

Karakterisasi Internal Transcribed Spacer (ITS) rDNA Nematoda Pucuk Putih (*Aphelenchoides besseyi* Christie)

(Characterization of The Internal Transcribed Spacer (ITS) rDNA of White Tip Nematode (*Aphelenchoides besseyi* Christie))

Ade Indra Maulana Sembiring¹, Fitrianingrum Kurniawati^{1*}, dan Supramana¹

¹Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
Jl. Kamper, Kampus IPB Dramaga, Bogor, Indonesia, 16680

*Email korespondensi: fitrianingrumk@gmail.com

Diterima 21 Maret 2019/Disetujui 10 Mei 2019

ABSTRACT

Aphelenchoides besseyi is an important plant parasitic nematode on rice and causes yield loss up to 54%. Information regarding *A. besseyi* in Indonesia is limited. The objective of this research is to identify *A. besseyi* based on the ITS region and to analyze the nucleotide sequences of the ITS region. The nematode *A. besseyi* extracted from 6 g seed from seven rice seed cultivars there are Ciherang, Gondo Roso, Hibrida Prima, Inpari Sidenuk, Pertiwi, Pandan Wangi, and Sintanur. Nematode extraction was conducted by the modified Baermann Funnel method. Molecular identification with PCR included extraction, amplification, and electrophoresis of DNA, and analysis of nucleotide sequences. Sequencing analysis was carried out with BLAST, ClustalW, Boedit v 7.0.5.3, and MEGA v.7.0. DNA amplification was performed using a specific forward primer (5'-ACA ATC GAG TTG GGA GTG-3') and reverse primer (5'-GGT CAG TGT CAT CAA TCG-3'). The DNA amplification resulted an 750 bp fragment of *A. besseyi*. The results of nucleotide alignment obtained 555 nucleotides. The homology of nucleotides of Indonesian *A. besseyi* extracted from Hibrida Prima and Pandan Wangi showed 100% with China and Russia isolates, while isolate of Gondo Roso showed 100% similarity with India isolate. The homology of Indonesian isolates with outgroup isolate of *A. primadentus* from Iran was 74.4%. Differences in nucleotide sequencing are located in positions 216, 376, and 448. These results showed that *A. besseyi* isolates from Indonesia are closely related to isolates from China, Russia and India.

Keywords: alignment analysis, homology, phylogenetic analysis

ABSTRAK

Aphelenchoides besseyi merupakan nematoda parasit tumbuhan penting pada padi dan dapat menyebabkan kehilangan hasil hingga 54%. Informasi mengenai nematoda *A. besseyi* di Indonesia masih sangat terbatas. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi *A. besseyi* berdasarkan daerah ITS dan menganalisis runutan nukleotida dari daerah ITS. Nematoda *A. besseyi* diekstraksi dari 6 g benih dari tujuh varietas padi, yaitu Ciherang, Gondo Roso, Hibrida Prima, Inpari Sidenuk, Pertiwi, Pandan Wangi, dan Sintanur. Ekstraksi nematoda dilakukan dengan metode Corong Baermann yang telah dimodifikasi. Identifikasi molekuler dengan PCR mengamplifikasi wilayah ITS menggunakan pasangan primer spesifik forward (5'-ACA ATC GAG TTG GGA GTG-3') dan reverse (5'-GGT CAG TGT CAT CAA TCG-3'). Hasil amplifikasi DNA *A. besseyi* diperoleh fragmen berukuran sekitar ±750 bp. Hasil analisis penyejajaran diperoleh 555 nukleotida. Isolat *A. besseyi* asal Indonesia varietas Inpari Sidenuk, Ciherang, Hibrida Prima, dan Pandan Wangi menunjukkan homologi nukleotida 100% dengan isolat asal Cina dan Rusia, serta varietas Sintanur, Pertiwi, dan Gondo Roso memiliki homologi 100% dengan isolat asal India. Perbandingan homologi isolat asal Indonesia dengan outgroup isolat *A. primadentus* asal Iran menunjukkan kemiripan nukleotida 74.4%. Perbedaan runutan nukleotida antar isolat terletak pada posisi 216, 376, dan 448. Hal tersebut menunjukkan isolat asal Indonesia memiliki tingkat kesamaan yang tinggi dan berkerabat sangat dekat dengan isolat asal Cina, Rusia, dan India.

Kata kunci: analisis filogenetika, analisis penyejajaran, homologi

PENDAHULUAN

Aphelenchoides besseyi merupakan nematoda penting pada komoditas padi. Infeksi dari *A. besseyi*

menyebabkan penyakit pucuk putih (*white tip*). Nematoda ini menginfeksi bagian tajuk tanaman sehingga sering disebut sebagai *foliar nematode*. Nematoda *A. besseyi* juga merupakan nematoda terbawa benih yang dapat bertahan

pada benih dalam kondisi anhidrobiosis selama penyimpanan di gudang (Kurniawati & Supramana, 2016). EPPO (2005) melaporkan penyebaran nematoda ini sudah mencapai seluruh negara Eropa, Afrika, Amerika Serikat dan beberapa negara di Asia termasuk Indonesia. Namun, di Indonesia sendiri penyebaran *A. besseyi* masih terbatas di beberapa wilayah saja, yakni Sumatera, Jawa dan Kalimantan Selatan, sehingga status dari patogen ini merupakan sebelumnya organisme pengganggu tumbuhan karantina OPTK A2 menurut Kementan (2015) menjadi OPT penting (Kementan, 2018).

Kurniawati & Supramana (2016), melaporkan keberadaan nematoda *A. besseyi* di beberapa varietas padi di Bogor yang merupakan varietas benih paling banyak digunakan oleh petani di Indonesia. Penelitian tersebut juga telah melakukan identifikasi secara morfologi. Namun, dibutuhkan ketelitian khusus untuk mengidentifikasi secara morfologi. Identifikasi secara molekuler atau PCR sangat

BAHAN DAN METODE

Ekstraksi Nematoda

Nematoda *A. besseyi* diekstraksi dari tujuh varietas padi, yaitu Ciherang, Gondo Roso, Hibrida Prima, Inpari Sidenuk, Pertiwi, Pandan Wangi dan Sintanur. Benih tersebut didapatkan dari kios pertanian di Sumatera Utara dan Jawa Tengah. Sebanyak 6 g benih diambil dengan 3 ulangan mengacu kepada metode Remeus & Pelazza (2014) yang dimodifikasi. Benih diekstraksi menggunakan metode Corong Baermann yang telah di modifikasi, bagian hilum benih dipotong, kemudian diletakkan di atas gelas yang pada bagian dasarnya terdapat saringan nilon. Benih selanjutnya diletakkan pada gelas penampung yang berisi air. Dasar saringan menyentuh permukaan air sampai benih terendam air dan diinkubasi selama 24 jam pada ruangan gelap pada suhu ruang. Nematoda yang tertampung di dalam air kemudian disaring menggunakan saringan 100 mesh dan 500 mesh dan hasilnya dimasukkan ke dalam tabung berukuran 1.5 ml.

Identifikasi Berdasarkan Polymerase Chain Reaction (PCR) rDNA

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan metode *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) Doyle & Doyle (1990) yang telah dimodifikasi. Bufer ekstraksi sebanyak 150 ml disiapkan terlebih dahulu. Sebanyak 30-35 ekor nematoda hasil ekstraksi selanjutnya dipancing dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1.5 ml. Bufer ekstraksi 150 µl dan 1% β -mercaptoetanol ditambahkan ke dalam tabung mikro, kemudian digerus menggunakan *micropestle*, lalu diinkubasi pada suhu 60-65 °C selama 2 jam (tabung dibolak-balik setiap 10 menit untuk membantu proses lisis).

Hasil inkubasi didiamkan pada suhu ruang selama 3-5 menit. Siapan ditambahkan dengan campuran kloroform:isoamil alkohol (C:I) 24:1 sebanyak 150 µl, dicampurkan hingga homogen dengan menggunakan *vortex*

dibutuhkan untuk meningkatkan keakuratan dari hasil identifikasi morfologi dan analisis perunutan diperlukan untuk memperkuat hasil PCR dan mengetahui runutan nukleotida maupun asam amino suatu organisme, serta dapat mengetahui asal usul organisme tersebut.

ITS adalah suatu urutan RNA dari proses transkripsi utama yang berada antar prekursor ribosomal subunit dan dihilangkan pada proses *splicing* ketika RNA *precursor* tanda molekul yang struktural diproses ke dalam suatu ribosom. Organisme eukariotik mempunyai dua daerah ITS; ITS-1 terletak di antara 18S gen dan 5,8S gen, dan ITS-2 terletak di antara 5,8S dan 28S gen. Ketiga gen ribosom tersebut mempunyai tingkat konservasi yang sangat tinggi (Gomes *et al.*, 2002; O'Brien *et al.*, 2005). Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi *Aphelenchoides besseyi* asal tujuh varietas padi melalui perunutan nukleotida *Internal Transcribed Spacer* (ITS) dan mengetahui kedekatan genetiknya dengan negara lain.

selama 3 menit. Suspensi disentrifugasi pada kecepatan 11 000 rpm selama 20 menit. Supernatan lapisan atas diambil sebanyak 80 µl dan dimasukkan ke dalam tabung mikro 1.5 ml baru dengan label yang sama. Supernatan ditambahkan dengan 1/10 volume sodium asetat (CH₃COOK 3M; pH 5.2) dan 2/3 volume isopropanol dari total volume. Selanjutnya diinkubasi pada suhu -20 °C selama *overnight*. Tabung kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12 000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 150 µl etanol 80% dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 12 000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang dan pelet dikeringkan selama 1-2 jam. Pelet kemudian diresuspensi dengan 30 µl bufer Tris-EDTA pH 8 dan disimpan pada suhu -20 °C sampai digunakan sebagai *templat* dalam PCR.

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan pasangan primer spesifik ITS *A. besseyi* dengan runutan *forward* (5'-ACA ATC GAG TTG GGA GTG-3') dan runutan *reverse* (5'-GGT CAG TGT CAT CAA TCG-3') (Kurniawati, komunikasi pribadi 23 April 2018). Reaksi amplifikasi terdiri atas beberapa reaksi, predenaturasi dengan suhu 94 °C selama 4 menit dan denaturasi pada suhu 94 °C selama 1 menit, *annealing* (penempelan primer) pada suhu 55 °C selama 1 menit, dan elongasi pada suhu 72 °C selama 2 menit, siklus ini berlangsung sebanyak 30 kali dengan terakhir pasca elongasi pada suhu 72 °C selama 10 menit (Kurniawati, komunikasi pribadi 23 April 2018). DNA nematoda hasil amplifikasi dielektroforesis pada tegangan 50 V selama 50 menit. Hasil elektroforesis divisualisasikan dengan UV transilluminator dan diambil foto dengan kamera.

Analisis Perunutan Nukleotida

Hasil PCR dikirim ke PT. Genetika Science Indonesia untuk disequensing. Hasil sekuensing yang didapatkan dianalisis menggunakan program CLC Sequence Viewer v 8.0. Hasil perunutan nukleotida yang diperoleh kemudian dikonfirmasi ke *GenBank* dengan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) yang tersedia pada *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 2014). Kemudian nukleotida yang telah dikonfirmasi

disejajarkan dengan menggunakan penyejajaran berganda ClustaIW pada program *Bioedit Sequence Alignment Editor* v 7.2.6 (Hall, 1999).

Analisis Filogenetika *A. Besseyi*

Analisis filogenetika dilakukan menggunakan pendekatan ‘*Maximum Likelihood*’ dengan *Bootstrap* 1000× dengan perangkat lunak *Molecular Evolutionary Genetic Analysis Software* versi 7 (MEGA 7).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi Nematoda Aphelenchoides besseyi

Karakter morfologi dari nematoda *A. besseyi* memiliki tubuh berbentuk silinder memanjang (vermiform), anulasi halus, dan bibir *set off* (Gambar 1 a,b,d). Nematoda betina memiliki ukuran tubuh lebih panjang dibandingkan dengan jantan. Nematoda betina akan membentuk posisi lurus atau sedikit melengkung pada posisi istirahat. Nematoda ini memiliki stilet berbentuk seperti tombak dengan basal knob yang kecil (Gambar 1c) dan terdapat median bulbus yang berukuran besar serta berbentuk oval

(Gambar 1d). Tubuh nematoda jantan pada bagian posterior melengkung hingga 180° dengan spikula yang seperti duri (*Thorne shaped spicule*) dengan ekor berbentuk *conoid* dengan 2-4 *mucro* (tonjolan) (Gambar 1e). Nematoda betina memiliki vulva dengan tipe didelfik yang terletak pada 60-75% panjang tubuhnya (Gambar 1f) (Kurniawati & Supramana, 2016).

ITS rDNA *A. besseyi*

Menurut Vrain & McNamara (1994) bahwa, setiap spesies, populasi, atau komunitas ekologi nematoda dapat dianalisis dengan menggunakan pendekatan molekuler berdasarkan wilayah rDNA ITS. Isolat yang berasal dari tujuh varietas padi yaitu, Ciherang, Gondo Roso, Hibrida Prima, Inpari Sidenuk, Pertiwi, Pandan Wangi dan Sintanur menunjukkan hasil positif dengan pita DNA yang sejajar. Identifikasi molekuler menggunakan PCR dengan primer ITS sebagai target amplifikasi dapat digunakan sebagai metode identifikasi nematoda *A. besseyi* yang akurat dan efisien. Hasil amplifikasi dinyatakan positif mengandung *A. besseyi* (Gambar 2).

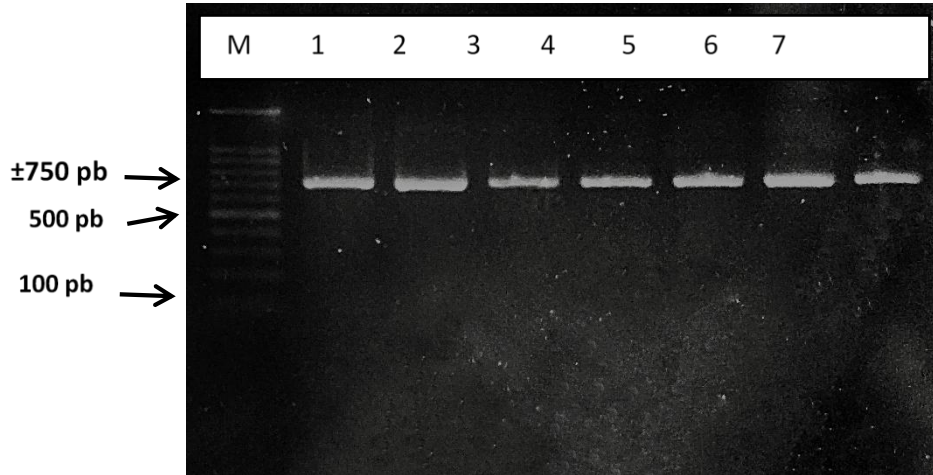


Gambar 1. Morfologi nematoda *A. besseyi* dari tujuh varietas benih padi asal Indonesia; (a) nematoda jantan; (b) nematoda betina; (b) anterior nematoda; (d) metakorpus; (e) spikula; (f) vulva

Runutan Nukleotida Aphelenchoides besseyi

Hasil perunutan ITS rDNA *A. besseyi* isolat Indonesia dari varietas Sintanur, Pertiwi, Inpari Sidenuk, Ciherang, Gondo Roso, Hibrida Prima, dan Pandan Wangi berhasil dirunut dengan panjang sekitar 555 nukleotida. Analisis kesejajaran menunjukkan bahwa ITS rDNA dari tujuh varietas asal Indonesia memiliki homologi identik

dengan negara lain, yakni India, Cina, Rusia, dan Taiwan. Namun terdapat perbedaan nukleotida asal India dan varietas Sintanur, Pertiwi, dan Gondo Roso yang terletak pada posisi nukleotida ke 448 (Gambar 3). Serta terdapat perbedaan nukleotida pada isolat Taiwan di posisi ke 216, 376, dan 448 terhadap isolat Inpari Sidenuk, Ciherang, Hibrida Prima, dan Pandan Wangi.



Gambar 2. Hasil amplifikasi daerah ITS rDNA *A. besseyi* (M) Marker 100pb (ThermoScientific USA); (1) Ciherang; (2) Gondo Roso; (3) Hibrida Prima; (4) Inpari Sidenuk; (5) Pandan Wangi; (6) Pertiwi; (7) Sintanur

	10	20	30	40	50	
A.b_Sintanur	GTGCCGGGTG	CGGATATTCG	ACGTCGTCGT	GAAGCACTCG	GTATTTCCCG	
A.b_Pertiwi	GTGCCGGGTG	CGGATATTCG	ACGTCGTCGT	GAAGCACTCG	GTATTTCCCG	
A.b_Inpari Sidenuk	GTGCCGGGTG	CGGATATTCG	ACGTCGTCGT	GAAGCACTCG	GTATTTCCCG	
A.b_Ciherang	GTGCCGGGTG	CGGATATTCG	ACGTCGTCGT	GAAGCACTCG	GTATTTCCCG	
A.b_Gondo Roso	GTGCCGGGTG	CGGATATTCG	ACGTCGTCGT	GAAGCACTCG	GTATTTCCCG	
A.b_Hibrida Prima	GTGCCGGGTG	CGGATATTCG	ACGTCGTCGT	GAAGCACTCG	GTATTTCCCG	
A.b_Pandan Wangi	GTGCCGGGTG	CGGATATTCG	ACGTCGTCGT	GAAGCACTCG	GTATTTCCCG	
A.b_India	GTGCCGGGTG	CGGATATTCG	ACGTCGTCGT	GAAGCACTCG	GTATTTCCCG	
A.b_Cina	GTGCCGGGTG	CGGATATTCG	ACGTCGTCGT	GAAGCACTCG	GTATTTCCCG	
A.b_Rusia	GTGCCGGGTG	CGGATATTCG	ACGTCGTCGT	GAAGCACTCG	GTATTTCCCG	
A.b_Taiwan	GTGCCGGGTG	CGGATATTCG	ACGTCGTCGT	GAAGCACTCG	GTATTTCCCG	
A.p_Ira	GCGT TGAGCG	CGTATATTCG	ACGTCGTCGT	GAA ACG CTCT	TCGTTG CCCCA	
Clustal Co	* * * * *	** * * * * *	* * * * * * *	*** * **	** * * *	
	
	60	70	80	90	100	
A.b_Sintanur	TCGCTGGTCT	CTTCAATGAG	ATTTTCAGTTT	TCAAAACGGC	TTCTCTGGGC	
A.b_Pertiwi	TCGCTGGTCT	CTTCAATGAG	ATTTTCAGTTT	TCAAAACGGC	TTCTCTGGGC	
A.b_Inpari Sidenuk	TCGCTGGTCT	CTTCAATGAG	ATTTTCAGTTT	TCAAAACGGC	TTCTCTGGGC	
A.b_Ciherang	TCGCTGGTCT	CTTCAATGAG	ATTTTCAGTTT	TCAAAACGGC	TTCTCTGGGC	
A.b_Gondo Roso	TCGCTGGTCT	CTTCAATGAG	ATTTTCAGTTT	TCAAAACGGC	TTCTCTGGGC	
A.b_Hibrida Prima	TCGCTGGTCT	CTTCAATGAG	ATTTTCAGTTT	TCAAAACGGC	TTCTCTGGGC	
A.b_Pandan Wangi	TCGCTGGTCT	CTTCAATGAG	ATTTTCAGTTT	TCAAAACGGC	TTCTCTGGGC	
A.b_India	TCGCTGGTCT	CTTCAATGAG	ATTTTCAGTTT	TCAAAACGGC	TTCTCTGGGC	
A.b_Cina	TCGCTGGTCT	CTTCAATGAG	ATTTTCAGTTT	TCAAAACGGC	TTCTCTGGGC	
A.b_Rusia	TCGCTGGTCT	CTTCAATGAG	ATTTTCAGTTT	TCAAAACGGC	TTCTCTGGGC	
A.b_Taiwan	TCGCTGGTCT	CTTCAATGAG	ATTTTCAGTTT	TCAAAACGGC	TTCTCTGGGC	
A.p_Iran	GTA CT ACTC	GGCT TGCCG	GTTT CAGT C	TCG AAACGGC	TTCTCTGGGC	
Clustal Co	***	*	* * * * * *	** * * * * *	* * * * * *	

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                110         120         130         140         150
A.b_Sintanur    CTCTATGTTG GATTGAGCAG TTGTGTTCCA CGTCCGTGGC TGCACGATG
A.b_Pertiwi     CTCTATGTTG GATTGAGCAG TTGTGTTCCA CGTCCGTGGC TGCACGATG
A.b_Inpari Sidenuk CTCTATGTTG GATTGAGCAG TTGTGTTCCA CGTCCGTGGC TGCACGATG
A.b_Ciherang    CTCTATGTTG GATTGAGCAG TTGTGTTCCA CGTCCGTGGC TGCACGATG
A.b_Gondo Roso  CTCTATGTTG GATTGAGCAG TTGTGTTCCA CGTCCGTGGC TGCACGATG
A.b_Hibrida Prima CTCTATGTTG GATTGAGCAG TTGTGTTCCA CGTCCGTGGC TGCACGATG
A.b_Pandan Wangi CTCTATGTTG GATTGAGCAG TTGTGTTCCA CGTCCGTGGC TGCACGATG
A.b_India       CTCTATGTTG GATTGAGCAG TTGTGTTCCA CGTCCGTGGC TGCACGATG
A.b_Cina        CTCTATGTTG GATTGAGCAG TTGTGTTCCA CGTCCGTGGC TGCACGATG
A.b_Rusia       CTCTATGTTG GATTGAGCAG TTGTGTTCCA CGTCCGTGGC TGCACGATG
A.b_Taiwan      CTCTATGTTG GATTGAGCAG TTGTGTTCCA CGTCCGTGGC TGCACGATG
A.p_Iran        CTCTATGTTG GATTGAGCAG TTGTGTTCCA CGTCCGTGGC TGCTGAGAAG
Clustal Co     *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                160         170         180         190         200
A.b_Sintanur    TCCAATAGTA GCACCGCTTC GCGGTGTTA GAGTTGATGA CCCGGTCGGG
A.b_Pertiwi     TCCAATAGTA GCACCGCTTC GCGGTGTTA GAGTTGATGA CCCGGTCGGG
A.b_Inpari Sidenuk TCCAATAGTA GCACCGCTTC GCGGTGTTA GAGTTGATGA CCCGGTCGGG
A.b_Ciherang    TCCAATAGTA GCACCGCTTC GCGGTGTTA GAGTTGATGA CCCGGTCGGG
A.b_Gondo Roso  TCCAATAGTA GCACCGCTTC GCGGTGTTA GAGTTGATGA CCCGGTCGGG
A.b_Hibrida Prima TCCAATAGTA GCACCGCTTC GCGGTGTTA GAGTTGATGA CCCGGTCGGG
A.b_Pandan Wangi TCCAATAGTA GCACCGCTTC GCGGTGTTA GAGTTGATGA CCCGGTCGGG
A.b_India       TCCAATAGTA GCACCGCTTC GCGGTGTTA GAGTTGATGA CCCGGTCGGG
A.b_Cina        TCCAATAGTA GCACCGCTTC GCGGTGTTA GAGTTGATGA CCCGGTCGGG
A.b_Rusia       TCCAATAGTA GCACCGCTTC GCGGTGTTA GAGTTGATGA CCCGGTCGGG
A.b_Taiwan      TCCAATAGTA GCACCGCTTC GCGGTGTTA GAGTTGATGA CCCGGTCGGG
A.p_Iran        TTGACGATC GCGTCGCTTC GCGGCGCTA GAGTTGATGA CCCGGTCGGG
Clustal Co     ** * * ** ***** ** * ** *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                210         220         230         240         250
A.b_Sintanur    CACCCAGAAC CAACAACCCA TTTTCAATTC TTCAATGCCA ACTAATCGAG
A.b_Pertiwi     CACCCAGAAC CAACAACCCA TTTTCAATTC TTCAATGCCA ACTAATCGAG
A.b_Inpari Sidenuk CACCCAGAAC CAACAACCCA TTTTCAATTC TTCAATGCCA ACTAATCGAG
A.b_Ciherang    CACCCAGAAC CAACAACCCA TTTTCAATTC TTCAATGCCA ACTAATCGAG
A.b_Gondo Roso  CACCCAGAAC CAACAACCCA TTTTCAATTC TTCAATGCCA ACTAATCGAG
A.b_Hibrida Prima CACCCAGAAC CAACAACCCA TTTTCAATTC TTCAATGCCA ACTAATCGAG
A.b_Pandan Wangi CACCCAGAAC CAACAACCCA TTTTCAATTC TTCAATGCCA ACTAATCGAG
A.b_India       CACCCAGAAC CAACAACCCA TTTTCAATTC TTCAATGCCA ACTAATCGAG
A.b_Cina        CACCCAGAAC CAACAACCCA TTTTCAATTC TTCAATGCCA ACTAATCGAG
A.b_Rusia       CACCCAGAAC CAACAACCCA TTTTCAATTC TTCAATGCCA ACTAATCGAG
A.b_Taiwan      CACCCAGAAC CAACAACCCA TTTTCAATTC TTCAATGCCA ACTAATCGAG
A.p_Iran        CACCCAGAAA CAACAACCCA ATAACACTA ATCAATGCCA ATAAAGGAG
Clustal Co     ***** ***** * ** * * ***** * * ** **

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                260         270         280         290         300
A.b_Sintanur    CAAGTTATGT CGGTGAATCA CTTGGCTCGT GGGTCGATGA AGAACGCAGT
A.b_Pertiwi     CAAGTTATGT CGGTGAATCA CTTGGCTCGT GGGTCGATGA AGAACGCAGT
A.b_Inpari Sidenuk CAAGTTATGT CGGTGAATCA CTTGGCTCGT GGGTCGATGA AGAACGCAGT
A.b_Ciherang    CAAGTTATGT CGGTGAATCA CTTGGCTCGT GGGTCGATGA AGAACGCAGT
A.b_Gondo Roso  CAAGTTATGT CGGTGAATCA CTTGGCTCGT GGGTCGATGA AGAACGCAGT
A.b_Hibrida Prima CAAGTTATGT CGGTGAATCA CTTGGCTCGT GGGTCGATGA AGAACGCAGT
A.b_Pandan Wangi CAAGTTATGT CGGTGAATCA CTTGGCTCGT GGGTCGATGA AGAACGCAGT
A.b_India       CAAGTTATGT CGGTGAATCA CTTGGCTCGT GGGTCGATGA AGAACGCAGT
A.b_Cina        CAAGTTATGT CGGTGAATCA CTTGGCTCGT GGGTCGATGA AGAACGCAGT

```

A.b_Rusia	CAAGTTATGT	CGGTGAATCA	CTTGGCTCGT	GGGTCGATGA	AGAACGCAGT
A.b_Taiwan	CAAGTTATGT	CGGTGAATCA	CTTGGCTCGT	GGGTCGATGA	AGAACGCAGT
A.p_Iran	AAAGTTATGT	CGGT G ATCA	CTTGGCTCGT	GGGTCGATGA	AGAACGCAGT
Clustal Co	*****	*****	*****	*****	*****

	310	320	330	340	350
A.b_Sintanur	GAATTGCGTT	AATAAGCACG	AATTACAGAT	ATTACGAGTG	CCTTGTTTTTC
A.b_Pertiwi	GAATTGCGTT	AATAAGCACG	AATTACAGAT	ATTACGAGTG	CCTTGTTTTTC
A.b_Inpari Sidenuk	GAATTGCGTT	AATAAGCACG	AATTACAGAT	ATTACGAGTG	CCTTGTTTTTC
A.b_Ciherang	GAATTGCGTT	AATAAGCACG	AATTACAGAT	ATTACGAGTG	CCTTGTTTTTC
A.b_Gondo Roso	GAATTGCGTT	AATAAGCACG	AATTACAGAT	ATTACGAGTG	CCTTGTTTTTC
A.b_Hibrida Prima	GAATTGCGTT	AATAAGCACG	AATTACAGAT	ATTACGAGTG	CCTTGTTTTTC
A.b_Pandan Wangi	GAATTGCGTT	AATAAGCACG	AATTACAGAT	ATTACGAGTG	CCTTGTTTTTC
A.b_India	GAATTGCGTT	AATAAGCACG	AATTACAGAT	ATTACGAGTG	CCTTGTTTTTC
A.b_Cina	GAATTGCGTT	AATAAGCACG	AATTACAGAT	ATTACGAGTG	CCTTGTTTTTC
A.b_Rusia	GAATTGCGTT	AATAAGCACG	AATTACAGAT	ATTACGAGTG	CCTTGTTTTTC
A.b_Taiwan	GAATTGCGTT	AATAAGCACG	AATTACAGAT	ATTACGAGTG	CCTTGTTTTTC
A.p_Iran	GAATTGCGTT	AATAAGCACG	AATTACAGAT	ATT A TGAGTG	CCTTGTTTTTC
Clustal Co	*****	*****	*****	****	*****

	360	370	380	390	400
A.b_Sintanur	GATTGCATAT	TGCGTCGTCG	GGTTCGCCC	TTCGACATAC	GCAGCTCAGG
A.b_Pertiwi	GATTGCATAT	TGCGTCGTCG	GGTTCGCCC	TTCGACATAC	GCAGCTCAGG
A.b_Inpari Sidenuk	GATTGCATAT	TGCGTCGTCG	GGTTCGCCC	TTCGACATAC	GCAGCTCAGG
A.b_Ciherang	GATTGCATAT	TGCGTCGTCG	GGTTCGCCC	TTCGACATAC	GCAGCTCAGG
A.b_Gondo Roso	GATTGCATAT	TGCGTCGTCG	GGTTCGCCC	TTCGACATAC	GCAGCTCAGG
A.b_Hibrida Prima	GATTGCATAT	TGCGTCGTCG	GGTTCGCCC	TTCGACATAC	GCAGCTCAGG
A.b_Pandan Wangi	GATTGCATAT	TGCGTCGTCG	GGTTCGCCC	TTCGACATAC	GCAGCTCAGG
A.b_India	GATTGCATAT	TGCGTCGTCG	GGTTCGCCC	TTCGACATAC	GCAGCTCAGG
A.b_Cina	GATTGCATAT	TGCGTCGTCG	GGTTCGCCC	TTCGACATAC	GCAGCTCAGG
A.b_Rusia	GATTGCATAT	TGCGTCGTCG	GGTTCGCCC	TTCGACATAC	GCAGCTCAGG
A.b_Taiwan	GATTGCATAT	TGCGTCGTCG	GGTTC C GCCC	TTCGACATAC	GCAGCTCAGG
A.p_Iran	GATTGCATAT	TGCG C CGTCG	GG C TCTGCC	TTCG G CATAC	AC GGCTCAGG
Clustal Co	*****	****	**	****	* *****

	410	420	430	440	450
A.b_Sintanur	GTGTTTTTCAT	GGAAAGGGAA	GCCAAATGCA	TTGTGTAATG	GTTTCGC T AT
A.b_Pertiwi	GTGTTTTTCAT	GGAAAGGGAA	GCCAAATGCA	TTGTGTAATG	GTTTCGC T AT
A.b_Inpari Sidenuk	GTGTTTTTCAT	GGAAAGGGAA	GCCAAATGCA	TTGTGTAATG	GTTTCGCCAT
A.b_Ciherang	GTGTTTTTCAT	GGAAAGGGAA	GCCAAATGCA	TTGTGTAATG	GTTTCGCCAT
A.b_Gondo Roso	GTGTTTTTCAT	GGAAAGGGAA	GCCAAATGCA	TTGTGTAATG	GTTTCGC T AT
A.b_Hibrida Prima	GTGTTTTTCAT	GGAAAGGGAA	GCCAAATGCA	TTGTGTAATG	GTTTCGCCAT
A.b_Pandan Wangi	GTGTTTTTCAT	GGAAAGGGAA	GCCAAATGCA	TTGTGTAATG	GTTTCGCCAT
A.b_India	GTGTTTTTCAT	GGAAAGGGAA	GCCAAATGCA	TTGTGTAATG	GTTTCGC T AT
A.b_Cina	GTGTTTTTCAT	GGAAAGGGAA	GCCAAATGCA	TTGTGTAATG	GTTTCGCCAT
A.b_Rusia	GTGTTTTTCAT	GGAAAGGGAA	GCCAAATGCA	TTGTGTAATG	GTTTCGCCAT
A.b_Taiwan	GTGTTTTTCAT	GGAAAGGGAA	GCCAAATGCA	TTGTGTAATG	GTTTCGC T AT
A.p_Iran	GTGTTTT A AC	G AA A CGG A	A CC A CG A TT	C AG A TT A AC G	GT T CC G ATT T
Clustal Co	*****	* **	****	* **	*** ** *

	460	470	480	490	500
A.b_Sintanur	CGAATCGTCG	ACTTTC C CCCA	CGGAATGCAG	TTGACGTGTT	CGCTTTGGTG
A.b_Pertiwi	CGAATCGTCG	ACTTTC C CCCA	CGGAATGCAG	TTGACGTGTT	CGCTTTGGTG
A.b_Inpari Sidenuk	CGAATCGTCG	ACTTTC C CCCA	CGGAATGCAG	TTGACGTGTT	CGCTTTGGTG

A.b_Ciherang	CGAATCGTCG	ACTTTCCCCA	CGGAATGCAG	TTGACGTGTT	CGCTTTGGTG
A.b_Gondo Roso	CGAATCGTCG	ACTTTCCCCA	CGGAATGCAG	TTGACGTGTT	CGCTTTGGTG
A.b_Hibrida Prima	CGAATCGTCG	ACTTTCCCCA	CGGAATGCAG	TTGACGTGTT	CGCTTTGGTG
A.b_Pandan Wangi	CGAATCGTCG	ACTTTCCCCA	CGGAATGCAG	TTGACGTGTT	CGCTTTGGTG
A.b_India	CGAATCGTCG	ACTTTCCCCA	CGGAATGCAG	TTGACGTGTT	CGCTTTGGTG
A.b_Cina	CGAATCGTCG	ACTTTCCCCA	CGGAATGCAG	TTGACGTGTT	CGCTTTGGTG
A.b_Rusia	CGAATCGTCG	ACTTTCCCCA	CGGAATGCAG	TTGACGTGTT	CGCTTTGGTG
A.b_Taiwan	CGAATCGTCG	ACTTTCCCCA	CGGAATGCAG	TTGACGTGTT	CGCTTTGGTG
A.p_Iran	CGCCTCTTCG	GCTGTCCCCA	CGGAC CGCCGG	CTGATGTGAG	GAAGCGGCA
Clustal Co	** * * *	** * * * * *	* * * *	* * *	**

		510	520	530	540
A.b_Sintanur	GCGTATTCTT	CGGAGTATGC	CTGTGATTAC	GTTGTTGTAC	TGTTCGAACG
A.b_Pertiwi	GCGTATTCTT	CGGAGTATGC	CTGTGATTAC	GTTGTTGTAC	TGTTCGAACG
A.b_Inpari Sidenuk	GCGTATTCTT	CGGAGTATGC	CTGTGATTAC	GTTGTTGTAC	TGTTCGAACG
A.b_Ciherang	GCGTATTCTT	CGGAGTATGC	CTGTGATTAC	GTTGTTGTAC	TGTTCGAACG
A.b_Gondo Roso	GCGTATTCTT	CGGAGTATGC	CTGTGATTAC	GTTGTTGTAC	TGTTCGAACG
A.b_Hibrida Prima	GCGTATTCTT	CGGAGTATGC	CTGTGATTAC	GTTGTTGTAC	TGTTCGAACG
A.b_Pandan Wangi	GCGTATTCTT	CGGAGTATGC	CTGTGATTAC	GTTGTTGTAC	TGTTCGAACG
A.b_India	GCGTATTCTT	CGGAGTATGC	CTGTGATTAC	GTTGTTGTAC	TGTTCGAACG
A.b_Cina	GCGTATTCTT	CGGAGTATGC	CTGTGATTAC	GTTGTTGTAC	TGTTCGAACG
A.b_Rusia	GCGTATTCTT	CGGAGTATGC	CTGTGATTAC	GTTGTTGTAC	TGTTCGAACG
A.b_Taiwan	GCGTATTCTT	CGGAGTATGC	CTGTGATTAC	GTTGTTGTAC	TGTTCGAACG
A.p_Iran	ATCCAGACCA	TTGCCTGCTA	TTACGAGTGA	AGTACTGTGT	GATTTAAACG
Clustal Co	* *	* *	* * * *	* * * *	** * * *
				
A.b_Sintanur	ATGTC				
A.b_Pertiwi	ATGTC				
A.b_Inpari Sidenuk	ATGTC				
A.b_Ciherang	ATGTC				
A.b_Gondo Roso	ATGTC				
A.b_Hibrida Prima	ATGTC				
A.b_Pandan Wangi	ATGTC				
A.b_India	ATGTC				
A.b_Cina	ATGTC				
A.b_Rusia	ATGTC				
A.b_Taiwan	ATGTC				
A.p_Iran	GTCC				
Clustal Co	* *				

Gambar 3. Hasil analisis penyejajaran runutan nukleotida daerah ITS rDNA menggunakan program *ClustalW* [tanda * menunjukkan nukleotida yang identik]

Hasil analisis tingkat kesamaan perunutan nukleotida menunjukkan bahwa runutan ITS rDNA empat isolat *A. besseyi* asal varietas Indonesia yakni Inpari Sidenuk, Ciherang, Hibrida Prima, dan Pandan Wangi memiliki homolog 100% dengan isolat yang berasal dari negara Cina dan Rusia. Sedangkan isolat asal India memiliki homologi 99.8% dan isolat asal Taiwan memiliki homologi 99.4% terhadap keempat isolat tersebut. Varietas Gondo Roso, Pertiwi, dan Sintanur memiliki homologi 100% dengan isolat yang berasal dari India. Sedangkan isolat asal Cina dan Rusia memiliki homologi 99.8% dan Taiwan 99.6% (Tabel 1). Menurut Khan *et al.* (2012), nilai tingkat kesamaan (homologi) lebih besar dari 90% pada perunutan

nukleotida antara satu nematoda dengan nematoda lainnya, maka dapat dikatakan merupakan spesies yang sama dan tidak ada perbedaan genetik walaupun terdapat pada komoditas yang berbeda.

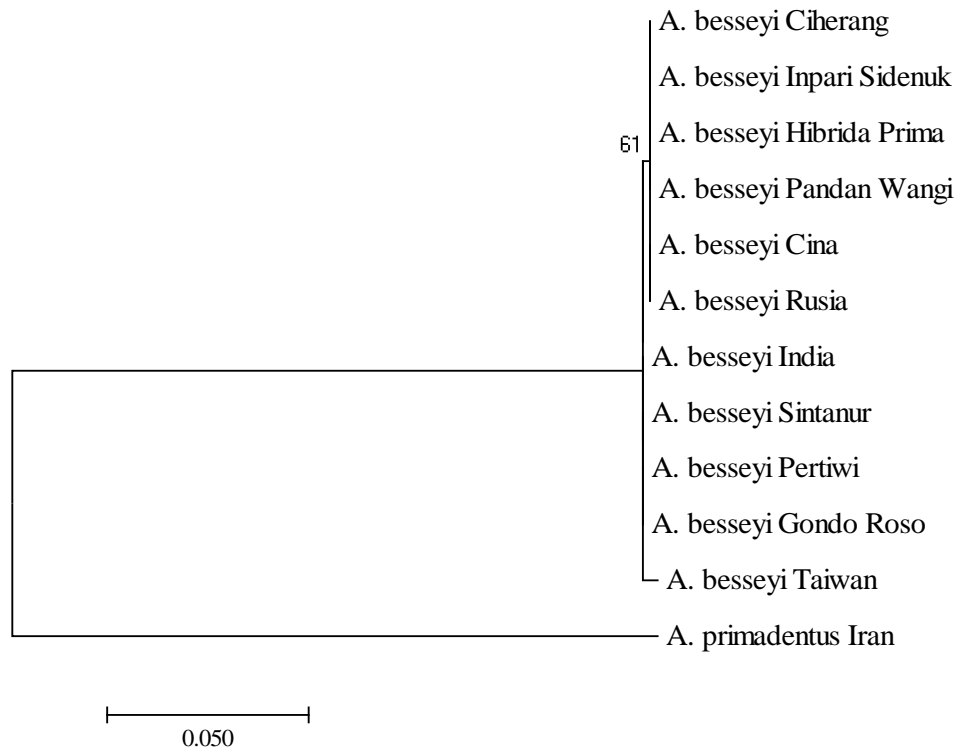
Menurut Elford & Stansfield (2007), faktor-faktor yang mempengaruhi tingkat keragaman spesies dalam suatu wilayah yakni jumlah individu, penyebaran wilayah geografis, dan sistem genetiknya. Berdasarkan hasil analisis penyejajaran menunjukkan kesamaan runutan nukleotida yang tinggi dari tujuh isolat *A. besseyi* asal Indonesia memiliki tingkat kesamaan (homologi) di atas 90%. Tingkat kesamaan (homologi) berdasarkan runutan nukleotida yang dimiliki isolat Inpari Sidenuk, Ciherang, Hibrida Prima, dan

Pandan Wangi dengan negara Cina dan Rusia mencapai 100% (identik). Isolat Sintanur, Pertiwi, dan Gondo Roso memiliki homologi 100% berdasarkan runutan nukleotida dengan isolat dari India (Tabel 1). Persamaan morfologi dan

genetika dari suatu populasi dapat memiliki tingkat kedekatan hubungan kekerabatan yang tinggi yang dipengaruhi oleh keadaan lingkungan (Sofro, 1994).

Tabel 1. Tingkat kesamaan (homologi) runutan nukleotida ITS rDNA *A. besseyi* isolat asal tujuh varietas Indonesia dibandingkan dengan *GenBank* menggunakan program *Bioedit v.7.2.6*

No. Akses	Asal Isolat	Homologi (%)												
		Sintanur	Pertiwi	Inpari Sidenuk	Ciherang	Gondo Roso	Hibrida Prima	Pandan Wangi	India	Cina	Rusia	Taiwan	Iran	
-	<i>A. besseyi</i> Sintanur Indonesia	-												
-	<i>A. besseyi</i> Pertiwi Indonesia	100	-											
-	<i>A. besseyi</i> Inpari Sidenuk Indonesia	99.8	99.8	-										
-	<i>A. besseyi</i> Ciherang Indonesia	99.8	99.8	100	-									
-	<i>A. besseyi</i> Gondo Roso Indonesia	100	100	99.8	99.8	-								
-	<i>A. besseyi</i> Hibrida Prima Indonesia	99.8	99.8	100	100	99.8	-							
-	<i>A. besseyi</i> Pandan Wangi Indonesia	99.8	99.8	100	100	99.8	100	-						
JF932290.1	<i>A. besseyi</i> India	100	100	99.8	99.8	100	99.8	99.8	-					
KJ009342.1	<i>A. besseyi</i> Cina	99.8	99.8	100	100	99.8	100	100	99.8	-				
EU186069.1	<i>A. besseyi</i> Rusia	99.8	99.8	100	100	99.8	100	100	99.8	100	-			
MF669503.1	<i>A. besseyi</i> Taiwan	99.6	99.6	99.4	99.4	99.6	99.4	99.4	99.6	99.4	99.4	-		
MF991962.1	<i>A. primadentus</i> Iran	74.5	74.5	74.4	74.4	74.5	74.4	74.4	74.5	74.4	74.4	74.2	-	



Gambar 4. Filogenetika isolat *A. besseyi* beberapa negara berdasarkan peruntukan nukleotida ITS rDNA menggunakan program MEGA v.7.0 dengan metode *Maximum Likelihood* dengan bootstrap 1000×

Filogenetika *Aphelenchoides besseyi*

Analisis filogenetika pada kladogram menunjukkan bahwa hubungan kekerabatan setiap isolat terbagi menjadi dua kelompok (Gambar 4). Kelompok pertama terdiri dari isolat asal Ciherang, Inpari Sidenuk, Hibrida Prima, Pandan Wangi, Cina, dan Rusia. Kelompok kedua terdiri dari isolat asal India, Sintanur, Pertiwi, dan Gondo Roso, serta isolat asal Iran sebagai *outgroup*. Pembentukan *phylogenetic tree* sangat memerlukan *outgroup* yang merupakan isolat yang memiliki perbedaan yang nyata dengan runutan lainnya, namun masih memiliki kedekatan. *Outgroup* yang terlalu jauh dapat menyebabkan terjadinya kesalahan dalam pembuatan *Phylogenetic tree* (Dharmayanti, 2011).

Analisis filogenetik merupakan proses pengolahan data sekuen DNA atau protein sehingga diperoleh suatu hasil yang menggambarkan hubungan kekerabatan evolusi suatu kelompok organisme (Hidayat & Pancoro, 2008). Proses analisis filogenetik nematoda digunakan hasil peruntukan nukleotida untuk mengetahui asal usul nematoda yang terbawa benih. Isolat *A. besseyi* asal Indonesia Inpari Sidenuk, Ciherang, Pandan Wangi, dan Hibrida Prima berada pada kelompok yang sama yakni kelompok monofiletik dengan isolat asal Rusia dan Cina, sehingga dapat dikatakan memiliki asal usul yang sama begitu juga isolat Indonesia Sintanur, Pertiwi, dan Gondo Roso berada pada kelompok monofiletik dengan isolat asal India.

KESIMPULAN

ITS rDNA *Aphelenchoides besseyi* asal tujuh varietas padi Indonesia berhasil diamplifikasi menggunakan primer spesifik. Ukuran fragmen ITS rDNA diamplifikasi sekitar ± 750 pb. Hasil peruntukan nukleotida yang diperoleh berukuran 555 nukleotida. Berdasarkan hasil analisis penyejajaran diketahui bahwa isolat ITS rDNA *A. besseyi* asal varietas Inpari Sidenuk, Ciherang, Hibrida Prima, dan Pandan Wangi memiliki homologi nukleotida 100% dengan isolat asal Cina dan Rusia, sedangkan isolat asal Sintanur, Pertiwi, dan Gondo Roso memiliki homologi 100% dengan isolat asal India. Berdasarkan analisis filogenetika terdapat *outgroup* dari isolat ITS rDNA *A. primadentus* asal Iran yang memiliki homologi nukleotida sebesar 74.5%. Hal ini menunjukkan bahwa isolat *A. besseyi* asal Indonesia memiliki kesamaan identik dan berkerabat sangat dekat dengan isolat asal Cina, Rusia, dan India.

DAFTAR PUSTAKA

- Dharmayanti, N.L.P.I. 2011. Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme. *Wartazoa*. 21(30): 1-10.
- Doyle, J.J., J.L. Doyle. 1990. A Rapid Total DNA Preparation Procedure for Fresh Plant Tissue. *Focus*. 12:13-15.

- Elford, S.L., W.D. Stainsfield. 2007. *Genetika*. Damarlingtyas, penerjemah. Jakarta. Erlangga.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2005. Pest Rial Analysis *Aphelenchoides besseyi* Christie on Rice (*Oryza sativa* L.). Italy. Rise Research Centre.
- Gomes, E.A., M.C. Kasaya, E.G. deBarros, A.C. Borgs, E.F. Araujo. 2002. Polymorphism in The Internal Transcribed Spacer (ITS) of The Ribosomal DNA of 26 Isolates of Ectomycorrhizal Fungi. *Genet Mol Biol*. 25(4):477-483.
- Hall, T.A. 1999. Bioedit: a User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysisprogram For Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hidayat, T., A. Pancoro. 2008. Kajian Filogenetika Molekuler dan Peranannya dalam Menyediakan Informasi Dasar untuk Meningkatkan Kualitas Sumber Genetik Angrek. *J ArgoBiogen*. 4(1):35-40.
- Kementerian Pertanian Republik Indonesia. 2015. Peraturan Menteri Pertanian Nomor 51/Permentan/KR.010/9/2015. Jakarta. Kementan.
- Kementerian Pertanian Republik Indonesia. 2018. Peraturan Menteri Pertanian Nomor 31/Permentan/KR.010/7/2018. Jakarta. Kementan.
- Khan, M.R., Z.A. Handoo, U Rao, S.B. Rao, J.S. Prasad. 2012. Observations on The Foliar Nematode, *Aphelenchoides besseyi*, Infecting Tuberose and Rice in India. *J Nematol*. 44(4):391-398.
- Kurniawati, F., Supramana. 2016. Tingkat Infestasi *Aphelenchoides besseyi* pada Benih Padi di Bogor. *Jurnal Fitopatol Indones*. 12 (1): 34-37. Doi 10.14692/jfi.12.1.34.
- National Center for Biotechnology Information. 2014. *Basic Local Alignment Search Tool*. [Internet]. [Diakses 2015 Mei 20]. Tersedia pada: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.
- O'Brien, H.E., J.L. Parent, J.A. Jackson, J.M. Moncalvo, & R. Vilgalys. 2005. Fungal Communities' Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. *Environ Microbiol* 71: 5544-5550.
- Remeus, P.M., N. Pelazza. 2014. Detection of *Aphelenchoides besseyi* on *Oryza sativa*. Di dalam: B. Kaufman, R. El-Khadem, P. Muschick, & J. Taylor, editor. *International Rules of Seed Testin*. Bassersdorf. ISTA.
- Sofro, A.S.M. 1994. *Keanekaragaman Genetik*. Yogyakarta. Andi Offset.
- Vrain, T.C., D.G. McNamara. 1994. Potential for Identification of Quarantine Nematodes by PCR. *EPPO Bulletin*. 24:453-458.