *cTcLFY* dengan spesies tanaman berkayu yang relatif terdekat hubungannya (berdasarkan nilai E dari hasil analisis penjajaran tersebut di atas), dilakukan dengan program penjajaran *online* Clustal W

(www.ebi.ac.uk). Spesies pembanding tersebut adalah tanaman anggur (*VvLFY*), apel (*MxdLFY*), poplar (*PtLFY*), dan jeruk (*CsLFY*). Hasil analisis ditampilkan pada Gambar 5. Dari penjajaran ini terlihat daerah yang memiliki homologi tinggi pada daerah terminal C, yaitu antara residu asam amino nomor 257 hingga 394. Pada daerah lainnya (terutama) pada daerah ujung N, memiliki tingkat homologi yang relatif rendah. Pola

konservasi semacam ini juga dijumpai pada tingkat klon DNA genomik yang dilaporkan sebelumnya (Santoso *et al.*, 2004).

Gen *LEAFY* atau *LFY* dikenal sebagai pengendali utama (*switch on*) kompetensi pembungaan tanaman (Putterill *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 2004). Pada beberapa tanaman keras (berkayu) dilaporkan

memiliki dua jenis gen *LFY* (Wada *et al.*, 2002; Santoso *et al.*, 2004). Pada tanaman apel *AFL1* hanya diekspresikan pada kuncup bunga sedangkan *AFL2* diekspresikan baik di kuncup bunga maupun pada jaringan vegetatif. Meskipun dilaporkan ada lebih dari satu gen *LFY* pada kakao, spesifikasi spasial ekspresi gen *LFY* kakao



Gambar 5. Analisis kekerabatan genetik *cTcLFY* dengan ortolognya dari spesies tanaman jeruk (*CsLFY*), poplar (*PtLFY*), apel (*MxdLFY*), dan anggur (*VvLFY*).

Figure 5. Genetic analysis of *cTcLFY* compared to its orthologues of plant species of citrus (*CsLFY*), poplar (*PtLFY*), apple (*MxdLFY*), and grapevine (*VvLFY*).



belum diketahui. Namun demikian, karena diisolasi dari jaringan bantalan bunga aktif, diduga kuat *TcLFY* yang didapat dari penelitian ini memiliki spesifisitas yang dominan pada jaringan reproduktif tersebut. Untuk memastikan hal ini perlu dilakukan pengujian lebih lanjut.

Analisis penjabaran sekuen asam amino dari *cTcLFY* (*deduced sequence*) ini juga dilakukan terhadap sekuen asam amino (*deduced sequence*) dari klon genomik yang diperoleh sebelumnya (Santoso *et al.*, 2004). Hasil penjabaran dengan program *Align two sequences using BLAST(bl2seq)* dari <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, menunjukkan bahwa kedua sekuen tersebut memiliki tingkat homologi sekitar 91% (data tidak ditunjukkan). Hasil ini memberikan indikasi yang kuat bahwa kedua gen *TcLFY* tersebut berasal dari lokus yang berbeda, dan sangat mungkin memiliki fungsi atau paling tidak karakteristik yang berbeda pula. Fenomena yang serupa juga dilaporkan terdapat pada tanaman keras apel (Wada *et al.*, 2002). Implikasi lainnya dari karakteristik ini adalah bahwa gen *cTcLFY* tersebut diekspresikan spesifik pada jaringan meristematis pembungaan (bantalan bunga aktif) yang sangat mungkin berarti bahwa transkripnya tersebut merupakan *switch on* pada proses pembungaan kakao.

### Kesimpulan

Dengan teknik RT-PCR menggunakan sepasang primer spesifik telah berhasil diisolasi homolog gen *LEAFY* dari bantalan bunga aktif kakao. Kloning menggunakan vektor pGEM-T Easy menghasilkan plasmid rekombinan yang membawa *cTcLFY* dengan orientasi yang sesuai dengan promoter T7 pada vektor pGEM. Analisis sekuen DNA

membuktikan identitas amplikon sebagai *cTcLFY* yang memiliki homologi yang relatif sangat tinggi (*conserved region*) di daerah terminal C dari proteinnya.

### Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dibiayai DIKTI melalui program SINTA Badan Litbang Pertanian dengan Nomor dan Tanggal Naskah Perjanjian: 1891.2/LB.620/I.1/5/2009 & Tanggal 7 Mei 2009.

### Daftar Pustaka

- Abdullah, I., S. Subali & A.B. Saad (1986). Performance of control pollinated Brazilian progenies under Hilir Perak conditions. In: E. Pushparajah & C.P. Soon (eds). *Cocoa and Coconuts: Progress and Outlook*. Kuala Lumpur, Incorporated Society of Planters.
- Adkins, J.A., J.D. Williamson & D.J. Werner (2005). Cloning and expression analysis of FLORICAULA/LEAFY homologs in *Buddleja davidii* (Unpublished). Submitted (SEP-2005) to the EMBL/GenBank/DBJ databases <http://www.uniprot.org/uniprot/Q3HTH6>
- Chaidamsari, T., Samanhudi, H. Sugiarti, D. Santoso, G.C. Angenent & R.A. de Maagd (2006). Isolation and characterization of an *AGAMOUS* homologue from cocoa. *Plant Sci.*, **170**, 968-975.
- Claveri, J. M. & C. Notredame (2003). *Bioinformatics for Dummies*. 2<sup>nd</sup> ed. New York. Wiley Publishing Inc., p. 215-238.
- Duke, J.A. (1983). *Theobroma cacao* L. *Sterculiaceae: Chocolate, Cacao, Cocoa. Handbook Of Energy Crops*. Unpublished, Last up date January 9, 1998 [http://www.horturdue.edu/newcrop/nexus/Theobroma\\_cacao\\_nex.html](http://www.horturdue.edu/newcrop/nexus/Theobroma_cacao_nex.html)

- Guo, J., Y. Zhang & Q. Yang (2006). Direct Submission (Unpublished). [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=protein&dopt=GenPept&RID=9BM9D7FG01N&log%24=protop&blast\\_rank=29&list\\_uids=117671283](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=protein&dopt=GenPept&RID=9BM9D7FG01N&log%24=protop&blast_rank=29&list_uids=117671283)
- Indonesia, Direktorat Jenderal Perkebunan (2002). *Statistical Estate Crops of Indonesia 2000 – 2002: Cacao*. Jakarta, Ministry of Agriculture. p.34
- Iswanto, A., H. Winarno & D. Suhendi (1999). Kajian stabilitas hasil dan komponen buah beberapa hibrida kakao. *Pelita Perkebunan*, **15** (2), 81-90.
- Jaya, A.M.S., H. Aswidinnoor & D. Santoso (2004). Deteksi dan analisis sekuen gen inhibitor proteinase pada beberapa klon kakao harapan tahan PBK dari Sulawesi Selatan. *Menara Perkebunan*, **72**, (1), 1-10.
- McKelvie, A. D. (1956). Cherrille wilt of cacao. I. Pod development and its relation to wilt. *J. Exp. Bot.*, **7**, 252-263.
- Lent, R. (1966). The origin of the cauliflorous inflorescence of *Theobroma cacao*. *Turrialba*, **16**, 352-356.
- Liljegren, S. J., C. Gustafson-Brown, A. Pinyopich, G. S. Ditta & M. F. Yanofsky (1999). Interactions among APETALA1, LEAFY, and TERMINAL FLOWER1 specify meristem fate. *The Plant Cell*, **11**, 1007-1018.
- Pillitteri, L. J., I. L. Walling & C. J. Lovatt (2004). Characterization of CsLFY and CsAPI, homologs of LEAFY and APETALA1, from 'Washington' navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) (Unpublished). Submitted (JUL-2003) to the EMBL/GenBank/ DDBJ databases <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6EEV9>
- Putterill, J., R. Laurie & R. Macknight (2004). It's time to flower: the genetic control of flowering time. *BioEssays*, **26**,1-11.
- Santoso, D., Samanhudi, T. Chaidamsary, R. A. de Maagd & G. Angenent (2004). Study on flowering induction in cacao: Identification of the LEAFY homolog in cacao. In: *The 3<sup>rd</sup> Indonesian Biotechnology Conf.*, Sanur-Bali, Dec 1-3<sup>rd</sup> 2004.
- Santoso, D., A.A. Handayani, S. Moeljopawiro. (2007). Identifikasi dan isolasi promoter gen pembungaan kakao *TcLFY*. *Menara Perkebunan*, **75** (1),13-21.
- Tjasadihardja, A. (1987). Hubungan antara pertumbuhan pucuk, perkembangan buah serta tingkat kandungan asam indol asetat di dalam biji dan layu pentil kakao. *Desertasi*, IPB, 124p.
- Wada, M., Qie-fen Cao, N. Kotoda, Jun-ichi Soejima & T. Masuda (2002). Apple has two orthologues of *FLORICAULA/LEAFY* involved in flowering. *Plant Mol. Biol.*, **49**, 567-577
- Wagner, D., F. Wellmer, K. Dilks, D. William, M.R. Smith, P.P. Kumar, J.L. Riechmann, A.J. Greeland & E.M. Meyerowitz (2004). Floral induction in tissue culture: a system for the analysis of LEAFY-dependent gene regulation. *The Plant J.*, **39**, 273-282.
- Wood, G.A.R. (1972). *Cacao* Third Ed. Longman, Tropical Agricultural Series