

***Meloidogyne incognita* Penyebab Umbi Berbintil pada Kentang di Beberapa Sentra Produksi Kentang di Jawa**

Meloidogyne incognita Causing Pimple-Like Knot on Potatoes in Several Provinces in Java

Aprilyani, Supramana*, Gede Suastika
Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

ABSTRAK

Nematoda puru akar (*Meloidogyne* spp.) merupakan salah satu nematoda yang terdapat pada tanaman kentang di daerah tropik dan subtropik. Nematoda ini memberikan dampak yang nyata dalam mengurangi kualitas dan kuantitas umbi kentang. Nematoda ini mempunyai beberapa spesies, salah satunya *Meloidogyne incognita*. Penelitian bertujuan mendeteksi dan mengidentifikasi spesies *M. incognita* pada kentang dan hubungan kekerabatannya dengan spesies dari negara lain. Umbi kentang bergejala bintil dikumpulkan dari Pangalengan (Jawa Barat), Banjarnegara (Jawa Tengah), dan Kota Batu (Jawa Timur). Identifikasi dilakukan berdasarkan pola perineal nematoda betina dan karakter molekul DNA dengan teknik *polymerase chain reaction* menggunakan sepasang primer spesifik (MI-F dan MI-R) dan dilanjutkan dengan sikuensing fragmen DNA dan analisis filogenetika. Dari 3 lokasi pengamatan berhasil diidentifikasi *M. incognita*. Nematoda asal Pangalengan memiliki tingkat homologi 99.2% hingga 99.8% dengan nematoda asal Cina, India, dan Malaysia.

Kata kunci: analisis filogenetika, deteksi, *polymerase chain reaction*

ABSTRACT

Root knot nematodes is an important pathogen on potatoes in tropical and sub-tropical areas. Root knot nematodes contribute a significant impact in reducing the quality and quantity of potato tuber. *Meloidogyne incognita* is one of the species causing the root knot. This research was conducted to identify *M. incognita* on potatoes in Java island based on morphological and DNA molecular characteristic. The infected potato tubers with pimple-like knot symptom were collected from Pangalengan (West Java), Banjarnegara (Central Java), and Kota Batu (East Java). Nematode was identified based on morphological character of perineal pattern of female nematodes, and molecular DNA character by polymerase chain reaction technique using a pair of specific primer (MI-F and MI-R), followed by DNA fragment sequencing and phylogenetic analysis. Based on morphological character of perineal pattern, *M. incognita* was detected in all 3 locations; while based on DNA molecular character, *M. incognita* was detected in Pangalengan (West Java) and Kota Batu (East Java). *M. incognita* from Pangalengan had high homology, i.e.99.2% to 99.8% with those isolates from China, India, and Malaysia.

Key words: detection, phylogenetic analysis, polymerase chain reaction

*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jalan Kamper, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680.
Tel: 0251-8629364, Faks: 0251-8629362, Surel: supramana@ipb.ac.id

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki sentra produksi kentang di antaranya Pulau Jawa. Pada tahun 2012 luas panen kentang 65 989 ha dengan produktivitas 16.58 ton ha⁻¹, sedangkan pada tahun 2013 luas panen kentang 62 900 ha dengan produktivitas 16.27 ton ha⁻¹ (BPS 2014). Salah satu faktor penyebab penurunan ini ialah serangan nematoda puru akar (*Meloidogyne* spp.).

Terdapat 6 spesies utama *Meloidogyne* yang merugikan secara ekonomi, yaitu *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. hapla*, *M. fallax* dan *M. chitwoodi* (Adam *et al.* 2007). *M. arenaria*, *M. incognita*, dan *M. javanica* pernah dilaporkan menyerang kentang di Jawa Barat dengan gejala khas bintil pada umbi (Kalshoven 1981).

Informasi mengenai spesies *Meloidogyne* yang menginfeksi kentang di Indonesia masih terbatas sehingga nematoda ini perlu diidentifikasi. Metode identifikasi didasarkan pada karakter morfologi (Eisenback *et al.* 1980). Kini identifikasi dapat dilakukan berdasarkan karakter molekul DNA dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) (Zijlstra *et al.* 2000).

Tujuan penelitian ialah mendeteksi dan mengidentifikasi spesies *M. incognita* penyebab umbi berbintil pada kentang di 3 sentra produksi kentang di Pulau Jawa serta menentukan hubungan filogenetika antara spesies *M. incognita* yang ada di Pangalengan, Jawa Barat dengan spesies *M. incognita* yang ada di negara lain.

BAHAN DAN METODE

Koleksi Sampel Umbi

Pengambilan sampel dilakukan di tempat penangkaran benih kentang, yaitu Desa Marga Mukti, Kecamatan Pangalengan, Kabupaten Bandung (Jawa Barat); Desa Wanayasa, Kecamatan Batur, Kabupaten Banjarnegara (Jawa Tengah); dan Desa Sumber Brantas, Kecamatan Bumiaji, Kota Batu (Jawa Timur). Sampel umbi yang diambil ialah yang bergejala bintil. Umbi kemudian dimasukkan

ke dalam amplop kertas dan dijaga suhunya agar tetap stabil.

Identifikasi Spesies *Meloidogyne* Berdasarkan Karakter Morfologi

Umbi berbintil yang diduga terinfeksi nematoda dipilih untuk mendapatkan betina dewasa. Nematoda betina dewasa dipisahkan dari jaringan kentang menggunakan jarum preparat dan diletakkan di dalam cawan sirakus yang telah diberi air. Pembuatan preparat pola perineal nematoda betina dilakukan dengan memotong bagian anterior dan posterior betina dengan skalpel dan dibersihkan menggunakan asam laktat 45%. Potongan bagian posterior nematoda betina dibuat preparat dengan medium laktofenol biru kemudian diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400×. Identifikasi *Meloidogyne* menggunakan kunci identifikasi Eisenback dan Triantaphyllou (1991).

Identifikasi *Meloidogyne* Berdasarkan Karakter Molekul DNA

Identifikasi spesies *Meloidogyne* menggunakan teknik PCR dilakukan dengan membandingkan sikuen ITS-rDNA_v (r-DNA ITS PCR teknik) teramplifikasi dari nematoda dengan sikuen standar yang terdaftar di GeneBank.

Ekstraksi Nematoda Betina. Ekstraksi nematoda betina menggunakan metode Tesarova *et al.* (2003). Sebanyak 10–20 ekor nematoda betina dipisahkan dari umbi berbintil, kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikro 1.5 mL dan ditambahkan 150 µL bufer ekstrak (200 mM Tris-HCl: pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA dan SDS 0.5%). Setelah itu nematoda digerus dengan mikropistil steril dan ditambahkan kloroform isoamilalkohol sebanyak 150 µL, dihomogenasi selama 3 menit, dan disentrifugasi dengan kecepatan 11 000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dimasukkan ke dalam tabung mikro baru, dan ditambahkan larutan sodium asetat 3 M (pH 5.2) sebanyak 0.5 volume. Setelah itu tabung tersebut dibolak-balik dan disimpan di lemari pendingin pada suhu 20 °C selama 10 menit. Suspensi yang didapat disentrifugasi

pada kecepatan 12 000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk dimasukkan ke dalam tabung mikro baru dan ditambah 2/3 volume isopropanol, kemudian dibolak-balik dan disimpan pada suhu ruang selama 30 menit. Suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 12 000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang, kemudian ditambahkan 200 mL etanol 80% untuk mencuci pelet (endapan DNA), kemudian cairan pelet disentrifugasi dengan kecepatan 12 000 rpm selama 15 menit. Cairan etanol dibuang dan endapan DNA dikeringanginkan dengan cara membalik tabung mikro. Bufer TE (10 mM Tris-HCl: pH 8.0, 1 mM EDTA) ditambahkan ke tabung mikro sesuai dengan ketebalan endapan DNA, pada endapan yang tipis sebanyak 30–40 µL dan untuk endapan yang tebal 50–100 µL.

Amplifikasi DNA. Amplifikasi DNA menggunakan primer spesifik MI-F (*primer forward*) (5'-GTG AGG ATT CAG TCT CCCAG-3') dan MI-R (*primer reverse*) (5'-ACG AGG AAC ATA CTT CTC CGT CC-3') (Meng *et al.* 2004). Pereaksi PCR dengan primer yang spesifik, yaitu 12.5 µL 2× Master mix (KAPPA), 1 µL primer forward 10 µM, 1 µL primer reverse 10 µM, 2 µL DNA, dan 8.5 µL dH₂O sehingga total volume reaksi 25 µL. Selanjutnya dilakukan amplifikasi mesin PCR (*thermo cycler*) (Tabel 1).

Hasil amplifikasi dianalisis untuk melihat fragmen DNA melalui elektroforesis menggunakan gel agarosa 1%, dalam 90 mL bufer TAE 2×. Pengukuran fragmen DNA menggunakan penanda 100 pb DNA *ladder* (Fermentas, US). Sampel disiapkan dengan mencampur 5 µL DNA, 2 µL gel *red* 1%, dan 2 µL *loading dye*, kemudian sampel

diisikan dalam sumuran gel sebanyak 9 µL menggunakan pipet mikro. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 50 volt DC selama 60 menit. Hasil elektroforesis divisualisasikan dengan gel doc (BIORAD).

Sikuen hasil PCR dilanjutkan untuk sampel yang positif. Hasil sikuen dianalisis menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dengan program optimasi untuk mendapatkan urutan basa DNA yang terdapat dalam situs National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Pembentukan pohon filogeni dengan perangkat lunak Clustal W (Bioedit versi 7.0.5) dan program Mega versi 5.05. berdasarkan pendekatan *Neighbour Joining*.

HASIL

Koleksi Sampel Umbi

Lokasi pengumpulan sampel umbi ber-gejala bintil dari penangkar benih kentang di sentra produksi kentang di Desa Margamukti, Kecamatan Pangalengan, Kabupaten Bandung (Jawa Barat) terletak pada ketinggian 1470 m di atas permukaan laut (dpl) (S: 07° 11' 87,6'' E: 107° 36' 49,7'') dengan suhu 20 °C; Desa Wanayasa, Kecamatan Batur, Kabupaten Banjarnegara (Jawa Tengah) terletak pada ketinggian 1400 m dpl (S: 07° 12' 08.7'' E: 109° 46' 05,7'') dengan suhu 20 °C; dan Desa Sumber Brantas, Kecamatan Bumiaji, Kota Batu (Jawa Timur) terletak pada ketinggian 1635 m dpl (S: 07° 76' 35,9'' E: 112° 52' 54,5'').

Umbi kentang yang terinfeksi *Meloidogyne* spp. memiliki gejala permukaan umbi tidak rata, bergelombang dan berbintil, dan terkadang disertai dengan adanya serangan dari patogen lain sehingga umumnya umbi cepat busuk. Pada umbi sampel yang berasal dari Pangalengan terdapat gejala yang sangat berbeda dari umbi yang berasal dari Banjarnegara dan Kota Batu. Umbi yang berasal dari Pangalengan permukaan luarnya terlihat bergelombang dan menonjol; sedangkan umbi yang berasal dari Banjarnegara permukaan umbinya seperti merekah, pecah, dan terdapat tonjolan-tonjolan yang melebar. Gejala pada permukaan umbi

Tabel 1. Amplifikasi fragmen ITS-rDNA *Meloidogyne incognita* menggunakan PCR

Tahapan	Kondisi
Denaturasi awal	95 °C; 2'
Denaturasi selanjutnya	94 °C; 30''
Aneling	57 °C; 45''
Pemanjangan pertama	72 °C; 2'
Pemanjangan akhir	72 °C; 10'
Jumlah siklus	35

yang berasal dari Kota Batu hanya berupa bintil-bintil kecil seperti jerawat (Gambar 1).

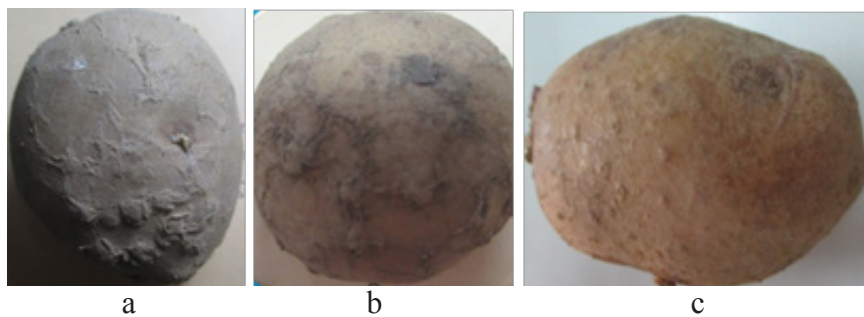
Bagian umbi yang terserang nematoda puru akar bila kulit luarnya dikupas akan terlihat titik-titik berwarna krem kekuningan yang merupakan nematoda betina bila dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran rendah. Satu titik pada umbi tersebut berisi nematoda betina dengan massa telur dari berbagai stadium. Beberapa telur tampak sudah menetas menjadi juvenil instar 2 (Gambar 2). Juvenil instar 2 merupakan fase yang aktif dan paling merusak.

Identifikasi Spesies *Meloidogyne* Berdasarkan Karakter Morfologi

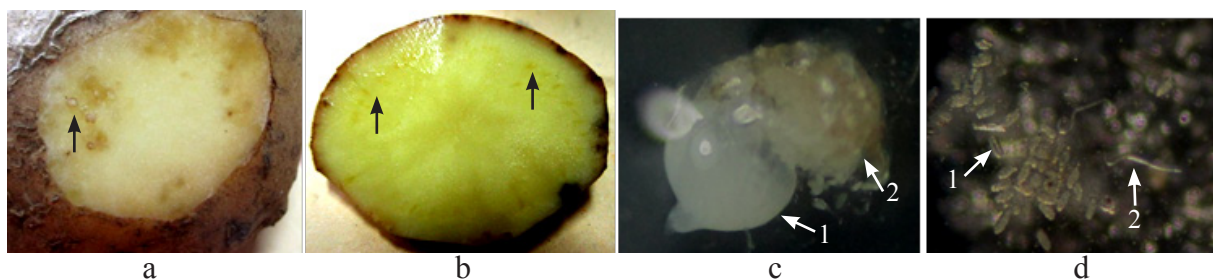
Hasil pengamatan pola perineal *Meloidogyne* spp. betina dari Pangalengan, Banjarnegara, dan Kota Batu tampak pola lengkung dorsal yang tinggi, berbentuk persegi, pola striasinya bergelombang dan terlihat kasar serta tidak tampak ada garis lateral (Gambar 3).

Identifikasi Spesies *Meloidogyne* Berdasarkan Karakter Molekul DNA

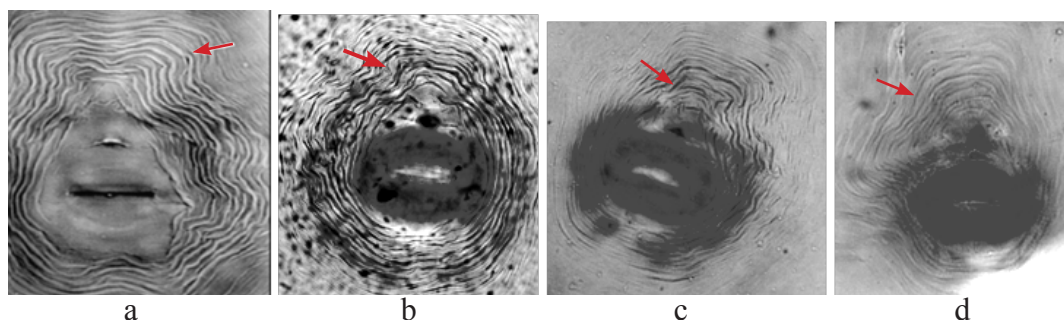
Metode ini menggunakan struktur asam nukleat, yaitu *internal transcribed spacer*



Gambar 1 Variasi gejala yang disebabkan oleh *Meloidogyne* spp. pada umbi kentang varietas Granola. a, permukaan kulit umbi tidak rata; b, bergelombang; c, berbintil.

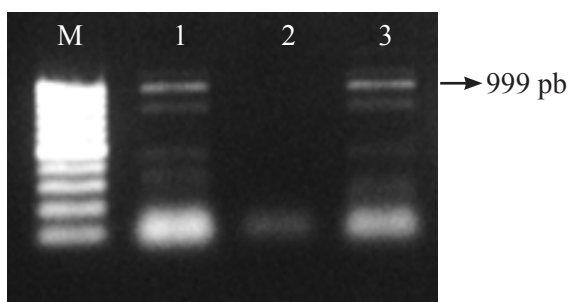


Gambar 2 Gejala serangan nematoda puru akar dan massa telur *Meloidogyne* spp. pada jaringan umbi kentang. a dan b, nekrosis pada jaringan bagian dalam umbi yang berisi nematoda betina dan massa telur; c, 1, betina dewasa dan 2, massa telur; d, 1, telur dan 2, juvenil instar 2.



Gambar 3 Pola perineal *Meloidogyne incognita*. a, *M. incognita* menurut Eisenback 2003; b, *M. incognita* sampel Pangalengan; c, *M. incognita* sampel Banjarnegara; d, *M. incognita* sampel Kota Batu. Tanda panah menunjukkan lengkung dorsal *M. incognita* yang tinggi, bergelombang dan berbentuk persegi; perbesaran 400 \times .

(ITS) rDNA sebagai dasar untuk menentukan karakter dan mengidentifikasi spesies nematoda parasit tanaman. Karakter (ITS) rDNA dapat digunakan untuk mengetahui tingkat kekerabatan suatu spesies dengan spesies yang sama dari negara lain. Produk PCR menggunakan primer spesifik *M. incognita* berhasil mengamplifikasi pita DNA pada 999 pb pada sampel asal Pangalengan dan Kota Batu (Gambar 4).



Gambar 4 Visualisasi hasil amplifikasi menggunakan primer spesifik *Meloidogyne incognita*. M, penanda 100 pb; 1, sampel Pangalengan; 2, sampel Banjarnegara; 3, sampel Kota Batu.

Hasil sikuen nukleotida NPA asal Pangalengan memiliki tingkat kemiripan yang sangat tinggi (homologi) dengan *M. incognita* asal Cina sebesar 99.8% (Tabel 2). Analisis filogenetika menunjukkan bahwa *M. incognita* asal Pangalengan berkerabat dengan *M. incognita* asal Malaysia, India dan Cina. (Gambar 5).

PEMBAHASAN

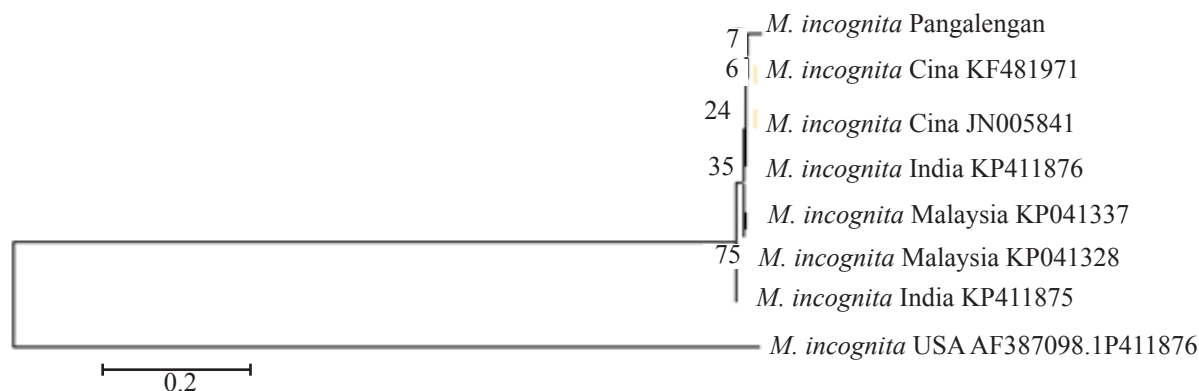
Meloidogyne incognita ditemukan dalam jaringan umbi kentang di Pangalengan, Banjarnegara dan Kota Batu. Hal ini diketahui berdasarkan pola parenial nematoda betina, yaitu memiliki striae lengkung dorsal yang tinggi dengan striae yang halus hingga bergelombang, dimana beberapa striae menggarpu di dekat garis lateral namun garis lateral tidak terlalu jelas. Karakter ini sesuai dengan yang dilaporkan Eisenback *et al.* (1981).

Identifikasi spesies *Meloidogyne* berdasarkan karakter molekul DNA menunjukkan

Tabel 2. Homologi sikuen nukleotida *Meloidogyne incognita* asal Pangalengan dengan *M. incognita* yang ada di GenBank

No.	Asal isolat	Homologi (%)						
		1	2	3	4	5	6	7
1	<i>M. incognita</i> Pangalengan	ID						
2	<i>M. incognita</i> Cina (JN005841)	99.8	ID					
3	<i>M. incognita</i> India (KP411876)	99.6	99.8	ID				
4	<i>M. incognita</i> Malaysia (KF041337)	99.2	99.4	99.2	ID			
5	<i>M. arenaria</i> USA (AF387098.1)	35.8	35.9	35.9	36.1	ID		
6	<i>M. hapla</i> Cina (JX024147.1)	37.0	36.8	36.8	36.6	33.8	ID	
7	<i>M. javanica</i> Pangalengan	32.2	32	31.9	32.2	36.5	28.9	ID

Tingkat kemiripan basa nukleotida *M. incognita* dihitung menggunakan Program Bioedit versi 6.05



Gambar 5 Pohon filogeni *Meloidogyne incognita* yang menginfeksi kentang di Pangalengan, Jawa Barat.

bahwa spesies *M. incognita* terdeteksi pada umbi kentang berbintil di Pangalengan dan Kota Batu. Primer spesifik *M. incognita* asal Pangalengan dan Kota Batu berhasil mengamplifikasi pita DNA pada 999 pb. Menurut Adam *et al.* (2007) hanya primer spesifik *M. incognita* yang didesain oleh Meng *et al.* (2004) secara konsisten mengamplifikasi produk PCR dan menghasilkan pita DNA 999 pb.

Perbedaan hasil antara identifikasi berdasarkan morfologi pola perineal nematoda betina dengan karakter molekul DNA disebabkan nematoda yang terpilih untuk diekstraksi bukan *M. incognita* sehingga tidak teramplifikasi dengan menggunakan primer spesifik *M. incognita*. Hal ini dikarenakan *Meloidogyne* terdiri atas beberapa spesies dan lebih dari satu spesies dapat menginfeksi bersama dalam satu tanaman (Devran dan Sogut 2009).

Pada bagian umbi yang terserang memperlihatkan gejala seperti nekrosis yang disebabkan oleh aktivitas massa gelatin yang menyebabkan terjadinya efek pektinolitik pada umbi. Ini merupakan salah satu ciri adanya nematoda parasit pada jaringan inang. Pada akar, sekresi enzim selulase dan pektinase oleh nematoda juga mampu mendegradasi sel hingga ujung akar sehingga menyebabkan luka dan pecah pada jaringan akar. Dengan demikian auksin tidak aktif dan menyebabkan terhambatnya pertumbuhan tanaman (Agrios 2005).

M. incognita dilaporkan sebagai penyebab umbi bercabang pada wortel di daerah Jawa Timur, Jawa Tengah, dan Jawa Barat (Hikmia *et al.* 2012; Taher *et al.* 2012; Halimah *et al.* 2013). *M. incognita* juga dilaporkan pada kentang di daerah Jawa Tengah, dan Jawa Barat (Kalshoven 1981). *M. incognita* asal Pangalengan memiliki tingkat homologi sangat tinggi dengan *M. incognita* asal Cina sebesar 98.2%. Analisis filogenetika menunjukkan bahwa *M. incognita* asal Pangalengan berkerabat dengan *M. incognita* asal Malaysia, India dan Cina. Kedekatan hubungan kekerabatan antara *M. incognita* asal Pangalengan dengan isolat asal Cina

menunjukkan kemungkinan adanya faktor pemasukan umbi (kentang dan wortel) dari negara tersebut sebagai penyebab tersebarnya nematoda puru akar ini. Pusdatin (2013) mencatat bahwa Cina termasuk salah satu negara pengeksport benih kentang ke Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Adam MAM, Phillips MS, Blok VC. 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically import species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathol.* 56:190–197.
- Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. Ed ke-5. New York (US): Academic Pr.
- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2014. Luas Panen, Produksi dan Produktivitas Kentang, 2009-2013. http://www.pbs.go.id/tab_sub/view.php?kat=3dantabel=1dandaftar=1dandid_subyek=55dannotab=62 [diakses 4 April 2014].
- Devran Z, Sogut M A. 2009. Distribution and identification of root knot nematodes from Turkey. *J Nematol.* 41(2):128–133.
- Eisenback JD. 2003. *Nematology Laboratory Investigations Morphology and Taxonomy*. Blacksburg, Virginia (US): Departement of Plant Pathology, Physiology, and Weed Science, Virginia Polytechnic Institute & State University.
- Eisenback JD, Hirschmann H, Triantaphyllou AC. 1980. Morphological comparison of *Meloidogyne* female head structure, perineal pattern, and stylets. *J Nematol.* 12(4):300–313.
- Eisenback JD, Hirschmann H, Sasser JN, Triantaphyllou AC. 1981. *A guide to the four most common species of root-knot nematodes (Meloidogyne spp.), with a pictorial key*. Raleigh (US): Departments of Plant Pathology and Genetics, North Carolina State University. Hlm 17–21.
- Eisenback JD, Triantaphyllou AC. 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. Di dalam: Nickle WR, editor. *Manual of Agricultural Nematology*. New York (US): Marcel Dekker Inc. Hlm: 191– 274.

- Halimah, Supramana, Suastika G. 2013. Identifikasi spesies *Meloidogyne* pada wortel berdasarkan sikuen nukleotida. J Fitopatol Indones. 9(1):1–6. DOI: <http://dx.doi.org/10.14692/jfi.9.1.1>.
- Hikmia Z, Supramana, Suastika G. 2012. Identifikasi spesies *Meloidogyne* spp. penyebab umbi bercabang pada tanaman wortel di Jawa Timur. J Fitopatol Indones. 8(3):73–78.
- Kalshoven LGE. 1981. *The Pests of Crops in Indonesia*. PA van Der Laan, penerjemah. Jakarta (ID): Ichtar Baru. Terjemahan dari: *De Plagen van de Cultuurgewassen in Indonesie*.
- Meng QP, Long H, Xu JH. 2004. PCR assay for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, and *M. arenaria*. Acta Phytopathol Sinica. 34(3):204–210.
- [Pusdatin] Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian. 2013. Kentang. Buletin Konsumsi Pangan 4(1):15–24.
- Taher M, Supramana, Suastika G. 2012. Identifikasi *Meloidogyne* penyebab penyakit umbi bercabang pada wortel di Dataran Tinggi Dieng. J Fitopatol Indones. 8(1):16–21. DOI: <http://dx.doi.org/10.14692/jfi.8.1.16>.
- Tesarova B, Zouhar M, Rysanek P. 2003. Development of PCR for specific determination of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Plant Protect. 39(1):23–28.
- Zijlstra C, Donkers-Venne DTHM, Fargette M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified region (SCAR) based PCR assays. Nematology. 2(8):847–853. DOI: <http://dx.doi.org/10.1163/156854100750112798>.