

Studi Komparatif *Gene Flowering In Cocoa* Melalui Bioinformatik

Sulistiyani Pancaningtyas¹⁾, Nur Afni Helia Dewi¹⁾, Aufy Nuraini Putri²⁾, dan Ilham Mujahidin³⁾

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

²⁾Universitas Brawijaya, Jl. Veteran No.10-11, Ketawanggede, Kec. Lowokwaru, Kota Malang, Jawa Timur 65145

³⁾Universitas Negeri Jember, Jl. Kalimantan, Tegalboto, No. 37, Jember, 68121

Produktivitas tanaman kakao yang rendah, salah satunya dipengaruhi oleh pembungaan yang tidak konsisten. Pembungaan pada tanaman kakao umumnya terjadi saat peralihan antara musim kemarau ke musim hujan. Untuk mengatasi masalah pembungaan perlu dilakukan upaya pengaturan pembungaan dengan mengaplikasikan zat pengatur tumbuh. Selain dipengaruhi faktor lingkungan, proses pembungaan juga dikendalikan oleh gen-gen pembungaan. Dengan kemajuan biologi molekuler, proses fisiologi pembungaan pada tanaman kakao dapat digambarkan dengan lebih baik, sehingga dapat menjadi solusi dalam mengatasi rendahnya produktivitas.

Pembungaan merupakan tahapan yang dimulai dari fase inisiasi dengan terbentuknya tunas bunga sampai bunga mekar. Proses pembungaan dipengaruhi oleh faktor internal dan lingkungan. Faktor internal dapat dipengaruhi oleh genetik dan fitohormon. Faktor lingkungan pada proses pembungaan pada tanaman dipengaruhi oleh tiga faktor yaitu fotoperiode, fitokrom, dan ritme/jam biologi tumbuhan¹⁾.

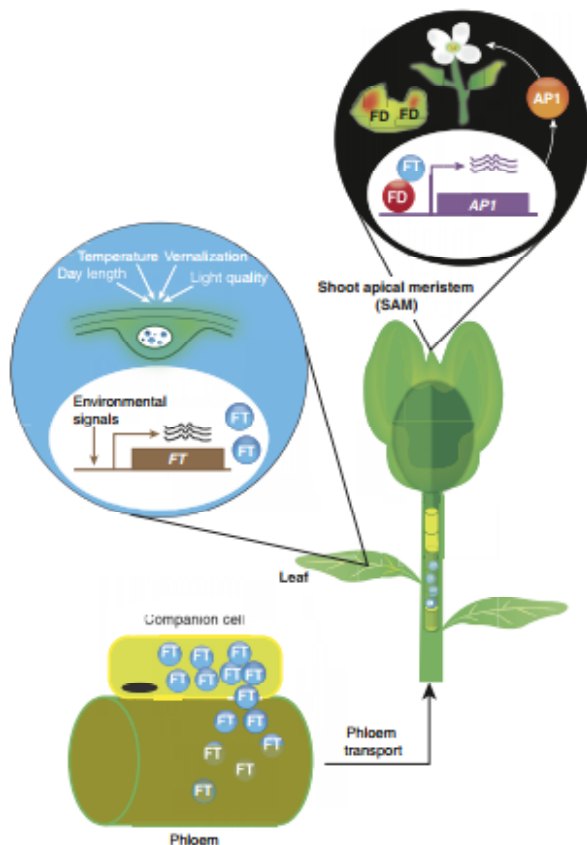
Fotoperiode merupakan rasio relatif antara panjang waktu penyinaran matahari pada periode siang dengan periode malam hari yang berhubungan langsung dengan waktu. Fotoperiodisme merupakan reaksi atau tanggapan perkembangan tumbuhan terhadap fotoperiode²⁾. Fitokrom adalah sejenis pigmen yang tersusun dari protein yang berperan terhadap tumbuhan pada panjang hari. Cahaya matahari yang diserap fitokrom berupa spektrum cahaya merah yang menyebabkan molekulnya

berwarna biru atau hijau kebiruan, sehingga fitokrom berfungsi sebagai penangkap cahaya atau fotoreseptor. Perubahan fitokrom dapat mengontrol ritme biologi tanaman. Ritme biologi akan memonitor fotoperiode agar selaras dengan panjang hari yang aktual³⁾.

Mekanisme Pembungaan pada Tanaman

Selain faktor lingkungan, proses pembungaan dikendalikan oleh banyak gen yang berinteraksi. Salah satu mekanisme gen *FLOWERING LOCUS T* (FT) yang merupakan sinyal pembungaan bergerak yang secara fisik berinteraksi dengan protein *FLOWERING LOCUS D* (FD) pada meristem untuk mengaktifkan *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANTS* (SOC1), *APETALA1* (AP1) dan aktivator bunga lainnya (Gambar 1)⁴⁾. Terdapat

dua *pathway flowering* yaitu *pathway photoperiod* dan *pathway vernalization* yang akan dikaji. Pada *pathway photoperiod* gen-gen yang terlibat yaitu PHYA, CRY1, LHY dan SOC1 sedangkan *pathway vernalization* gen-gen yang terlibat adalah FLC, VRN1 dan ESD4⁵⁾.



Gambar 1. Mekanisme *flowering gene FT* pada tanaman⁴⁾

Gen dalam *Pathway Photoperiod* (PHYA, CRY1, LHY, and SOC1)

Gen *PHYTOCHROME* (PHY)-A termasuk dalam famili gen PHYA-E berperan dalam mengkode protein fitokrom A sebagai fotoreseptor yang menerima rangsangan cahaya merah pada panjang gelombang 600-700 nm dan cahaya merah jauh dengan panjang gelombang 700-800 nm⁵⁾. Gen *CRYPTOCROME* (CRY) memiliki peran penting dalam pembungaan fotoperiodik, pembukaan stomata, penuaan daun, menghambat pemanjangan hipokotil, dan de-etiolasi sebagai respons terhadap sinyal cahaya biru^{6,7)}. Kriptokrom yang dikodekan oleh gen CRY1 dan CRY2 berperan sebagai fotoreseptor cahaya biru/UV-A dengan panjang

gelombang 320-500 nm⁸⁾. Perbedaan fungsional CRY 1 dan CRY2 yakni CRY1 mengatur penghambatan pemanjangan hipokotil yang diinduksi cahaya biru, sedangkan CRY2 mengatur inisiasi pembungaan yang dipengaruhi oleh fotoperiode⁷⁾.

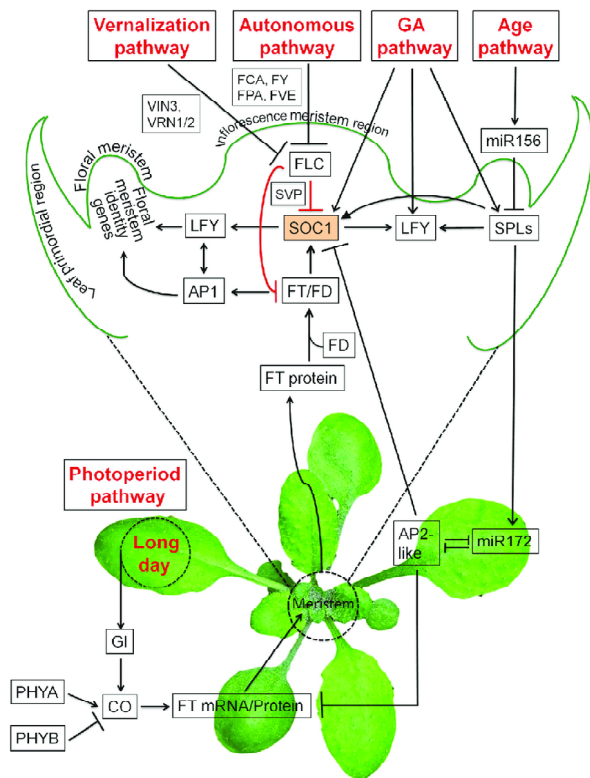
Gen *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* (LHY) merupakan salah satu gen osilator sentral yang berperan penting dalam komponen ritme sirkadian tanaman. Bersama dengan gen *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (CCA), gen LHY diekspresikan pada pagi hari dan menekan ekspresi gen PRR dan TOC1/PRR1⁹⁾. Ritme sirkadian memungkinkan tanaman menjadwalkan proses metabolik dan perkembangan tanaman serta menyesuaikan kondisi tanaman dengan lingkungan eksternal. Osilator sentral terdiri dari tiga *loop* umpan balik yang saling bertautan, yakni *loop* utama, *loop* pagi, dan *loop* malam. Gen CCA1 dan LHY berperan penting dalam *loop* utama osilator sentral. Selain itu, CCA1 dan LHY sangat penting untuk waktu pembungaan. CCA1 dan LHY dapat berfungsi sebagai faktor transkripsi dalam proses ritme sirkadian.

Gen SOC1 berperan sebagai integrator bunga pusat (*central floral integrator*) (Gambar 2). Gen SOC1 mengkode protein faktor transkripsi MADS-BOX yang terkonservasi pada tanaman angiospermae. Selain itu, gen SOC1 mengkode protein multifungsi SOC1 yang berperan dalam regulasi waktu dan pola pembungaan dan determinasi meristem bunga. Salah satu tahap pertama transisi bunga adalah peningkatan regulasi SOC1 dalam meristem yang mana dapat menginisiasi pembungaan awal secara efektif. Kemungkinan besar protein FT bergerak ke SAM (*shoot apical meristem*) dan berinteraksi dengan FD untuk meningkatkan regulasi SOC1 karena SOC1 mengintegrasikan rute fotoperiode melalui FT¹⁰⁾.

Gen dalam *Pathway Vernalization* (FLC, VRN1, and ESD4)

Serangkaian aktivitas yang dikenal sebagai vernalisasi terjadi sebagai respons terhadap paparan suhu rendah dalam jangka waktu lama, misalnya sepanjang musim dingin, dan berfungsi sebagai penanda untuk terjadinya pembungaan. Gen *FLOWERING LOCUS C* (FLC) merupakan gen utama yang terlibat dalam jalur pembungaan tanaman pada suhu rendah (vernalisasi) (Gambar 2). FLC

mengkode protein domain MADS-BOX yang merepresi secara kuat inisiasi pembungaan pada tanaman. FLC diaktivasi oleh gen *FRIGIDA* (*FRI*) dalam menghasilkan kebiasaan pembungaan tahunan pada musim dingin¹¹). FLC akan menghambat inisiasi pembungaan dan mencegah terjadinya transisi pada meristem apikal dari fase vegetatif menuju ke fase generatif sebelum vernalisasi berlangsung. Bagian promoter dari gen *SOC1* dan *FD* serta bagian intron dari *FT* akan diikat oleh FLC sehingga transkripsi dari ketiga gen tersebut akan terhambat, termasuk induksinya dengan kontrol terhadap waktu pembungaan sepanjang hari. Paparan suhu rendah berkepanjangan akan menyebabkan ekspresi FLC direpresi sehingga tanaman akan dapat menginisiasi pembungaan¹²).



Gambar 2. Pathway photoperiod dan vernalization pada *Arabidopsis* sp.

EARLY IN SHORT DAYS 4 (*ESD4*) mengkode protein *ESD4* yang merupakan protease spesifik *SUMO* (*Small Ubiquitin-like Modifier*) yang berperan dalam proses *SUMOylation*. Pada *Arabidopsis*, proses ini memberikan pengaruh dalam pengaturan waktu pembungaan serta elemen perkembangan tanaman lainnya yang terkena dampak mutasi. *ESD4* berfungsi dalam

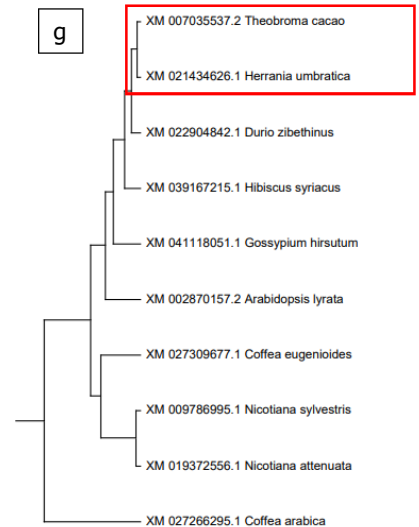
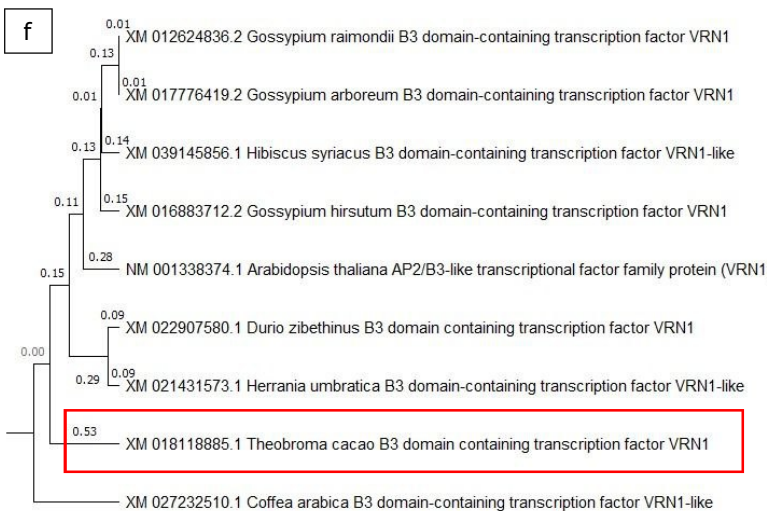
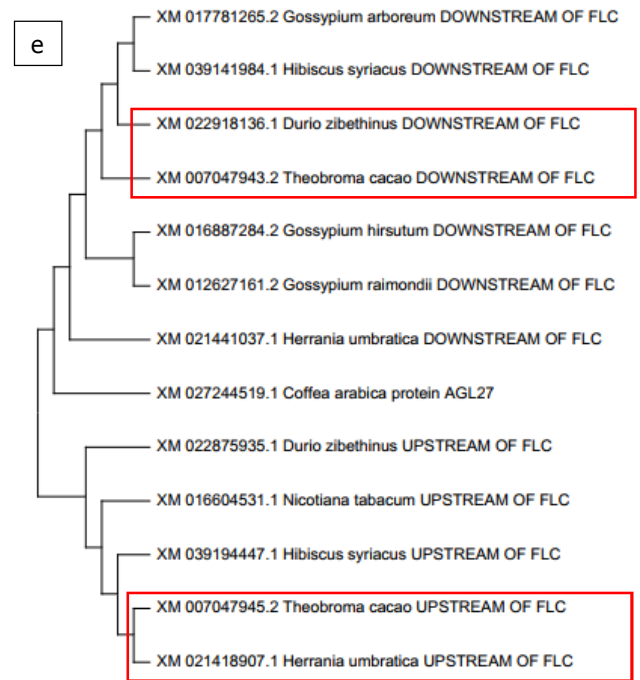
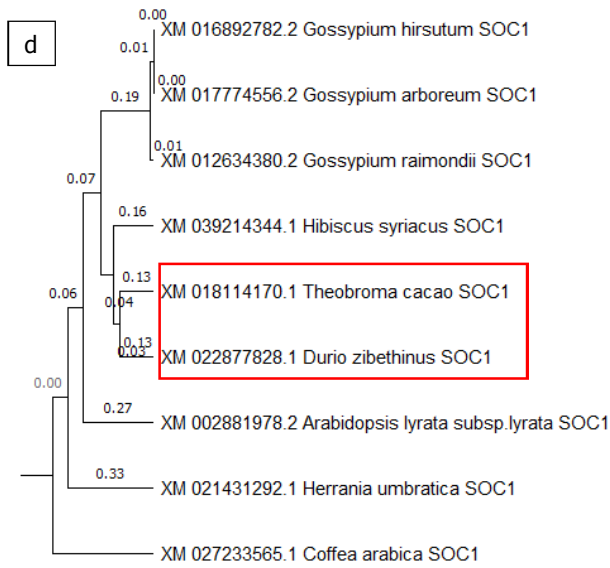
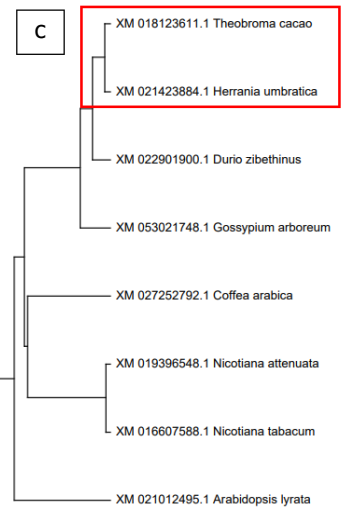
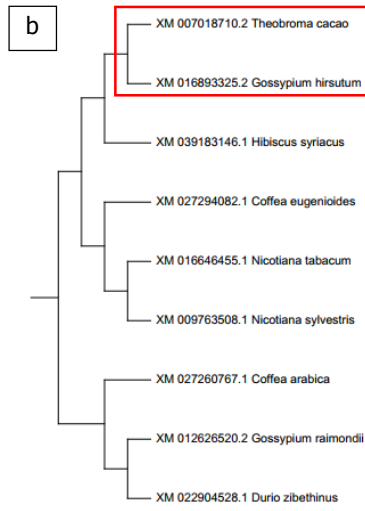
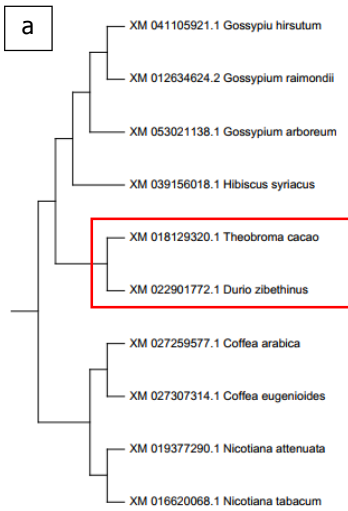
memastikan *FLC* terekspresi sehingga *FT* dan *SOC1* akan direpresi dan pembungaan akan terhambat. Selain itu, *ESD4* juga mengatur gen-gen yang meregulasi waktu pembungaan yang tidak terlibat secara langsung dengan ekspresi gen *FLC*¹³).

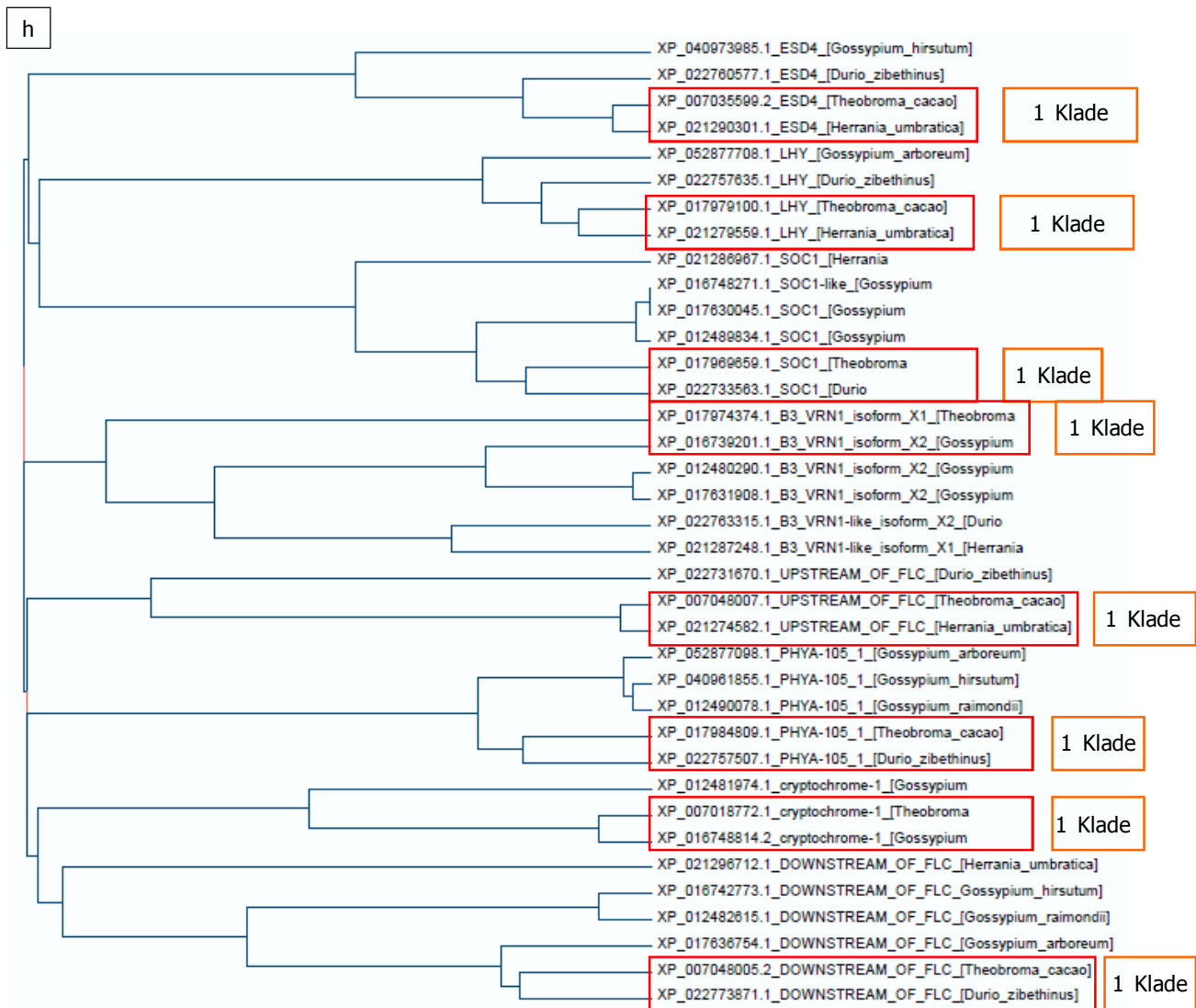
Kajian bioinformatika juga dilakukan dengan menggunakan data-data yang diolah seperti analisis sekuen DNA. Studi komparatif gen-gen pembungaan tanaman kakao juga dilakukan menggunakan *software NCBI* dengan mengoleksi data sekuen. Salah satu perangkat yang ditawarkan oleh situs *NCBI* adalah *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* untuk mensejajarkan sekuen hingga bisa diidentifikasi lebih lanjut¹⁴). Dengan adanya perangkat *BLAST* tersebut akan memberikan informasi lebih lanjut seperti *FASTA* yang digunakan untuk konstruksi pohon filogenetik.

Gen pembungaan kakao yang digunakan adalah *PHYA*, *CRY1*, *LHY* dan *SOC1* pada *pathway photoperiod*, sedangkan gen *pathway vernalization* adalah *FLC*, *VRN1*, dan *ESD4*⁵). Dengan mengoleksi sekuen DNA gen-gen tersebut dapat dianalisis menggunakan perangkat lunak *MEGA 11*¹⁵). Sebagai pembandingan pada konstuksi pohon filogenetik, pada juga dilakukan pengoleksian data sekuen DNA spesies lainnya¹⁶).

Sekuen DNA akan diolah sehingga menghasilkan pohon filogenetik yang dapat mengetahui hubungan kekerabatan dan hubungan evolusi suatu organisme. Tahap pembuatan pohon filogenetik yaitu *editing sequence data*, *alignment*, dan pembuatan diagram filogenetik¹⁷). Data sekuen yang telah disejajarkan selanjutnya dianalisis dengan metode *UPGMA tree*. Metode *UPGMA* merupakan teknik yang sering digunakan dengan beranggapan bahwa rata-rata evolusi yang terjadi pada suatu populasi bersifat konstan²⁰). Pohon filogenetik merupakan grafik yang menggambarkan kekerabatan antar organisme berdasarkan sekuen DNA yang terdiri dari beberapa taksa dan membentuk percabangan¹⁹). Suatu organisme dikatakan dekat apabila berada dalam cabang yang sama pada diagram (pohon) filogenetik²⁰).

Berdasarkan hasil konstruksi filogenetik menggunakan metode *UPGMA (MEGA 11)* pada gen pembungaan *pathway photoperiod* dan *pathway vernalization* tanaman kakao dengan tanaman spesies lainnya sebagai berikut:





Gambar 3. Pohon filogenetik gen dan protein. (a) gen PHYA; (b) gen CRY1; (c) gen LHY; (d) gen SOC1; (e) gen FLC; (f) VRN1; (g) gen ESD4; dan (h) protein dari 4 spesies (*Theobroma cacao* dengan *Durio zibethinus*, *Herraria umbratica*, *Gossypium hirsutum*).

Jika dilihat pada *phylogenetic tree*, *gene PHYA* (a) menunjukkan bahwa *T. cacao* memiliki kedekatan dengan *Durio zibethinus* yang berada pada 1 klade. Pada *phylogenetic tree gene CRY1* (b) *T. cacao* memiliki kedekatan gen pembungaan dengan *Gossypium hirsutum* ditunjukkan pada 1 klade yang sama. Pada *phylogenetic tree gene LHY* (c) *T. cacao* berada satu klade dengan *Herrania umbratica*. Pada *phylogenetic tree gene SOC1* (d) *T. cacao* juga memiliki kedekatan dengan *D. zibethinus*. Dapat disimpulkan bahwa gen pembungaan (*pathway photoperiod*) pada *T. cacao* memiliki kedekatan dengan *Durio zibethinus*, *Gossypium hirsutum* dan *H. umbratica* yang memiliki famili yang sama yaitu *Malvaceae*.

Jika dilihat pada *phylogenetic tree, gene FLC* (e) menunjukkan bahwa *T. cacao* memiliki kedekatan

dengan *D. zibethinus* dan *H. umbratica* yang berada pada 1 grup. Pada *phylogenetic tree, gene VRN1* (f) *T. cacao* memiliki kedekatan dengan *H. umbratica*. Pada *phylogenetic tree gene ESD4* (g) *T. cacao* memiliki kedekatan dengan *H. umbratica*. Dapat disimpulkan bahwa gen pembungaan (*pathway vernalization*) pada *T. cacao* memiliki kedekatan dengan *D. zibethinus* dan *H. umbratica* yang memiliki famili yang sama yaitu *Malvaceae*.

Jika dianalisis lebih lanjut pada protein (*Phylogenetic tree protein*) *T. cacao* dengan tiga spesies yang memiliki kekerabatan sebelumnya yaitu *D. zibethinus*, *H. umbratica* dan *G. hirsutum* juga menunjukkan kekerabatan yang sama seperti halnya *phylogenetic tree, gene* yang berada pada 1 klade (h). Untuk mempelajari mekanisme pembungaan pada tanaman

kakao dapat mempelajari proses pembungaan pada tanaman durian, kapas, dan kakao kolombia (*Wild Colombian Cocoa*) yang mana menunjukkan pola/mekanisme pembungaan hampir sama (famili *malvaceae*) sebagai sumber rujukan informasi.

Penutup

Adanya analisis biologi molekuler melalui bioinformatika dengan menggunakan *software NCBI* dapat membantu dalam mengetahui kekerabatan suatu organisme menggunakan sekuen DNA. Minimnya informasi mekanisme pembungaan pada tanaman kakao dapat digali melalui informasi mekanisme pembungaan pada tanaman lain yang memiliki kekerabatan dekat dengan tanaman kakao. Hasil analisis pohon filogenetik baik data sekuen DNA (gen) maupun protein menunjukkan bahwa tanaman kakao berkerabat dekat dengan tanaman durian, kapas dan kakao kolombia (famili *malvaceae*).

Sumber Pustaka

- ¹Nurtjahjaningsih, I.L.G.; P. Sulistyawati; A.Y.P.B.C. Widyatmoko & A. Rimbawanto (2012). Karakteristik pembungaan dan sistem perkawinan nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) pada hutan tanaman di Watusipat, Gunung Kidul. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 6(2), 65–80.
- ²Stirling, K.J.; P.H. Clark; Brown & S.J. Wilson (2002). Effect of photoperiod on flower bud-initiation and development in Myoga (*Zingiber mioga* Roscoe). *Scientia Horticulturae*, 95(3), 261–268.
- ³Sutoyo (2011). Fotoperiode dan pembungaan tanaman. *Buana Sains*, 11(2), 137–144.
- ⁴Wigge, A.P. (2011). FT, A mobile developmental signal in plants. *Current Biology*, 21, 374–378.
- ⁵Ibarra, S.E.; G. Auge; R.A. Sánchez & J.F. Botto (2013). Transcriptional programs related to phytochrome a function in *Arabidopsis* seed germination. *Molecular Plant*, 6(4), 1261–1273.
- ⁶He, G.; J. Liu; H. Dong & J. Sun (2019). The blue-light receptor CRY1 interacts with BZR1 and BIN2 to modulate the phosphorylation and nuclear function of BZR1 in repressing BR signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 12(5), 689–703.
- ⁷Liu, B.; Z. Yang; A. Gomez; B. Liu; C. Lin & Y. Oka (2015). Signaling mechanisms of plant cryptochromes in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Reserach*, 129, 137–148.
- ⁸Lian, H.L.; B.S. He; C.Y. Zhang; M.D. Zhu; Y.J. Zhang; P.K. Jia; X.S. Sun; L. Li & Q.H. Yang (2011). Blue-light-dependent interaction of cryptochrome 1 with SPA1 defines a dynamic signaling mechanism. *J. Genes & Development*, 25(10), 1023–1028.
- ⁹Singh, M. & P. Mas (2018). A functional connection between the circadian clock and hormonal timing in *Arabidopsis*. *Genes*, 9(12), 567.
- ¹⁰Lee, J.E. & I.H. Lee (2010). Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator, *Journal of Experimental Botany*, 61(9), 2247–2254.
- ¹¹Gu, X.; C. Le & Y. Wang (2013). *Arabidopsis* FLC clade members form flowering-repressor complexes coordinating responses to endogenous and environmental cues. *Nat Commun*, 4, 1947.
- ¹²Deng, W.; H. Ying; C.A. Helliwell; J.M. Taylor; W.J. Peacock & E.S. Dennis (2011). FLOWERING LOCUS C (FLC) regulates development pathways throughout the life cycle of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(16), 6680–6685.
- ¹³Reeves, P.H.; G. Murtas; S. Dash & G. Coupland (2002). Early in short days 4, a mutation in *Arabidopsis* that causes early flowering and reduces the mRNA abundance of the floral repressor FLC. *Development*, 129(3), 5349–5361.
- ¹⁴Boratyn, M.G.; C. Camacho; S.P. Cooper; G. Coulouris; A. Fong; N. Ma & L.T. Madden (2013). BLAST: A more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Research*, 41(1), 29–33.
- ¹⁵Yuniarti, H.; B. Choliz & A. Rinanti (2016). Diagram filogenetik hasil sekuens basa DNA menggunakan program MEGA-7 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*). *Jurnal Penelitian dan Karya Ilmiah*, 1(2), 109–117.
- ¹⁶Marzuki, I. (2019). *Aplikasi Mikrosimbion Spons dalam Bioremediasi Lingkungan*. CV. Tohar Jaya. Makassar, Indonesia.
- ¹⁷Nugroho, E.D. & A.D. Rahayu (2018). *Pengantar Bioteknologi (Teori dan Aplikasi)*. Deepublish, Yogyakarta, Indonesia.
- ¹⁸Wuriningtyas, L.B; R.D. Parwati & C.A. Romdhoni (2014). Filogenetik *Human papillomavirus* (HPV) tipe 6 dan tipe 11 penderita *recurrent respiratory papillomatosis*. *Oto Rhino Laryngologica Indonesiana*, 44(1), 55–62.
- ¹⁹Dharmayanti, N.L. (2011). Filogenetika molekuler: Metode taksonomi organisme berdasarkan sejarah evolusi. *Wartazoa*, 21(1), 1–10.
- ²⁰Rezeki, S.; T.Z. Helmi; Herrialfian; M. Hasan & M. Jalaluddin (2019). Identifikasi dan karakterisasi gen calpain (CAPN1) pada kambing kacang. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Veteriner*, 4(3), 197–205.