

Deteksi dan Identifikasi Spesies *Meloidogyne* Penyebab Umbi Berbintil pada Kentang Asal Sulawesi Utara

Detection and Identification of *Meloidogyne* Species, Pimple-like Knot Pathogen of Potato Tuber From North Sulawesi

Budi Sri Utami, Supramana*, Giyanto
Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

ABSTRAK

Nematoda puru akar (*Meloidogyne* spp.) adalah salah satu penyebab menurunnya produksi kentang di Sulawesi Utara. Hingga saat ini spesies *Meloidogyne* pada kentang di Sulawesi Utara belum diidentifikasi. Penelitian ini bertujuan mendeteksi dan mengidentifikasi spesies *Meloidogyne* pada kentang dan mengetahui hubungan kekerabatannya dengan spesies dari negara lain. Sampel umbi kentang bergejala bintil dikumpulkan dari 3 sentra produksi kentang di Provinsi Sulawesi Utara, yaitu Kakenturan (Minahasa Selatan), Purworejo, dan Singgong (Bolaang Mongondow Timur). Identifikasi morfologi dilakukan berdasarkan pola perineal nematoda betina. Identifikasi molekuler dengan teknik PCR menggunakan primer spesifik untuk mengamplifikasi daerah ITS-rDNA, dilanjutkan dengan sekuensing fragmen DNA dan analisis filogenetika. Dua spesies *Meloidogyne* berhasil diidentifikasi, yaitu *M. javanica* (sampel asal Kakenturan, Purworejo, Singgong), dan *M. incognita* (sampel asal Purworejo). *M. javanica* dan *M. incognita* sampel asal Sulawesi Utara memiliki tingkat homologi berturut-turut hingga 97.5% dan 100 % dengan spesies yang sama asal Cina.

Kata kunci: homologi, identifikasi molekuler, ITS-rDNA, morfologi

ABSTRACT

Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) is one of the main constraint of potato production in North Sulawesi. Little is known about *Meloidogyne* species infecting potatoes in North Sulawesi. Therefore, research was conducted to identify *Meloidogyne* spp. on potatoes in North Sulawesi and further study their relationship with related species from other countries. Infected potato tubers with pimple-like knot symptom were collected from three potato production centers, i.e. Kakenturan (South Minahasa), Purworejo, and Singgong (East Bolaang Mongondow). Morphological identification was conducted based on the perineal pattern of the female; whereas molecular identification was conducted by PCR using specific primer for ITS-rDNA, followed by DNA sequencing and phylogenetic analysis. Two *Meloidogyne* species were identified i.e. *M. javanica* (samples from Kakenturan, Purworejo and Singgong) and *M. incognita* (samples from Purworejo). *M. javanica* and *M. incognita* from North Sulawesi are similar to the related species from China with homology level of 97.5 % and 100 %, respectively.

Key words: homology, ITS-rDNA, morphology, molecular identification

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

PENDAHULUAN

Nematoda puru akar (NPA) atau *Meloidogyne* spp. merupakan nematoda yang banyak menyerang tanaman kentang. Gejala khas infeksi NPA pada kentang ialah adanya bintil atau puru di permukaan umbi, tanaman menjadi kerdil, layu, dan klorosis (Bacic *et al.* 2016).

M. incognita, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. fallax* dan *M. chitwoodi* merupakan nematoda yang merugikan secara ekonomi pada pertanaman kentang (Adam *et al.* 2007). Tiga spesies *Meloidogyne* ditemukan menginfeksi pertanaman kentang di Pulau Jawa, yaitu *M. javanica*, *M. incognita* dan *M. arenaria* (Aprilyani *et al.* 2015). NPA secara morfologi sangat mirip satu dengan lain dan beberapa spesies nematoda puru akar sering ditemukan bersamaan menginfeksi tanaman.

Penyakit umbi berbintil pada kentang merupakan salah satu kendala produksi kentang di Sulawesi Utara. Belum ada informasi mengenai spesies *Meloidogyne* yang menginfeksi kentang di Sulawesi Utara dan kerugian yang ditimbulkan akibat infeksi nematoda. Deteksi dan identifikasi spesies NPA perlu dilakukan secara morfologi yang didukung oleh teknik molekuler. Metode identifikasi NPA secara molekuler dengan amplifikasi bagian DNA ribosom pada daerah *internal transcribed spacer* selain lebih cepat juga lebih akurat (Zijlstra *et al.* 2000).

Penelitian ini bertujuan mendeteksi dan mengidentifikasi spesies *Meloidogyne* penyebab umbi berbintil kentang di Sulawesi Utara berdasarkan karakter morfologi dan molekuler, serta menentukan kekerabatan spesies *Meloidogyne* berdasarkan analisis filogenetika.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan Sampel Umbi

Pengambilan sampel dilakukan di 3 lokasi, yaitu Desa Kakenturan, Kecamatan Modinding, Kabupaten Minahasa Selatan Kabupaten Minahasa Selatan yang terletak pada ketinggian 1181 m dpl (S: 0°47'21.79'

E: 124°28'52.67'); Desa Purworejo, Kecamatan Modayag, Kabupaten Bolaang Mongondow Timur yang terletak pada ketinggian 1144 m dpl (S: 0°43'31.07' E: 124°26'31.45'); Desa Sinsingon, Kecamatan Pasi Timur, Kabupaten Bolaang Mongondow yang terletak pada ketinggian 1205 m dpl (S: 0°48'00.27' E: 124°23'13.99'). Pada setiap wilayah contoh diambil 5 lokasi pertanaman kentang yang berbeda. Pengambilan sampel dilakukan secara purposif, yaitu memilih sampel berdasarkan pada gejala penyakit tanaman yang spesifik. Tanaman kentang sakit bagian tajuknya menguning, kerdil dan layu pada saat siang hari, serta umbinya bergejala puru/bintil.

Identifikasi Spesies *Meloidogyne*

Nematoda betina dipisahkan dari jaringan umbi menggunakan jarum preparat dan diletakkan di dalam cawan sirakus yang telah diberi air. Pembuatan preparat pola perineal nematoda betina dilakukan pada 100 nematoda per wilayah pengamatan. *Meloidogyne* diidentifikasi dengan kunci identifikasi Eisenback dan Triantaphyllou (1991).

Identifikasi spesies *Meloidogyne* dengan teknik PCR dilakukan dengan mengamplifikasi daerah 18S-28S ITS rDNA nematoda betina, kemudian dilakukan sikuensing. Selanjutnya sikuen yang diperoleh dibandingkan dengan sikuen standar yang terdaftar di GenBank. Ekstraksi DNA nematoda betina menggunakan metode Tesarova *et al.* (2003) yang telah dimodifikasi dengan menambahkan NaOAc untuk presipitasi DNA. Amplifikasi DNA dengan teknik PCR menggunakan primer spesifik untuk *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, dan primer multipleks untuk *M. hapla*, *M. fallax*, dan *M. chitwoodi* (Tabel 1). Setiap reaksi diperlukan 12.5 µL 2x Go Taq® Green Master mix (Promega), 1 µL primer forward 10 µM, 1 µL primer reverse 10 µM, 2 µL templat DNA, dan 8.5 µL air bebas nuklease sehingga volume menjadi 25 µL.

Perunutan Nukleotida dan Analisis Filogenetika

Perunutan susunan nukleotida dilakukan di First Base, Singapura. Hasil

Tabel 1 Pasangan primer yang digunakan untuk identifikasi spesies *Meloidogyne* dengan teknik *polymerase chain reaction*

Spesies	Kode Primer	Runutan 5'-3'	Target DNA (pb)	Sumber Rujukan
<i>M. incognita</i>	MI-F	GTGAGGATTCAGTCTCCCAG	± 999	Meng <i>et al.</i> (2004)
	MI-R	ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC		
<i>M. arenaria</i>	Far	TCGGCGATAGAGGTAAATGAC	± 420	Zijlstra <i>et al.</i> (2000)
	Rar	TCGGCGATAGACACTACAAC		
<i>M. javanica</i>	Fjav	GGTGCGCGATTGAACTGAGC	± 420	Zijlstra <i>et al.</i> (2000)
	Rjav	CAGGCCCTTCAGTGGAACATAAC		
<i>M. hapla</i>	JMV1	GGATGGCGTGCTTTCAAC	± 440	Wishart <i>et al.</i> (2002)
<i>M. chitwoodi</i>	JMVhapla	AAAATCCCCTCGAAAATCCACC	± 540	
<i>M. fallax</i>	JMV2	TTTCCCCTTATGATGTTTACCC	± 670	

sikuen dianalisis menggunakan program *basic local alignment search tool* (BLAST) dengan program optimasi untuk mendapatkan sikuen DNA yang terdapat dalam situs *National Center For Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Runutan nukleotida kemudian disejajarkan dengan perangkat lunak Clustal W (Larkin *et al.* 2007) pada program *bioedit sequence alignment editor* v 7.0.5.3 (Hall 1999). Pohon filogenetika dibentuk dengan piranti lunak *molecular evolutionary genetic analysis software* (MEGA) 6 (Tamura *et al.* 2013) dengan *bootstrap* 1000 kali ulangan.

HASIL

Gejala Infeksi NPA

Tanaman kentang yang diduga terinfeksi NPA menunjukkan gejala pada bagian tajuk tanaman layu, pertumbuhan tanaman yang terhambat dan kerdil, daun klorosis (Gambar 1). Gejala khas *Meloidogyne* spp. terlihat pada umbi kentang berupa bintil atau puru pada permukaan, berbintil dan bergelombang, dan permukaan tidak rata bahkan sering disertai dengan adanya infeksi patogen lain sehingga umbi mengalami kerusakan lebih parah (Gambar 2). Bagian umbi yang terinfeksi NPA bila kulit luarnya dikupas akan terlihat adanya titik-titik berwarna putih kekuningan yang merupakan nematoda betina bila dilihat di bawah mikroskop (Gambar 3).

Spesies *Meloidogyne*

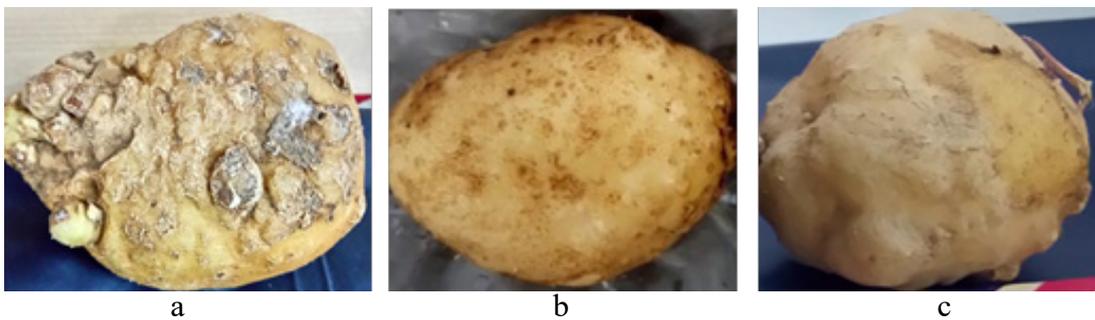
Berdasarkan pengamatan pola perineal *Meloidogyne* spp. betina ditemukan 2 spesies, yaitu *M. javanica* dan *M. incognita*. *M. javanica* ditemukan dari semua lokasi pengambilan sampel dengan ciri adanya garis lateral yang memisahkan bagian *striae* dorsal dan ventral (Gambar 4a). *M. incognita* hanya ditemukan pada sampel asal Purworejo dengan ciri lengkung dorsal yang tinggi dan menyempit, sedangkan pada bagian paling luarnya sedikit melebar dan agak mendatar, tidak memiliki garis lateral dan bagian *striae* terlihat jelas (Gambar 4b).

Perunutan asam nukleat hasil amplifikasi daerah ITS rDNA digunakan untuk mengetahui tingkat kekerabatan suatu spesies yang sudah tersimpan pada database GenBank. Fragmen DNA dengan ukuran 720 pb berhasil diamplifikasi dengan primer spesifik *M. javanica* pada sampel asal Purworejo, Singsingon, dan Kakenturan (Gambar 5a); sedangkan primer spesifik *M. incognita* berhasil mengamplifikasi fragmen DNA berukuran 999 pb pada sampel asal Purworejo (Gambar 5b).

Runutan nukleotida *M. javanica* dari Purworejo, Kakenturan dan Singsingon telah disejajarkan dengan *M. javanica* dari negara lain yang tersedia di GenBank. *M. javanica* asal Purworejo memiliki homologi paling tinggi dengan spesies *M. javanica* dari Cina dan India dengan nilai 97.5%, *M. javanica* asal Kakenturan homologi paling tinggi



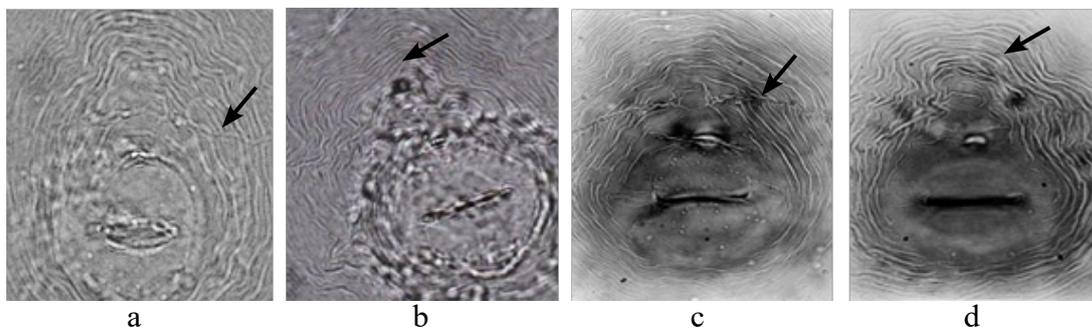
Gambar 1 Gejala tanaman kentang terinfeksi *Meloidogyne* spp. a, Tanaman layu; b, Tanaman kerdil dan; c, Klorosis pada daun.



Gambar 2 Variasi gejala serangan *Meloidogyne* spp. pada umbi kentang. a, Malformasi bentuk; b, Bintil kecil dan tidak rata dan; c, Tonjolan dan umbi bergelombang.



Gambar 3 Gejala dan tanda infeksi *Meloidogyne* spp. a, Nekrosis pada jaringan umbi (→) ; b, *Meloidogyne* sp (1, betina dewasa; dan 2, massa telur).



Gambar 4 Pola perineal *Meloidogyne javanica* dan *M. incognita* asal Purworejo (Perbesaran 400x) (a dan b) dan acuannya (c dan d), yaitu Eisenback *et al.* (1981). (→) menunjukkan ciri garis lateral yang memisahkan bagian *striae* dorsal dan ventral (a dan c); ciri lengkung dorsal yang tinggi dan menyempit (b dan d). a dan c, *M. javanica*; b dan d, *M. incognita*.

dengan spesies *M. javanica* dari Cina dan India dengan nilai 91.8%, dan *M. javanica* asal Singsingon nilai homologi yang paling tinggi dengan isolat *M. javanica* dari Cina yaitu sebesar 91.3 % (Tabel 2). Analisis filogenetika menunjukkan bahwa ketiga isolat *M. javanica* asal Purworejo, Kakenturan, dan Singsingon memiliki kekerabatan dengan *M. javanica* asal Cina, Thailand, India dan Malaysia (Gambar 6).

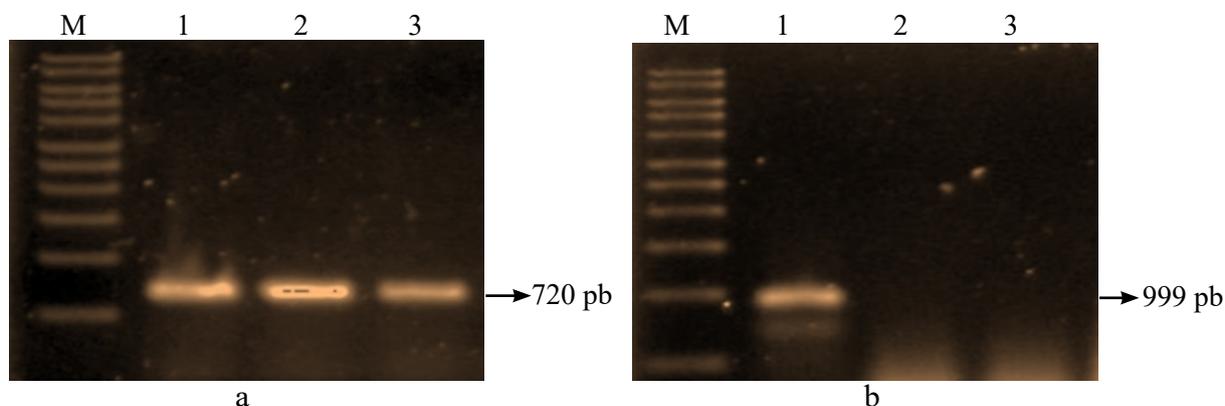
Setelah dilakukan penyejajaran dengan isolat *M. incognita* dari negara lain, runutan nukleotida *M. incognita* asal Purworejo memiliki tingkat homologi 100% dengan *M. incognita* dari Cina. Berdasarkan analisis filogenetika *M. incognita* asal Purworejo juga diketahui berkerabat dekat *M. incognita* dari Cina, India, Thailand dan Malaysia (Gambar 7).

PEMBAHASAN

Dua spesies *Meloidogyne*, yaitu *M. javanica* dan *M. incognita*, berhasil diidentifikasi secara morfologi. *M. javanica*

ditemukan pada seluruh lokasi pengambilan sampel, sedangkan *M. incognita* hanya ditemukan pada sampel asal Purworejo. Dropkin (1991) menyatakan bahwa terdapat hubungan antara iklim dan karakter tanah terhadap distribusi *Meloidogyne*. Suhu optimum untuk perkembangan *M. incognita* ialah 15–25 °C. *M. javanica* dapat berkembang dan bereproduksi pada suhu optimum sekitar 20–30 °C. Keberadaan spesies *Meloidogyne* spp. di Sulawesi Utara berkaitan erat dengan kondisi iklim, suhu tahunan daerah pengambilan sampel yang berkisar 16–30 °C.

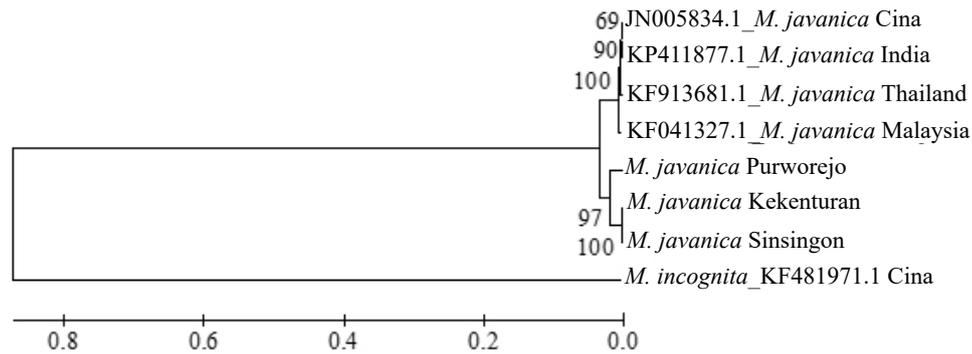
Identifikasi molekuler menggunakan primer SCAR Fjav dan Rjav berhasil mengamplifikasi *M. javanica* asal Purworejo, Kakenturan dan Singsingon dengan ukuran pita DNA sekitar 720 pb. Zijlstra *et al.* (2000) menggunakan wilayah ITS rDNA sebagai target PCR untuk mengidentifikasi *M. arenaria*, *M. javanica* dan *M. incognita* dengan primer SCAR dengan sampel DNA dari massa telur, juvenil, dan nematoda betina. Primer spesifik MI-F dan MI-R untuk *M. incognita*



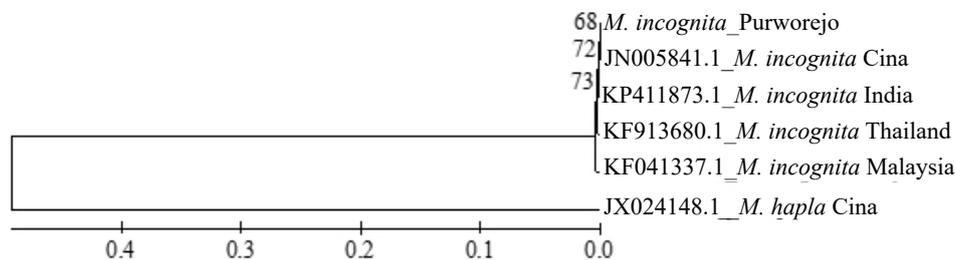
Gambar 5 Hasil amplifikasi DNA spesies *Meloidogyne* menggunakan primer spesifik. a, *Meloidogyne javanica*; dan b, *Meloidogyne incognita*. M, penanda DNA 1 kb (Biolabs); 1, sampel Purworejo; 2, sampel Kakenturan; 3, sampel Singsingon.

Tabel 2 Homologi (%) runutan nukleotida *M. javanica* asal Sulawesi Utara dengan *M. javanica* dari beberapa negara lain yang ada di GenBank

<i>Meloidogyne javanica</i> (GenBank)		<i>Meloidogyne javanica</i> asal Sulawesi Utara		
Asal	No. Akses	Purworejo	Kakenturan	Singsingon
India	KP411877.1	97.5	91.8	92.9
India2	KP411878.1	97.5	-	92.7
Cina	JN005834.1	97.5	91.8	93.1
Thailand	KF913681.1	97.1	91.4	92.7
Malaysia	KF041327.1	95.6	91.1	-



Gambar 6 Pohon filogenetika *Meloidogyne javanica* asal Purworejo, Kakenturan, dan Singsingon dengan *M. javanica* negara lain yang terdapat pada GenBank berdasarkan runutan nukleotida menggunakan program MEGA v 6.06 dengan pendekatan UPGMA. Skala di bawah gambar adalah skala nilai koefisien jarak genetik yang menggambarkan jumlah rata-rata perubahan nukleotida di antara isolat.



Gambar 7 Pohon filogenetika *Meloidogyne incognita* asal Purworejo dengan *M. incognita* dari negara lain yang terdapat pada GenBank berdasarkan runutan nukleotida menggunakan program MEGA v 6.06 dengan pendekatan UPGMA. Skala di bawah gambar adalah skala nilai koefisien jarak genetik.

yang dirancang oleh Meng *et al.* (2004) hanya dapat mengamplifikasi *M. incognita* yang berasal dari Purworejo dengan ukuran pita DNA sekitar 999 pb.

Identifikasi molekuler memperkuat hasil identifikasi secara morfologi keberadaan spesies utama NPA, yaitu *M. javanica* dan *M. incognita* penyebab umbi berbintil kentang di Sulawesi Utara. Dua spesies *Meloidogyne* tersebut juga telah dilaporkan menginfeksi pertanaman kentang di Pulau Jawa (Aprilyani *et al.* 2015), sedangkan pada tanaman wortel di Pulau Jawa dan Gowa, Sulawesi Selatan telah berhasil diidentifikasi *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, dan *M. hapla* (Taher *et al.* 2012; Hikmia *et al.* 2012; Halimah *et al.* 2013; Mirsam *et al.* 2015). Berdasarkan hasil wawancara di lokasi pengambilan sampel, bibit kentang yang ditanam di Sulawesi Utara berasal dari Pengalengan, Jawa Barat. Diduga bibit kentang yang berasal dari Jawa Barat tersebut merupakan medium pembawa *M. javanica* dan *M. incognita* ke Sulawesi Utara. *M. javanica* dan *M. incognita* yang

menginfeksi kentang merupakan laporan pertama di Sulawesi Utara.

Analisis filogenetika *M. javanica* dan *M. incognita* asal Sulawesi Utara berkerabat dekat dengan spesies yang sama asal Cina, Thailand, India, dan Malaysia. Kedekatan kekerabatan antara *M. javanica* dan *M. incognita* asal Sulawesi Utara dengan *M. javanica* dan *M. incognita* 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 pengekspor benih kentang ke Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Badan Karantina Pertanian yang telah memberi beasiswa (kepada penulis pertama). Ucapan terima kasih disampaikan kepada Ifa Manzila dan Fitrianingrum Kurniawati atas bantuan dan bimbingannya.

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 rootknot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathol.* 56:190–197. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01455.x>.
- Bacic J, Stare BG, Strajnar P, Sirca S, Urek G. 2016. First report of a highly damaged potato crop from serbia caused by *Meloidogyne incognita*. *APS Journal* 100(5): 1021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-09-15-1072-PDN>.
- Aprilyani, Supramana, Suastika G. 2015. *Meloidogyne incognita* penyebab umbi berbintil pada kentang di beberapa sentra produksi kentang di Jawa. *J Fitopatol Indones* 11(5): 143–149. DOI: <https://doi.org/10.14692/jfi.11.5.143>.
- Dropkin VH. 1991. Pengantar Nematologi Tumbuhan. Ed ke-2. Supratoyo, editor. Yogyakarta (ID): Gadjah Mada University Press. Terjemahan dari: Introduction to Plant Nematology.
- Eisenback JD, Hirschman H, Sasser JN, Triantaphyllou AC. 1981. A Guide to The Four Most Common Species of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.), With a Pictural Key. Washington DC (US): Cooperative Publication Department of Plant Pathology an US Agency International Development.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor a analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 41:95–98.
- Halimah, Supramana, Suastika G. 2013. Identifikasi spesies *Meloidogyne* pada wortel berdasarkan sikuen nukleotida. *J Fitopatol Indones.* 9(1):1–6. DOI: <https://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.
- Larkin MA, Blackshields, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, Mc William H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatic.* 23(21):2947–2948. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>.
- 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.
- Mirsam H, Supramana, Suastika G. 2015. Deteksi dan identifikasi spesies *Meloidogyne* pada tanaman wortel dari Dataran Tinggi Malino, Gowa, Sulawesi Selatan. *J Fitopatol Indones* 11(1): 1-8. DOI: <https://doi.org/10.14692/jfi.11.1.1>.
- [Pusdatin] Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian. 2013. Kentang. *Buletin Konsumsi Pangan* 4(1):15–24.
- Taher M, Supramana, Gede S. 2012. Identifikasi *Meloidogyne* penyebab penyakit umbi bercabang pada wortel di Dataran Tinggi Dieng. *J Fitopatol Indones.* 8(1):16–21. DOI: <https://doi.org/10.14692/jfi.8.1.16>.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. 2013. MEGA6 : Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30(12):2725–2729. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- 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.
- Wishart J, Philips MS, Bblok VC. 2002. Ribosomal intergenic spacer: a polymerase chain reaction diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, and *M. hapla*. *Phytopatology* 92 (8): 884–892. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHTO.2002.92.8.884>.
- Zijlstra C, Dorine TH, Donkers-Venne M, Fargette M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, and *M. arenaria* using sequence characterised amplified region (SCAR) based PCR assay. *Nematology.* 2(8):847–853. DOI: <https://doi.org/10.1163/156854100750112798>.