

Identifikasi Spesies *Meloidogyne* pada Wortel berdasarkan Sikuen Nukleotida

Species Identification of *Meloidogyne* on Carrot based on Their Nucleotide Sequences

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

ABSTRAK

Nematoda puru akar (NPA), *Meloidogyne* spp., telah dilaporkan menjadi penyebab umbi bercabang pada wortel di beberapa sentra produksi sayuran di Jawa Tengah dan Jawa Timur. Pada penelitian ini dilakukan identifikasi secara molekuler spesies NPA yang menginfeksi wortel di Agropolitan Cianjur, Jawa Barat dan penelusuran tingkat kekerabatannya dengan spesies NPA dari negara lain. DNA diekstraksi dari nematoda betina dan diamplifikasi melalui *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan primer spesifik spesies (Rjav/Fjav untuk *M. javanica*, Rar/Far untuk *M. arenaria* dan Rinc/Finc untuk *M. incognita*) dan primer multipleks (*M. hapla*, *M. chitwoodi*, dan *M. fallax*). Sikuensing nukleotida dilakukan terhadap DNA hasil PCR tanpa melalui proses kloning. Berdasarkan hasil identifikasi ada dua spesies NPA berasosiasi dengan penyakit umbi bercabang, yaitu *M. javanica* dan *M. hapla*. Analisis pohon filogenesis memperlihatkan bahwa *M. javanica* asal Cianjur berkerabat sangat dekat dengan *M. javanica* asal Cina dengan tingkat homologi mencapai 91.9%. Nematoda *M. hapla* asal Cianjur mempunyai sikuen nukleotida dengan tingkat homologi antara 99.4% sampai 100% dengan isolat-isolat dari Swiss, Amerika, Inggris, dan Cina.

Kata kunci: filogenesis, *Meloidogyne hapla*, *M. javanica*, nematoda puru akar

ABSTRACT

Root-knot nematodes (RKN), *Meloidogyne* spp., were reported as the cause of carrot branched tuber on several vegetable production areas in Central and East Java. Species identification by molecular approach was conducted using infected carrot tubers from Agropolitan Cianjur, West Java. DNA was extracted from female nematodes and amplified using PCR with species specific primers (Fjav/Rjav for *M. javanica*, Far/Rar for *M. arenaria*, and Finc/Rinc for *M. incognita*) and multiplex primer (*M. hapla*, *M. chitwoodi*, and *M. fallax*). PCR product were sequenced without cloning. Based on nucleotide sequences, two species RKN were found associated with branched tuber disease of carrot in Agropolitan Cianjur, i.e *M. javanica* and *M. hapla*. Phylogenetic analysis showed that *M. javanica* from Cianjur was closely related to RKN from China with the homology level of 91.9%, whereas nucleotide sequence of *M. hapla* from Cianjur had high homology level (99.4% to 100%) with isolates from Swiss, USA, UK, and China.

Key words: *Meloidogyne hapla*, *M. javanica*, phylogenetic, root-knot nematode

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

PENDAHULUAN

Wortel merupakan jenis sayuran umbi yang banyak dikonsumsi saat ini. Produksi wortel Indonesia tahun 2009 hingga 2011 meningkat dari 358 014 ton menjadi 526 917 ton (BPS 2012). Selama periode tersebut penurunan produktivitas wortel sebesar 2.20 ton/ha terjadi di Jawa Barat, 2.48 ton/ha di Sumatera Utara, dan 6.39 ton/ha di Sulawesi Utara.

Meloidogyne spp. yang sering disebut nematoda puru akar (NPA) merupakan penyebab penyakit umbi bercabang pada wortel. Kehilangan hasil akibat infeksi NPA dilaporkan sebesar 15% hingga 95% (Kurniawan 2010). NPA juga merupakan patogen penting pada tanaman wortel di Amerika Serikat (Gugino *et al.* 2006), Brazil (Charchar *et al.* 2009), Turki (Devran dan Sogut 2009), dan Eropa (Wesemael *et al.* 2011).

Saat ini identifikasi nematoda secara cepat dan akurat telah dikembangkan menggunakan pendekatan biologi molekuler di antaranya dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR). Metode ini menggunakan struktur asam nukleat, misalnya *internal transcribed spacer* (ITS) rDNA sebagai dasar untuk menentukan karakter dan mengidentifikasi patogen tanaman.

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi secara molekuler spesies NPA yang berasosiasi dengan penyakit umbi bercabang pada wortel di daerah sentra produksi wortel di Jawa Barat serta mengetahui tingkat kekerabatannya dengan spesies *Meloidogyne* dari negara lain.

BAHAN DAN METODE

Sampel berupa tanaman wortel bergejala umbi bercabang dikoleksi dari Agropolitan Cianjur. Daerah ini mempunyai ketinggian 1300–1600 m dpl dan merupakan salah satu sentra produksi wortel di Jawa Barat. Identifikasi *Meloidogyne* spp. dilakukan menggunakan teknik PCR dan sikuen nukleotida. Proses identifikasi dilakukan di Laboratorium Nematoda dan Laboratorium Virologi, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.

Ekstraksi DNA

Puru akar direndam selama 24 jam, dibedah menggunakan jarum bedah, dan diekstraksi menggunakan metode Hikmia *et al.* (2012) yang telah dimodifikasi. Dua puluh ekor nematoda betina dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf*. Sampel tersebut ditambah bufer ekstrak (200 mM Tris HCl pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0, dan 0.5% SDS) sebanyak 150 µL dan digerus hingga halus dengan *cornical grinder* steril. Selanjutnya, 150 µL kloroform:isoamilalcohol (24:1) ditambahkan dan disentrifugasi pada kecepatan 11 000 rpm selama 10 menit.

Sebanyak 100 µL supernatan dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* baru, ditambah 50 µL larutan sodium asetat (CH_3COONa) 3 M dan pH 5.2, dibolak-balik dan disimpan pada suhu -20 °C selama 10 menit. Setelah itu suspensi disentrifugasi pada kecepatan 12 000 rpm selama 20 menit. Supernatan diambil sebanyak 100 µL dan dipindahkan ke dalam tabung *eppendorf* baru. Isopropanol ditambah 1 volume ke dalam tabung, dibolak-balik, disimpan pada suhu ruang selama 30 menit, dan selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 12 000 rpm selama 20 menit. Supernatan dibuang dan ditambah etanol 80% sebanyak 1 volume, disentrifugasi pada kecepatan 12 000 rpm selama 15 menit dan supernatan dibuang. Endapan DNA dikeringkan, ditambah 30–100 µL bufer TE pH 8 sesuai ketebalan pelet DNA, dan disimpan pada suhu -20 °C hingga digunakan.

Amplifikasi DNA dengan PCR

Setiap reaksi PCR yang menggunakan primer spesifik spesies terdiri atas 12.5 µL 2x Go Taq®Green Master mix (Promega), 1 µL primer *Forward* 10 µM, 1 µL primer *Reverse* 10 µM, 1 µL templat DNA, dan 9.5 µL air bebas nuklease sehingga volume menjadi 25 µL.

Reaksi PCR yang menggunakan primer multipleks spesies terdiri atas 12.5 µL 2x Go Taq®Green Master mix (Promega), 1 µL primer *forward* JMV1 10 µM, 1 µL primer *reverse* JMV2 10 µM, 1 µL primer *reverse* JMV hapla 10 µM, 1 µL templat DNA, dan 8.5 µL air bebas nuklease sehingga volume menjadi 25 µL.

Amplifikasi dengan primer JMV1/JMV hapla akan menghasilkan pita berukuran 440 pb untuk *M. hapla*, 540 pb untuk *M. chiwoodi*, dan 670 pb untuk *M. fallax* (Tabel 1) (Adam *et al.* 2007).

Proses denaturasi untuk setiap DNA spesies *Meloidogyne* terjadi pada suhu 94 °C selama 4 menit. Proses *annealing* untuk setiap DNA spesies yang diuji memerlukan waktu dan suhu yang berbeda. Proses *annealing* spesies *M. javanica* pada suhu 55 °C selama 45 detik, *M. incognita* pada suhu 57 °C selama 45 detik, *M. arenaria* pada suhu 55 °C selama 45 detik, dan *M. hapla* pada suhu 50 °C selama 30 detik (Adam *et al.* 2007). Proses *elongation* terjadi pada suhu 72 °C selama 1 menit, *final elongation* pada suhu 72 °C selama 7 menit, dan *final hold* 4 °C.

DNA nematoda hasil amplifikasi diseparasi pada gel agarosa 1% yang dilarutkan dalam bufer TBE. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 50 Volt selama 60 menit, kemudian dilanjutkan 100 Volt selama 5 menit. Hasil elektroforesis divisualisasi menggunakan sinar UV, dan gambar pita-pita DNA difoto dengan kamera digital (Hikmia *et al.* 2012).

Peruntan DNA

Peruntan DNA dilakukan menggunakan pasangan primer spesifik *M. javanica* dan primer multipleks *M. hapla* di PT Macrogen Incorporation Seoul, Korea Selatan (Tabel 1). Hasil sikuensing 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* (NCBI). Identitas didapatkan dengan menggunakan *software* ClustalW (Bioedit), sedangkan pohon filogenesis menggunakan *software* MEGA dan *neighbour joining* (NJ) menggunakan 1000 *bootstrap*.

HASIL

PCR menggunakan primer spesifik *M. javanica* terhadap sampel NPA dari Jawa Barat berhasil mengamplifikasi pita DNA berukuran 720 pb (Gambar 1). Hasil ini mengindikasikan bahwa NPA yang telah diteliti merupakan salah satu isolat *M. javanica*. Hasil sikuening nukleotida NPA asal Cianjur mempunyai tingkat kemiripan yang sangat tinggi (homologi 91.9%) dengan spesies *M. javanica* asal Cina, sedangkan dengan spesies lain (*M. hapla*, *M. arenaria*, dan *M. incognita*) tingkat kemiripan hanya sebesar 35.7% hingga 40.1% (Tabel 2).

Berdasarkan analisis filogenesis *M. javanica* asal Cianjur, Jawa Barat menjadi satu kelompok dengan isolat *M. javanica* asal Cina dan terpisah dari spesies-spesies *M. javanica* dari negara lain. Hal ini menunjukkan bahwa spesies *M. javanica* Cianjur memiliki tingkat kekerabatan lebih dekat dengan *M. javanica* asal Cina dibandingkan dengan spesies yang sama asal negara lain (Gambar 2).

Amplifikasi yang dilakukan menggunakan primer multipleks, yaitu JMV1, JMV2, JMV hapla hanya berhasil mendapatkan pita

Tabel 1 Primer yang digunakan untuk identifikasi spesies *Meloidogyne* asal Jawa Barat

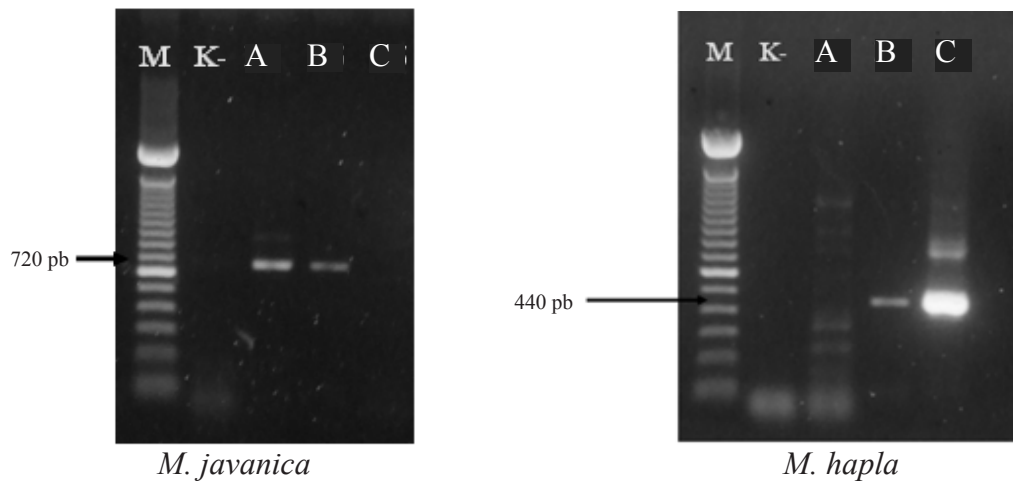
Kode	Sekuen (dari ujung -5' ke -3')	Ukuran pita hasil PCR (pb)	Spesies NPA
Fjav	GGTGC GCGATTGAACTGAGC	720	<i>M. javanica</i>
Rjav	CAGGCCCTTCAGTGGA ACTATA C		
Finc	CTGGCGATAGAGGTAAATGAC	999	<i>M. incognita</i>
Rinc	TCGGCGATAGACACTACAAACT		
Far	TCGGCGATAGAGGTAAATGAC	420	<i>M. arenaria</i>
Rar	CTGGCGATAGACACTACAAACT		
JMV1	GGATGGCGTGCTTTCAAC	540	<i>M. chitwood</i>
JMV2	TTCCCCCTTACGATGTTTACCC	670	<i>M. fallax</i>
JMV hapla	AAAAATCCCCTCGAAAATCCACC	440	<i>M. hapla</i>

DNA berukuran 440 pb untuk *M. hapla* dan tidak berhasil mengamplifikasi pita DNA berukuran 540 pb untuk *M. chitwoodi* maupun 670 pb untuk *M. fallax* (Gambar 1). Hasil ini menunjukkan bahwa sampel DNA yang dideteksi hanya *M. javanica* dan *M. hapla*.

Keberadaan *M. hapla* ini juga diperkuat oleh analisis homologi sikuen nukleotida. Melalui analisis tersebut terlihat bahwa NPA

asal Cianjur memiliki tingkat kemiripan yang sangat tinggi (100%) dengan spesies *M. hapla* asal Magelang, Jawa Tengah begitu juga dengan spesies *M. hapla* asal negara lain dengan tingkat kemiripan antara 99.4% hingga 100% (Tabel 3).

Berdasarkan hasil analisis filogenesis sikuen nukleotida disimpulkan bahwa isolat *M. hapla* asal Cianjur, dan Magelang menjadi

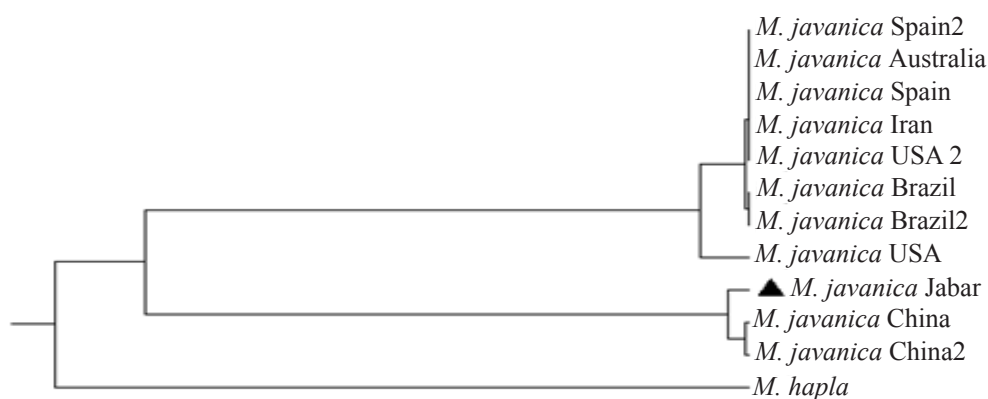


Gambar 1 Hasil amplifikasi DNA *Meloidogyne* isolat Cianjur, Jawa Barat dari beberapa tempat dengan ketinggian yang berbeda pada 1% gel agarosa elektroforesis. M, Penanda DNA 1 kb; K (-), Tanaman sehat; A, 1300 m dpl; B, 1500 m dpl; C, 1600 m dpl.

Tabel 2 Homologi sikuen nukleotida DNA *Meloidogyne javanica* Cianjur, Jawa Barat dengan sikuen DNA yang ada pada *GenBank*

Isolat	Homologi dengan <i>M. javanica</i> Cianjur (%)
<i>M. javanica</i> Cina	91.9
<i>M. arenaria</i>	35.7
<i>M. incognita</i>	35.7
<i>M. hapla</i>	40.1

Matriks identitas sikuen diperoleh dengan menggunakan *software* Bioedit 7.1.3



Gambar 2 Pohon filogenesis spesies *Meloidogyne javanica* yang menginfeksi pertanian wortel di Cianjur, Jawa Barat.

satu kelompok tersendiri dengan isolat *M. hapla* asal Inggris, Amerika, Cina, Australia dan Hawaii serta terpisah dari kelompok *M. hapla* asal Swiss (Gambar 3).

PEMBAHASAN

M. javanica merupakan spesies nematoda dengan sebaran yang sangat luas di daerah tropik sampai subtropik, memiliki kisaran inang yang beragam dan menyebabkan kerusakan yang tinggi pada berbagai jenis tanaman sayuran. Secara ekologi *M. javanica* dapat hidup pada suhu 10–35 °C (Stephan 1982).

M. hapla adalah salah satu spesies *Meloidogyne* yang dapat bertahan pada suhu rendah (4 °C hingga 20 °C) dan menginfeksi tanaman sayuran (Das *et al.* 2011). *M. hapla* termasuk organisme OPTK A2 yang sudah ada di Indonesia dengan daerah

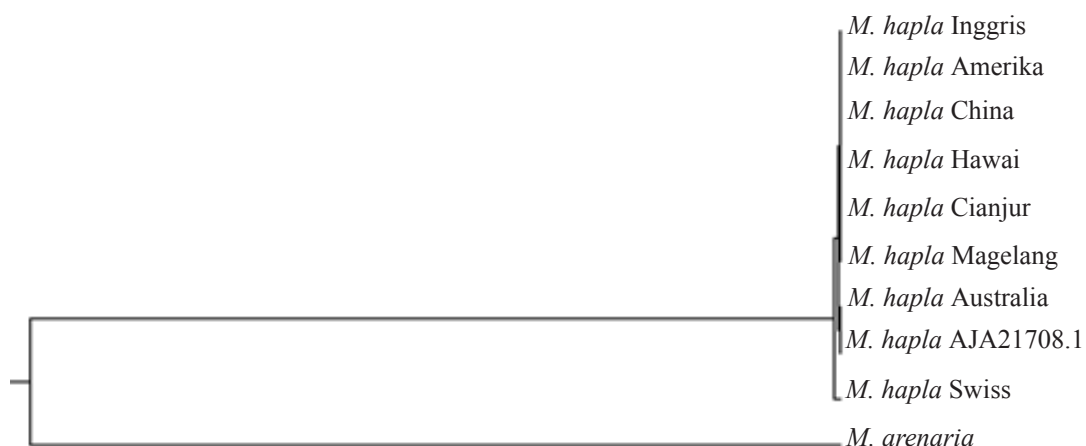
sebar terbatas, yaitu di Jawa. Dilaporkan sebelumnya, bahwa *M. hapla* telah menginfeksi pertanaman wortel di Kota Batu, Jawa Timur (Hikmia *et al.* 2012), dan Dataran Tinggi Dieng, Jawa Tengah (Taher *et al.* 2012). Namun menurut www.plantwise.org, wilayah Indonesia yang sudah terinfeksi *M. hapla* adalah Makassar, Sulawesi Selatan dan Yogyakarta, Jawa Tengah.

Berdasarkan hasil penelitian ini, *M. hapla* juga ditemukan di daerah Agropolitan Cianjur, Jawa Barat. Isolat *M. hapla* dari Jawa Barat memiliki homologi yang tinggi dengan isolat-isolat dari negara lain (Cina, Inggris, Hawaii, Australia, dan Amerika). Oleh karena itu, diduga *M. hapla* telah lama masuk ke Indonesia dan mengalami perubahan genetik untuk menyesuaikan diri terhadap lingkungan di Indonesia. Data BPS (2005) menyebutkan bahwa Cina, Inggris, Amerika, dan Swiss merupakan beberapa negara pemasok wortel

Tabel 3 Homologi sikuen nukleotida DNA *Meloidogyne hapla* Cianjur, Jawa Barat dengan sekuen DNA yang ada pada *GenBank*.

Isolat	Homologi <i>M. javanica</i> Cianjur (%)
<i>M. hapla</i> Magelang	100.0
<i>M. hapla</i> Cina	100.0
<i>M. hapla</i> Inggris	100.0
<i>M. hapla</i> Amerika	99.7
<i>M. hapla</i> Swiss	99.4
<i>M. javanica</i>	42.3
<i>M. arenaria</i>	52.7
<i>M. incognita</i>	53.0

Matriks identitas sekuen diperoleh dengan menggunakan *software* Bioedit 7.1.3



Gambar 3 Pohon filogenesis spesies *Meloidogyne hapla* yang menginfeksi pertanaman wortel di Cianjur, Jawa Barat.

bagi Indonesia. Umbi wortel dari negara lain tersebut berpotensi sebagai agens pembawa patogen.

DAFTAR PUSTAKA

- Adam MAM, Phillips MS, Blok CV. 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode *Meloidogyne* spp. *Plant Pathol.* 56(1):190–197. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01455.x>.
- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2005. *Buletin Statistik Perdagangan Luar Negeri, Impor*. Jakarta (ID): BPS Indonesia.
- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2012. Luas panen, produksi dan produktivitas wortel, 2009–2011. www.bps.go.id [diakses 8 Oktober 2012].
- Charchar JM, Eisenback JD, Vieira JV, Boiteux MENF, Boiteux LS. 2009. *Meloidogyne polycephannulata* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing carrot in Brazil. *J Nematol.* 41(3):174–186.
- Das S, Wesemael WML, Perry RN. 2011. Effect of temperature and time on the survival and energy reserves of juveniles of *Meloidogyne* spp. *Agric Sci Res J.* 1(5):102–112.
- Devran Z, Sogut MA. 2009. Distribution and identification of root-knot nematodes from Turkey. *J Nematol.* 41(2):128–133.
- Gugino BK, Abawi GS, Ludwig JW. 2006. Damage and management of *Meloidogyne hapla* using oxamyl on carrot in New York. *J Nematol.* 38:483–490.
- 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. DOI: <http://dx.doi.org/10.14692/jfi.8.3.73>.
- Kurniawan W. 2010. Identifikasi penyakit umbi bercabang pada wortel, *Daucus carota* (L.) di Indonesia [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Plantwise. *Meloidogyne hapla*. <http://www.plantwise.org> [diakses 11 Mei 2012].
- Stephan ZA. 1982. The influence of temperature and storage time on eggs of four species of *Meloidogyne*. *Nematol Medit.* 10:167–173.
- 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>.
- Wesemael WML, Viaene N, Moens M. 2011. Root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Europe. *J Nematol.* 13(1):3–16. DOI: <http://dx.doi.org/10.1163/138855410X526831>.