

POTENSI KEBERADAAN GEN PENGKODE THAUMATIN-LIKE PROTEIN (TLP) PADA TANAMAN APEL (*Malus sylvestris* Mill.)

Dias Idha Pramesti

UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta

Email: dias_ip@yahoo.com

ABSTRAK

Pada beberapa tanaman buah di daerah subtropis, gen pengkode *thaumatin-like protein* (TLP) seringkali dikaitkan dengan allergen atau gen pengkode protein penyebab alergi. Selain itu protein yang dikode gen ini juga diketahui berperan dalam proses pertahanan tanaman terhadap stress kekeringan dan serangan pathogen. Kajian ini akan membahas tentang potensi gen pengkode TLP pada lima varietas tanaman apel yang seringkali ditanam para petani apel di Indonesia, yaitu Ana, Manalagi, *Rome Beauty*, Wanglin dan Australi. Gen tersebut terdeteksi dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) menggunakan primer Mal d 2.01B. Hasil perbandingan sekuen gen pengkode TLP pada 5 varietas apel yang digunakan menunjukkan bahwa semua sampel memiliki similaritas sekuen dengan sekuen gen pengkode TLP antara lain dari tanaman *Malus x domestica* clone M2-FS7, *Malus x domestica* clone M2-PM2, *Malus x domestica* clone M2-FS1, *Malus domestica* cv. Gala, *Pyrus pyrifolia* cv. Cuili, *Prunus persica* cv. Yuanhuangtao, dengan tingkat similaritas yang berbeda-beda.

Kata kunci: gen pengkode TLP, allergen, *Malus sylvestris* Mill.

PENDAHULUAN

Thaumatococcus merupakan *sweet protein* yang pada dasarnya hanya terdapat pada tanaman *Thaumatococcus daniellii* dari Afrika Selatan. Protein ini dikode oleh suatu famili gen (multigen) yang memiliki banyak intron pada gen strukturalnya. Salah satu gen thaumatin, yaitu Thaumatococcus II telah diklon dan diseku (Edene *et al.*, 1982 dalam Faus dan Sisniega, 2001). Introduksi sekuen gen tersebut pada beberapa tanaman buah antara lain apel, *Solanum lycopersicum*, pir dan strawberry, menghasilkan tanaman transgenik yang memiliki rasa manis meningkat pada berbagai organ tanaman serta resistensi terhadap beberapa fitopatogen yang menyerang (Lebedev, *et al.*, 2002; Dolgov, *et al.*, 2004; Radhajeyalakshmi, 2005; Schestibratov dan Dolgov, 2005; Schestibratov dan Dolgov, 2008).

Pada beberapa tanaman terdapat protein yang memiliki homologi sekuen asam amino dengan thaumatin dan disebut *thaumatin-like protein* (TLP). Protein tersebut antara lain ditemukan pada cherry (Fils-Lycaon, *et al.*, 1996 dan Inschlag, *et al.*, 1998), *Cryptomeria japonica* (Futamura *et al.*, 2005), buah kiwi (Wurms, *et al.*, 1998), anggur (Monteiro, *et al.*, 2003), pisang (Barre *et al.*, 2000), tomat (Ghosh dan Chakrabarti, 2008). Berdasarkan perannya, protein TLP tersebut dapat diklasifikasikan menjadi tiga kelompok yaitu protein yang menghasilkan respon terhadap infeksi pathogen, respon terhadap stress osmotik serta sebagai protein antifungi (van Loon *et al.*, 2006 dalam Pagliarani *et al.*, 2009)

Pada tanaman apel, TLP pertama kali diidentifikasi di Swedia. Hsieh *et al.* (1995) menyebutkan bahwa pada *Granny Smith*, *Red Delicious*, *McIntosh* dan *Red Delicious* protein tersebut terakumulasi dengan kadar yang bervariasi ketika buah apel tersebut matang serta menjadi allergen yang dominan dalam buah apel. Sedangkan menurut Krebitz *et al.* (2003) *thaumatin-like protein* apel 23.2-kDa juga dapat diperoleh dari cDNA hasil isolasi protein buah apel matang yang selanjutnya gen penyandinya disebut sebagai gen *Mal d2*. Terkait gen tersebut Gao *et al.* (2005) menyebutkan bahwa gen *Mal d2* merupakan salah satu dari 4 macam allergen pada apel selain *Mal d1*, *Mal d3* dan *Mal d4*. Akan tetapi diantara keempat allergen tersebut, hanya *Mal d2* yang dapat mengkode pembentukan protein TLP.

Tanaman apel berasal dari daerah subtropis. Belrose, Inc. (2001) menyebutkan bahwa pemasok apel terbesar di dunia terdapat di negara-negara subtropis, meliputi Selandia Baru, Chili, Belanda, Austria dan Prancis. Di Indonesia sendiri apel telah mengalami domestikasi dan ditanam sejak tahun 1937 dengan daerah produksi apel terbesar terdapat di Propinsi Jawa Timur, yaitu Batu, Poncokusumo Malang dan Nongkojajar Pasuruan (Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, 2006). Setiowati (2006) menyebutkan bahwa di ketiga daerah tersebut telah ditanam dan dikembangkan berbagai varietas apel. Varietas apel yang banyak ditanam antara lain *Rome Beauty*, Manalagi, Australi, Wanglin, *Granny Smith*, *Princess Noble* dan Anna.

Terkait dengan beberapa pembahasan tentang potensi alergi maupun pemanfaatan protein TLP sebagai antifungi maupun antifitopatogen dari buah apel, kajian tentang potensi keberadaan TLP maupun



gen pengkodanya dirasa perlu. Hal ini dimaksudkan untuk meningkatkan perhatian tentang pemanfaatan serta pengembangannya di bidang kesehatan maupun produksi pertanian.

PEMBAHASAN

Gen Pengkode TLP pada Apel

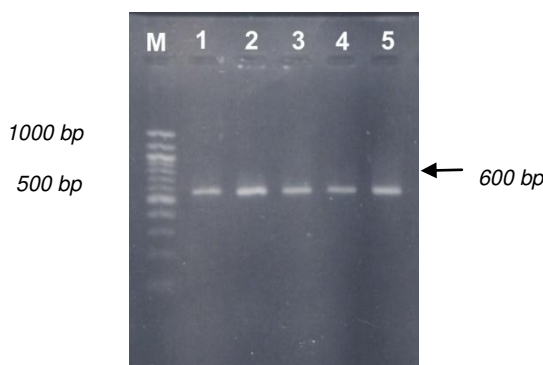
Apel merupakan buah yang umumnya dikonsumsi dalam kondisi segar tanpa pengolahan terlebih dahulu. Akan tetapi meskipun apel dikenal baik untuk kesehatan, buah tersebut dapat menimbulkan gejala alergi bagi sebagian orang. Alergi terhadap buah apel dialami oleh 2-4% masyarakat Eropa dan 3,5% masyarakat di US (Rona *et al*, 2007 dalam Maghuly, *et al*, 2009). Di Indonesia kasus terkait alergi terhadap buah apel masih jarang dijumpai. Hal ini dimungkinkan bahwa reaksi alergi yang ditimbulkan oleh buah apel dipengaruhi oleh faktor genotipe dan beberapa faktor eksternal diantaranya kondisi penyimpanan serta pemrosesan buah itu sendiri (Botton *et al*, 2008 dalam Pagliarani *et al*, 2009)

Reaksi alergi pada buah apel diindikasikan oleh adanya allergen sebagai protein yang cukup banyak dijumpai dalam buah yang dikonsumsi tersebut. Salah satu protein tersebut adalah Mal d2. Mal d2 atau seringkali disebut sebagai TLP pada apel diketahui terdapat pada buah apel yang diantaranya berasal dari Korea yaitu *Malus domestica* cv Fuji (Oh *et al*, 2000), apel varietas Prima dan Viesta di Eropa (Gao *et al.*, 2005) serta apel varietas Gala dan Florina dari Italia ((Pagliarani, 2009) Pada apel varietas Gala dan Florina pola ekspresi gen pengkode TLP tertinggi dijumpai pada bagian kulit dan daging buah yang matang (Pagliarani, 2009).

Selain dikenal sebagai allergen, protein TLP dapat berperan sebagai protein antifungi. Krebitz *et al* (2003) menunjukkan bahwa *Mal d2* yang diisolasi dari *Malus domestica* cv. Golden Delicious kemudian diekspresikan pada tanaman *Nicotiana benthamiana* dengan vektor *tobacco mosaic virus* memberikan pengaruh berupa kemampuan dalam melawan serangan *Fusarium oxysporum* dan *Penicillium expansum*. Selain pada tanaman apel, gen pengkode TLP yang diisolasi dari buah *Pyrus pyrifolia* Nakai cv Huobali dari Yunnan Cina juga diketahui berperan dalam aktivitas antifungi. **PpTLP** yang banyak terekspresi pada pericarpium serta daun *P. pyrifolia* Nakai cv Huobali dapat menghambat serangan *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phomopsis* sp., *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, *Alternaria* sp. pada tanaman tembakau transgenik (Liu *et al*, 2012).

Keberadaan Gen Pengkode TLP pada Tanaman Apel di Indonesia

Keberadaan gen pengkode TLP pada 5 tanaman apel yang ditanam di Indonesia, yaitu Apel Anna, Manalagi, Rome Beauty, Wanglin dan Australi dapat diketahui dari DNA hasil isolasi dari organ daun dengan primer Mal d 2.01B. Hasil amplifikasi menunjukkan bahwa DNA genom semua varietas apel dapat diamplifikasi oleh primer Mal d 2.01B dan menghasilkan pita amplifikasi dengan ukuran sekitar 600 bp (Gambar). Analisis lebih lanjut melalui pembacaan serta penjajaran sekuen gen tersebut menunjukkan adanya variabilitas yang tidak terlalu tinggi dari kelima tanaman apel tersebut. Susunan basa nukleotida pada kelima varietas apel menunjukkan bahwa pada semua tanaman tersebut terdapat gen pengkode TLP yang sama. Akan tetapi perbedaan beberapa basa diduga terkait dengan alel berbeda dari gen tersebut (Pramesti, 2009).



Gambar hasil amplifikasi gen pengkode TLP tanaman apel pada gel agarose 1,5 % oleh primer Mal d 2.01B

M = Marker

3 = Apel varietas Manalagi

1 = Apel varietas Anna

4 = Apel varietas Rome Beauty

2 = Apel varietas Australi

5 = Apel varietas Wanglin



Perbandingan Sekuen Gen Pengkode TLP Tanaman Apel dengan Sekuen dalam *Gene bank Data Base*

Hasil perbandingan sekuen gen pengkode TLP pada 5 varietas apel dengan *gene bank database* menunjukkan bahwa terdapat similaritas sekuen dengan gen pengkode TLP pada beberapa tanaman antara lain *Malus x domestica* clone M2-FS7, *Malus x domestica* clone M2-PM2, *Malus x domestica* clone M2-FS1, *Malus domestica* cv. Gala, *Pyrus pyrifolia* cv. Cuili, dan *Prunus persica* cv. Yuanhuangtao. Kelima varietas apel, yaitu Anna, Manalagi, Rome Beauty, Wanglin dan Australi memiliki persentase similaritas sekuen di atas 80% dengan sekuen gen pengkode TLP tanaman-tanaman tersebut (tabel).

Tabel Similaritas Sekuen Gen Pengkode TLP Tanaman Apel Varietas Anna, Manalagi, Rome Beauty, Wanglin dan Australi dengan Tanaman Lain

Tanaman apel (varietas sampel)	Tanaman yang memiliki similaritas sekuen dengan varietas sampel	Panjang yang dibandingkan (basa)	Similaritas (%)
Anna	<i>Malus x domestica</i> clone M2-FS7 thaumatin-like protein precursor (Mal d 2.01B) gene, complete cds	476	98
	<i>Malus x domestica</i> clone M2-PM2 thaumatin-like protein precursor (Mal d 2.01B) gene, complete cds	476	98
	<i>Malus x domestica</i> clone M2-FS1thaumatin-like protein precursor (Mal d 2.01A) gene, complete cds	476	98
	<i>Malus domestica</i> cv. Gala pathogenesis-related protein 5 mRNA, complete cds	476	98
	<i>Pyrus pyrifolia</i> cv. Cuili thaumatin-like protein-like (tl) mRNA, partial sequence	475	94
Manalagi	<i>Prunus persica</i> cv. Yuanhuangtao thaumatin-like protein-like (tl) mRNA, partial sequence	486	83
	<i>Malus x domestica</i> clone M2-FS7 thaumatin-like protein precursor (Mal d 2.01B) gene, complete cds	528	100
	<i>Malus x domestica</i> clone M2-PM2 thaumatin-like protein precursor (Mal d 2.01B) gene, complete cds	528	100
	<i>Malus x domestica</i> clone M2-FS1thaumatin-like protein precursor (Mal d 2.01A) gene, complete cds	528	100
	<i>Malus domestica</i> cv. Gala pathogenesis-related protein 5 mRNA, complete cds	528	99
Rome Beauty	<i>Pyrus pyrifolia</i> cv. Cuili thaumatin-like protein-like (tl) mRNA, partial sequence	496	95
	<i>Prunus persica</i> cv. Yuanhuangtao thaumatin-like protein-like (tl) mRNA, partial sequence	506	83
	<i>Malus x domestica</i> clone M2-FS7 thaumatin-like protein precursor (Mal d 2.01B) gene, complete cds	526	99
	<i>Malus x domestica</i> clone M2-PM2 thaumatin-like protein precursor (Mal d 2.01B) gene, complete cds	526	99
	<i>Malus x domestica</i> clone M2-FS1thaumatin-like protein precursor (Mal d 2.01A) gene, complete cds	526	99
Wanglin	<i>Malus domestica</i> cv. Gala pathogenesis-related protein 5 mRNA, complete cds	526	99
	<i>Pyrus pyrifolia</i> cv. Cuili thaumatin-like protein-like (tl) mRNA, partial sequence	492	95
	<i>Prunus persica</i> cv. Yuanhuangtao thaumatin-like protein-like (tl) mRNA, partial sequence	505	84
	<i>Malus x domestica</i> clone M2-FS7 thaumatin-like protein precursor (Mal d 2.01B) gene, complete cds	405	97
	<i>Malus x domestica</i> clone M2-PM2 thaumatin-like protein precursor (Mal d 2.01B) gene, complete cds	405	97
Australi	<i>Malus x domestica</i> clone M2-FS1thaumatin-like protein precursor (Mal d 2.01A) gene, complete cds	405	97
	<i>Malus domestica</i> cv. Gala pathogenesis-related protein 5 mRNA, complete cds	405	97
	<i>Pyrus pyrifolia</i> cv. Cuili thaumatin-like protein-like (tl) mRNA, partial sequence	393	95
	<i>Prunus persica</i> cv. Yuanhuangtao thaumatin-like protein-like (tl) mRNA, partial sequence	378	85
	<i>Malus x domestica</i> clone M2-FS7 thaumatin-like protein precursor (Mal d 2.01B) gene, complete cds	322	99
Australi	<i>Malus x domestica</i> clone M2-PM2 thaumatin-like protein precursor (Mal d 2.01B) gene, complete cds	322	99
	<i>Malus x domestica</i> clone M2-FS1thaumatin-like protein precursor (Mal d 2.01A) gene, complete cds	322	99
	<i>Malus domestica</i> cv. Gala pathogenesis-related protein 5 mRNA, complete cds	322	99
	<i>Pyrus pyrifolia</i> cv. Cuili thaumatin-like protein-like (tl) mRNA, partial sequence	322	95
	<i>Prunus persica</i> cv. Yuanhuangtao thaumatin-like protein-like (tl) mRNA, partial sequence	326	88

Varietas Manalagi memiliki sekuen gen pengkode TLP yang sama persis dengan *Malus x domestica* clone M2-FS7, *Malus x domestica* clone M2-PM2, *Malus x domestica* clone M2-FS1 ditunjukkan dengan nilai similaritas 100% karena tidak terdapat satupun basa yang berbeda. *Malus x domestica* clone M2-PM2 merupakan tanaman apel yang sekuen gen pengkode TLP-nya digunakan sebagai acuan penyusunan pasangan primer Mal d 2.01B. Kesamaan sekuen menunjukkan bahwa gen yang mengkode TLP pada varietas Manalagi sama dengan gen pada *Malus x domestica* clone M2-PM2.

Kelima varietas apel, yaitu Anna, Manalagi, Rome Beauty, Wanglin dan Australi termasuk dalam kelompok *Malus sylvestris* atau *Malus domestica*. Spesies ini adalah anggota famili Rosaceae subfamili Pomoideae. Sebagaimana apel, pir (*Pyrus pyrifolia*) yang memiliki similaritas sekuen cukup tinggi merupakan anggota famili Rosaceae subfamili Pomoideae sehingga apel berkerabat dekat dengan buah pir. Hal tersebut menunjukkan bahwa kekerabatan antar spesies juga meliputi tingkat similaritas sekuen gen pengkode TLP yang menunjukkan similaritas di atas 80%.

Potensi Keberadaan Gen Pengkode TLP pada Apel di Indonesia

Pemanfaatan protein TLP dan gen yang mengkodennya telah banyak diteliti untuk beberapa tanaman, khususnya di beberapa negara. Pada dasarnya hal tersebut memberikan peluang bagi kegiatan penelitian serupa di Indonesia. Apalagi jika dikaitkan dengan keberadaan berbagai buah yang dapat dikembangkan karena kondisi geografis Indonesia yang cukup beragam, pemanfaatan potensi yang dimiliki



masing-masing spesies tanaman dapat digunakan sebagai sarana untuk mengatasi berbagai permasalahan diantaranya dalam hal peningkatan ketahanan pangan.

Berdasarkan uraian di atas paling tidak ada beberapa potensi keberadaan gen pengkode TLP pada tanaman apel di Indonesia yaitu:

1. Sebagai antifungi bagi tanaman apel itu sendiri maupun pada tanaman lain
2. Berpeluang sebagai antifitopatogen yang menyerang tanaman apel maupun tanaman lainnya

PENUTUP

Pada tanaman apel yang terdapat di Indonesia yaitu varietas Anna, Australi, Manalagi, Rome Beauty serta Wanglin terdapat gen *Mal d 2.01B*. Sekuen gen *Mal d 2.01B* pada tanaman apel varietas Anna, Australi, Manalagi, Rome Beauty dan Wanglin memiliki rata-rata nilai similaritas 98% dan terdapat perbedaan sebesar 2%. Hal ini menunjukkan bahwa potensi yang telah diketahui pada tanaman apel yang berasal di negara lain dapat pula dikaji bahkan dikembangkan dari lima varietas tanaman apel yang ditanam di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous. (2006). *Varietas Harapan Apel Tropika. Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika. Pusat penelitian dan Pengembangan Hortikultura*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Departemen Pertanian.
- Barre, A., W.J., Peumans, L. Menu-Bouaouiche, Van Damme, E.J.M., May, G.D., Herrera, A.f., Leuven, F.V dan Rouge, P. (2000). Purification and Structural Analysis of an Abundant Thaumatin-like Protein from Ripe Banana Fruit. *Planta* 211: 791-799.
- Dolgov, S.V., Schestibratov, K.A., dan Mikhailov, R.V. (2004). Apple Transformation with the Gene of Supersweet Protein Thaumatin II. *Acta Horticulturae* 663(1): 507-510.
- Faus, I. dan Sisniega, H. (2001). Sweet Tasting Protein. *Biopolymer* 8: 203-220.
- Fils-Lycaon, B.R., Wiersma, P.A., Eastwell, K.C. dan Sautiere, P. (1996). A Cherry Protein and Its Gene, Abundantly Expressed in Ripening Fruit, Have Been Identified as Thaumatin-Like. *Plant Physiology*, 111(1): 269-273.
- Futamura, N., Tani, N., Tsumura, Y., Nakajima, N., Sakaguchi, M., dan Shinohara, K. (2005). Characterization of genes for novel thaumatin-like proteins in *Cryptomeria japonica*. *Tree Physiology*, 26: 51-62.
- Gao, Z. (2005). *Localization of Candidate Allergen Genes on Apple (Malus domestica) Genome and Their Putative Allergenicity*. P.hD Thesis. Netherland: Wageningen University. (online). www.library.wur.nl/wda/dissertations/dis3789.pdf. Diakses 2 April 2008.
- Gao, Z.S., van de Weg, W. E., Schaart, J. G., van Arkel, G., Breiteneder, H., Hoffmann-Sommergruber, K. dan Gilissen, L. J. W. J. (2005). Genomic Characterization and Linkage Mapping of The Apple Allergen Genes *Mal d 2* (thaumatin-like protein) and *Mal d 4* (profilin). *Theory Application Genetic* 11: 1087-1097
- Krebitz, M., Wagner, B., Ferreira, F., Peterbauer, C., Campillo, N., Witty, M., Kolarich, D., Steinkellner, H., Scheiner, O. dan Breiteneder, H. (2003). Plant-based Heterologous Expression of *Mal d 2*, a Thaumatin-like Protein and Allergen of Apple (*Malus domestica*), and its Characterization as an Antifungal Protein. *Journal of Molecular Biology*. 329(4): 721-730.
- Lebedev, V.G., Taran, S.A., Shmatchenko, V.V. dan Dolgov, S.V. (2002). Pear Transformation with The Gene for Supersweet Protein Thaumatin II. *Acta Horticulturae* 596: 199-202.
- Liu, D., He, X., Li, W., Chen, C., dan Ge, F. (2012). *Molecular cloning of a thaumatin-like protein gene from Pyrus pyrifolia and overexpression of this gene in tobacco increased resistance to pathogenic fungi*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*
- Oh, D.H., Song, K.J., Shin, Y.U. dan Chung, W.II. (2000). Isolation of a cDNA Encoding a 31-kDa, Pathogenesis-related 5/thaumatin-like (PR5/TL) Protein Abundantly Expressed in Apple Fruit (*Malus domestica* cv. Fuji). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 64 (2): 355-362
- Pagliarani, G., Paris, R., Tartarini, S. dan Sansavini, S. (2009). Cloning and Expression of The Major Allergen in Apple Fruit. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. ISAFRUIT Special Issue: 176-181
- Pramesti, D.I. (2009). *Identifikasi Gen Pengkode Thaumatin-like Protein (TLP) pada Beberapa Varietas Apel (Malus sylvestris Mill.)*. Thesis tidak dipublikasikan. Program Studi Biologi Minat Bioteknologi. Program Pasca Sarjana. Universitas Brawijaya Malang.
- Radhajejalakshmi, R., Velazhahan, R., Balasubramanian, P. dan Doraiswamy, S. (2005). High-level expression of TLP was observed in transgenic plants. The transgenic lines exhibited increased resistance to *Alternaria solani*, the early blight pathogen compared to non-transgenic tomato plants. *Archives Of Phytopathology and Plant Protection* (4): 257-265.
- Schestibratov, K.A. dan Dolgov, S.V. (2008). *Genetic Engineering of Strawberry for Taste Improvement and Enhanced Disease Resistance by Introduction of thauII Gene: Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond*. Netherlands: Springer.
- Schestibratov, K.A. dan Dolgov, S.V. (2005). Transgenic strawberry plants expressing a thaumatin II gene demonstrate enhanced resistance to *Botrytis cinerea*. *Scientia Horticulturae* 106(2): 177-189.



- Setiowati, R.A. (2006). *Observasi Keberadaan Apel (Malus sylvestris Mill.) di Kecamatan Bumijati, Kota Batu; Kecamatan Poncokusumo, Kabupaten Malang dan Kecamatan Tutar, Kabupaten Pasuruan. Skripsi tidak dipublikasikan.* Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya.
- Wurms, K., Greenwood, D., Sharrock, K. dan Long, P. (1999). Thaumatin-like Protein in Kiwifruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (11): 1448–1452.

DISKUSI

-

