

Karakter Molekuler Gen AB- FAR 1 Nematoda *Aphelenchoides besseyi* Asal Lima Varietas Padi

Molecular Characters of AB-FAR Gene 1 of *Aphelenchoides besseyi* from Five Rice Varieties

Fitrianiingrum Kurniawati*, Efi Toding Tondok, Yayi Munara Kusumah, Abdul Munif
Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

ABSTRAK

Aphelenchoides besseyi merupakan nematoda penyebab penyakit pucuk putih yang terbawa benih padi. Gen AB FAR-1 diketahui sebagai gen penting yang mengendalikan patogenisitas *A. besseyi*. Penelitian dilakukan untuk mengetahui karakter gen AB FAR-1 yang diisolasi dari nematoda yang berasal dari benih padi. Ekstraksi nematoda dilakukan dengan metode corong Baerman dari benih 5 varietas padi “Ciherang”, “Inpari Sidenuk”, “Sintanur”, “Hibrida Prima” dan “Pak Tiwi”. Ekstraksi DNA total nematoda menggunakan metode CTAB dilanjutkan dengan amplifikasi gen AB FAR-1 menggunakan primer spesifik FAR-F1/R1 dan analisis urutan nukleotidanya. Pita DNA spesifik gen AB FAR-1 berukuran 150 pb berhasil diamplifikasi dari semua sampel nematoda. Analisis sikuen menunjukkan bahwa gen AB FAR-1 tersebut memiliki homologi tertinggi (92.5%–100%) dengan aksesori Genbank JQ686690.1, yaitu gen AB FAR-1 *A. besseyi* asal Cina. Walaupun memiliki homologi yang tinggi, terdapat beberapa perbedaan nukleotida pada sampel gen AB FAR-1 *A. besseyi* asal “Ciherang”, “Inpari Sidenuk” dan “Hibrida Prima”. Analisis pohon filogenetika lebih lanjut mengelompokkan gen AB FAR-1 *A. besseyi* menjadi 2 grup, yaitu grup 1 terdiri atas gen AB FAR-1 *A. besseyi* asal Cina, “Sintanur”, “Hibrida Prima” dan “Pak Tiwi” dan grup 2 gen AB FAR-1 *A. besseyi* asal “Ciherang”, dan “Inpari Sidenuk”.

Kata kunci: amplifikasi, analisis sekuen, homologi, patogenisitas, terbawa benih

ABSTRACT

Aphelenchoides besseyi is known as nematode species that causes seed-transmitted white shoot disease in rice. One important gene that has been reported to control the pathogenicity of *A. besseyi* is AB FAR-1. The study was conducted to determine the character of the AB FAR-1 gene of *A. besseyi* extracted from rice seeds. Nematode extraction was carried out using Baerman funnel method from the seeds of 5 rice varieties, i.e. “Ciherang”, “Inpari Sidenuk”, “Sintanur”, “Prime Hybrid” and “Pak Tiwi”. Total DNA extraction of nematodes was conducted using CTAB method, followed by amplification of the AB FAR-1 gene using specific primers FAR-F1/R1 and nucleotide sequence analysis. Specific DNA band of AB FAR-1 gene measuring 150 bp was successfully amplified from all nematode samples. Sequence analysis showed that the AB FAR-1 gene had the highest homology (92.5 – 100%) with the Genbank accession no. JQ686690.1, which is the AB FAR-1 gene of *A. besseyi* from China. Despite having high homology, there were some nucleotide differences in the AB FAR-1 gene samples of *A. besseyi* from “Ciherang”, “Inpari Sidenuk” and “Prime Hybrid”. Further phylogenetic tree analysis differentiated the AB FAR-1 *A. besseyi* gene into 2 groups, i.e. group 1 consisting of the AB FAR-1 gene *A. besseyi* from China, “Sintanur”, “Prime Hybrids” and “Pak Tiwi” and group 2 gene AB FAR-1 *A. besseyi* from “Ciherang”, and “Inpari Sidenuk”.

Keywords: amplification, homology, pathogenicity, seed-transmitted, sequence analysis

*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jalan Kamper Kampus IPB Dramaga Bogor, Jawa Barat 16680.
Tel: (+62251) 8629364, Surel: fitrianiingrum@apps.ipb.ac.id

PENDAHULUAN

Aphelenchoides besseyi merupakan nematoda ektoparasit terbawa benih padi dan menyebabkan penyakit pucuk putih. Dalam proses perkembangan dan reproduksi *A. besseyi* dikendalikan oleh protein spesifik, yaitu *fatty acid and retinoid binding protein gene* (gen AB FAR-1). Protein spesifik tersebut dapat dimanfaatkan untuk pengendalian *A. besseyi*. Pengendalian terhadap *A. besseyi* yang melibatkan protein spesifik tersebut telah dikembangkan di Cina. Pengendalian *A. besseyi* dengan RNA *interference* (RNAi) merupakan mekanisme yang terjadi secara alami di dalam sel yang dapat menghambat ekspresi gen. Mekanisme ini dipicu oleh RNA untai ganda (dsRNA).

Perlakuan dsRNA selama 48 jam mengakibatkan efisiensi pembungkaman AB-FAR-1 mencapai maksimum dan reproduksi nematoda paling sedikit. Hal ini disebabkan protein FAR dapat berikatan dengan asam lemak dan retinol. Retinol dianggap penting untuk sintesis kolagen dan perkembangan embrio. Penurunan regulasi AB FAR-1 oleh RNAi menyebabkan pengikatan retinol lebih sedikit sehingga reproduksi pada *A. besseyi* berkurang (Cheng *et al.* 2013).

Di Indonesia teknologi pengendalian dengan RNAi ini belum pernah dilakukan sehingga karakterisasi gen AB-FAR 1 perlu dilakukan untuk pengendalian terhadap nematoda *A. besseyi*.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Lima varietas yang digunakan ialah padi var. “Ciherang”, “Inpari Sidenuk”, “Sintanur”, “Hibrida Prima”, dan “Pak Tiwi” yang dibeli dari kios pertanian di Kabupaten Bogor.

Ekstraksi Nematoda dengan Metode Modifikasi Corong Baermann

Sebanyak 250 butir benih padi dipotong ujung dan pangkalnya, dituangkan ke dalam saringan berukuran 0.25 mm dan diisi 40 mL air. Selanjutnya nematoda diinkubasi

24 jam pada suhu kamar (25 ± 2 °C) dalam ruangan gelap, kemudian disaring. Nematoda dituangkan ke cawan hitung dan didiamkan selama 20 menit. Nematoda jantan dan betina diidentifikasi dengan mikroskop majemuk pada perbesaran 40 X (Remeus dan Pelazza 2014; EPPO 2017).

Pengukuran Morfometrik Nematoda *A. besseyi*

Pengukuran morfometrik nematoda dilakukan pada nematoda betina (masing-masing 10 ekor) mengikuti metode Chalanska *et al.* (2011) dan parameter yang diukur mengikuti formula De Man (1880).

Amplifikasi Gen AB FAR-1 Nematoda Asal Benih Padi

Ekstraksi DNA nematoda asal lima varietas padi dilakukan menggunakan metode *cetyltrimethyl ammonium bromide* (CTAB) (Doyle dan Doyle 1990) yang dimodifikasi. Sebanyak 40 mL bufer ekstraksi (2 mL EDTA, 5 mL Tris-HCl, 12.6 mL NaCl, 20.4 mL dH₂O) ditambah merkptoetanol 1%, lalu dipanaskan pada suhu 60 °C selama 10 menit. Sebanyak 15 ekor *A. besseyi* dari masing-masing lokasi digerus kemudian ditambah 500 µL bufer ekstraksi panas. Suspensi gerusan nematoda dimasukkan ke tabung eppendorf 1.5 mL, kemudian diinkubasi dalam penangas air pada suhu 60 °C selama 2 jam (tabung dibolak-balik setiap 10 menit untuk membantu proses lisis). Siapan suspensi nematoda selanjutnya didinginkan pada suhu ruang selama 3–5 menit. Sebanyak 500 µL campuran klorofom dan isoamil alkohol (24:1) ditambahkan dalam suspensi dan dicampurkan hingga homogen dengan digoyang dengan kuat selama 5 menit. Suspensi nematoda disentrifugasi pada kecepatan 11 000 rpm selama 20 menit. Supernatan hasil sentrifugasi diambil secara hati-hati dan dihitung volumenya. Supernatan ditambahi 1/10 CH₃COONa 3M, pH 5.2 dan 2/3 volume isopropanol dari total volume. Selanjutnya tabung diinkubasi pada suhu -20 °C selama semalam. Tabung disentrifugasi pada kecepatan 12 000 rpm selama 15 menit,

supernatannya dibuang, kemudian ditambah 500 μ L etanol 80%. Tabung disentrifugasi kembali pada kecepatan 12 000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang dan peletnya dikeringkan selama 1–2 jam, lalu ditambah 30 μ L bufer Tris-EDTA, pH 8.5 dan disimpan pada suhu -20 °C sampai digunakan.

Sebanyak 1 μ L suspensi DNA ditambahkan ke dalam campuran yang terdiri atas 12.5 μ L *Go tag green PCR master mix*, 1 μ L primer FAR-F1 5'-GAGACTTCCCGCAAATCACC-3', 1 μ L primer FAR-R1.5'-GCAGATGATTGT GACCGTTTAGTTC-3' dan 9.5 μ L ddH₂O sehingga didapat volume 25 μ L pada masing-masing tabung mikro. Reaksi amplifikasi terdiri atas denaturasi pada suhu 95 °C selama 30 detik, penempelan pada suhu 55 °C selama 30 detik, dan pemanjangan pada suhu 72 °C selama 90 detik. Siklus ini berlangsung sebanyak 44 kali dengan pemanjangan terakhir pada suhu 72 °C selama lima menit.

Visualisasi pita DNA dilakukan melalui proses elektroforesis. Sebanyak 0.3 g gel agarosa 1% dilarutkan dalam 30 mL larutan bufer (Tris-HCl 45 mM, asam borat 45 mM, EDTA 1 mM). Larutan gel agarosa dipanaskan pada mikrogelombang selama dua menit dengan tingkat pemanasan sedang. Gel agarosa yang telah dingin dituangkan ke dalam cetakan dan dibiarkan hingga mengeras. Pengukuran DNA menggunakan DNA ladder 100 pb. Sebanyak 5 μ L sampel DNA dimasukkan ke dalam sumuran yang telah dibentuk pada gel agarosa. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 50 V DC selama 50 menit. Hasil elektroforesis direndam di dalam larutan etidium bromida selama 30 menit lalu dalam air steril selama 1 menit. Visualisasi dilakukan menggunakan transluminator UV dan dokumentasi menggunakan kamera.

Analisis Sekuensing dan Konstruksi Pohon Filogenetika

Fragmen DNA hasil amplifikasi dikirimkan ke 1st BASE Laboratories Malaysia untuk diruntut DNA-nya. Hasil peruntukan 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). Sekuen nukleotida yang diperoleh dianalisis menggunakan penyejajaran berganda *Clustal W* pada perangkat lunak Bioedit *sequence alignment editor* versi 7.1.3. Hubungan kekerabatan antargalur nematoda dikonstruksi menggunakan perangkat lunak *molecular evolutionary genetic analysis* versi 10.0 (MEGA X) dengan *bootstrap* 1000 \times .

HASIL

Karakter Morfologi Nematoda *A. besseyi*

Nematoda *A. besseyi* berhasil diekstrak dari padi var. “Ciherang”, “Inpari Sidenuk”, “Sintanur”, “Hibrida Prima”, dan “Pak Tiwi”. Nematoda ini memiliki ciri bentuk vermiform dengan tubuh lurus atau sedikit melengkung. Ukuran tubuh nematoda betina lebih panjang daripada jantan. Nematoda ini memiliki stilet yang relatif kecil dengan pangkal sedikit membesar yang disebut stomatostilet dan bulbus median yang besar berbentuk oval serta kelenjar esofagus saling tumpang tindih (Gambar 1a). Vulva terdapat pada bagian posterior nematoda betina (Gambar 1b) dan spikula yang berbentuk seperti duri mawar terdapat pada nematoda jantan (Gambar 1c). Ciri khas lainnya ialah ekor meruncing berbentuk kerucut dan memiliki mukro (Gambar 1c). Bagian ekor nematoda betina terdapat dua mukro. Tubuh nematoda ramping dan berbentuk seperti cacing (Gambar 1d).

Hasil Pengukuran Morfometrik *A. besseyi*

Berdasarkan hasil morfometrik *A. besseyi* isolat Indonesia yang berasosiasi dengan varietas “Pak Tiwi”, “Sintanur”, “Hibrida Prima”, “Ciherang” dan Inpari Sidenuk” memiliki karakter dalam kisaran yang berbeda-beda (Tabel 1). Karakter *A. besseyi* yang diamati meliputi panjang tubuh (L), diameter tubuh maksimum (W), panjang stilet (S), persentase jarak vulva dari anterior terhadap panjang tubuh (V), dan persentase T merupakan perbandingan panjang gonad anterior dengan panjang tubuh (T). Panjang tubuh, panjang stilet, dan persentase jarak

vulva dari anterior terhadap panjang tubuh dari *A. besseyi* yang berasal dari lima varietas ini menunjukkan tidak berbeda nyata (Tabel 1). Diameter tubuh maksimum dan panjang ekor *A. besseyi* dari varietas “Ciherang”, “Pak Tiwi”, dan “Sintanur” berbeda nyata dengan *A. besseyi* dari varietas ”Hibrida Prima” dan “Inpari Sidenuk”.

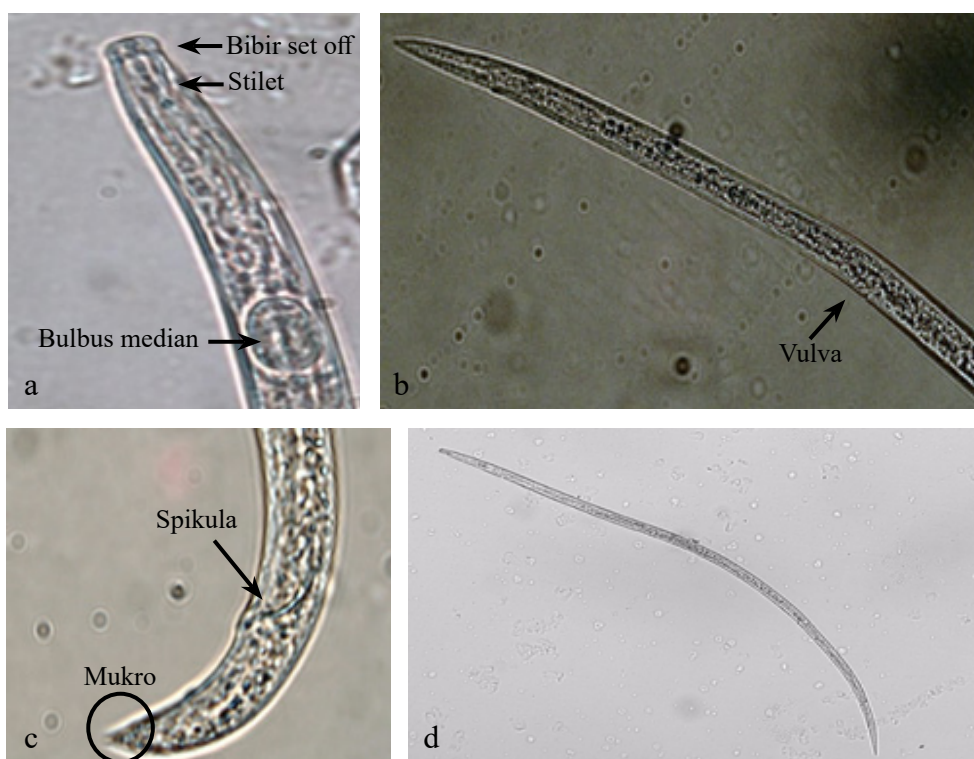
Hasil Amplifikasi Gen AB-FAR-1 dengan Polymerase Chain Reaction (PCR)

Amplifikasi gen AB FAR-1 berhasil dilakukan menggunakan

pasangan primer spesifik *forward* (5’-GAGACTTTCCCGCAAATCACC-3’) dan *reverse* (5’- GCAGATGATTGTGA CCGTTTAGTTC -3’). Kelima varietas padi mengandung gen AB FAR-1 dengan pita DNA berukuran sekitar 150 pb (Gambar 2).

Hasil Analisis Sekuensing dan Konstruksi Pohon Filogenetika

Gen AB FAR-1 *A. besseyi* isolat Indonesia dari varietas “Ciherang”, “Inpari Sidenuk”, “Sintanur”, “Hibrida Prima”, dan “Pak Tiwi” berhasil dirunut dengan panjang nukleotida



Gambar 1 Ciri nematoda *Aphelenchoides besseyi*. a, Stilet bertipe stomato stilet dan berbentuk seperti tombak, bibir sedikit melekok, dan bulbus median berukuran besar; b, Vulva nematoda betina; C, Spikula pada nematoda jantan berbentuk seperti duri mawar dan mukro pada ujung ekor berjumlah 2; dan d, Tubuh nematoda.

Tabel 1 Karakter morfometrik *Aphelenchoides besseyi* dari lima varietas padi

<i>A. besseyi</i> pada varietas padi	Karakter morfometrik				
	L	W	S	V	T
Ciherang	553 a	14.536 b	12.833 a	72.016 a	36.527 b
Pak Tiwi	636 a	14.350 b	11.716 a	70.280 a	35.840 b
Sintanur	630 a	13.733 b	12.216 a	70.973 a	30.673 b
Hibrida Prima	667 a	18.993 a	12.323 a	68.383 a	45.593 a
Inpari Sidenuk	636 a	18.013 a	12.273 a	69.043 a	46.806 a

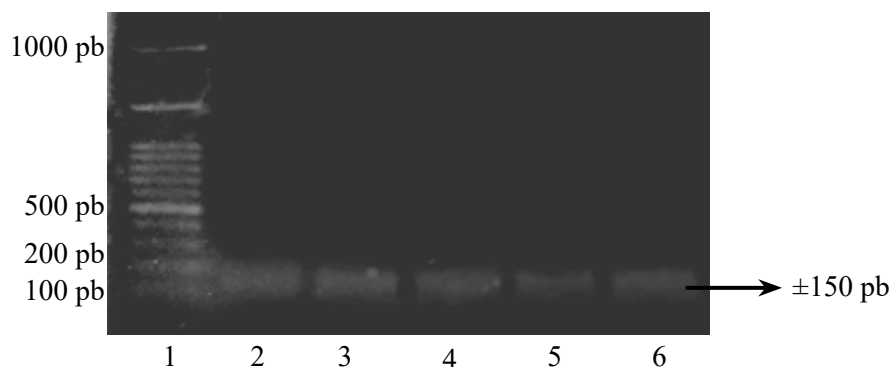
Keterangan: L, Panjang tubuh (µm); W, Diameter tubuh maximum (µm); S, Panjang stilet (µm); V, Persentase jarak vulva dari anterior terhadap panjang tubuh (%); dan T, Perbandingan panjang gonad anterior dengan panjang tubuh (%).

sekitar 120 pb. Tingkat homologi nukleotida gen AB FAR-1 isolat dari varietas “Pak Tiwi” dan “Sintanur” dengan isolat *A. besseyi* dari Cina sebesar 100%, sedangkan pada varietas “Ciherang” 95%, “Hibrida Prima” 98.3%, “Inpari Sidenuk” 92.5%. Hal ini menunjukkan bahwa *A. besseyi* dari padi asal Indonesia berkerabat dekat dengan JQ686690.1 dari Cina (Tabel 2). Tingkat homologi asam amino gen AB FAR-1 isolat dari varietas ‘Pak Tiwi’, “Sintanur” dengan isolat *A. besseyi* dari Cina sebesar 100%, sedangkan pada varietas “Ciherang” dan “Inpari Sidenuk” 89.7%, dan “Hibrida Prima” 94.8%. (Tabel 2).

Runutan nukleotida Gen AB FAR-1 *A. besseyi* Indonesia pada varietas “Ciherang” berbeda dengan *A. besseyi* Cina JQ686690.1, “Pak Tiwi”, dan “Sintanur” pada posisi nukleotida ke-4, 8, 13, 14, dan 15. *A. besseyi* Indonesia varietas “Inpari Sidenuk” berbeda dengan *A. besseyi* Cina JQ686690.1, “Pak Tiwi”, dan “Sintanur” pada posisi nukleotida 6, 8, 11, 12, 14, 15, 17, dan 19, sedangkan *A.*

besseyi Indonesia varietas “Hibrida Prima” berbeda dengan *A. besseyi* Cina JQ686690.1, “Pak Tiwi”, dan “Sintanur” pada posisi nukleotida ke-95 dan 115 (Gambar 3). Runutan asam amino gen AB FAR-1 *A. besseyi* pada varietas “Ciherang” berbeda dengan *A. besseyi* Cina JQ686690.1, “Pak Tiwi”, dan “Sintanur” pada posisi ke-2, 3, 5, dan 18, sedangkan *A. besseyi* Indonesia varietas “Inpari Sidenuk” terjadi perbedaan pada posisi ke-3, 4, 5, dan 6, serta pada “Hibrida Prima” terdapat perbedaan asam amino pada urutan ke-32 dan 38 (Gambar 4).

Analisis filogenetika dari runutan nukleotida dan asam amino menunjukkan bahwa terdapat dua grup *A. besseyi*. Grup 1 terdiri atas AB FAR-1 “Cina JQ686690.1”, “Pak Tiwi”, “Sintanur”, dan “Hibrida Prima”. Grup 2 terdiri atas AB FAR-1 “Ciherang” dan “Inpari Sidenuk”. *A. fragariae* berada di luar pengelompokan dikarenakan *A. fragariae* merupakan outgroup yang digunakan dalam analisis pohon filogenetika (Gambar 5 dan 6).

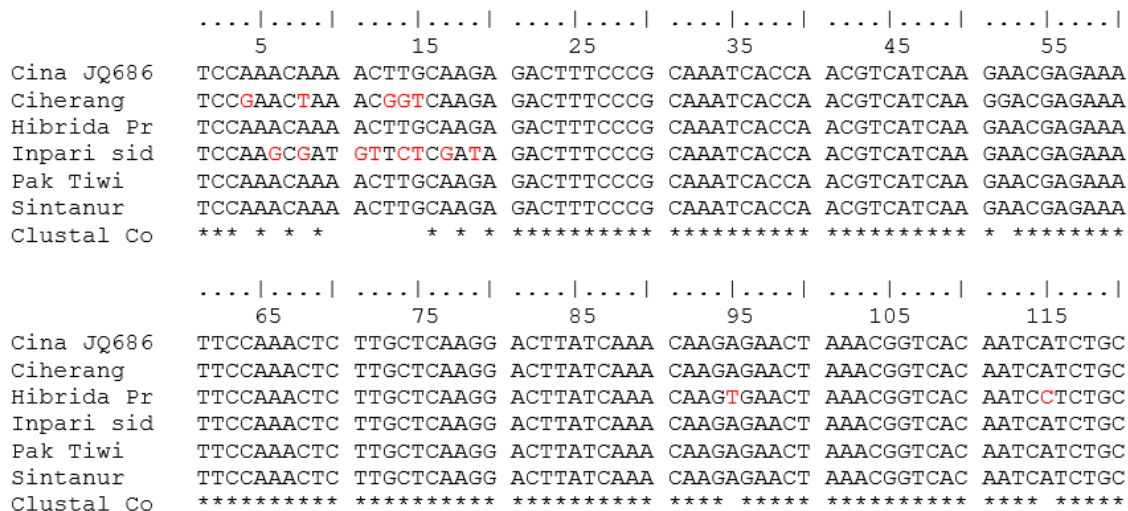


Gambar 2 Hasil amplifikasi Gen AB-FAR-1 *Aphelenchoides besseyi* pada lima galur padi menggunakan primer spesifik: 1, DNA ladder 100 pb (Thermoscientific, US); 2, “Ciherang”; 3, “Pak Tiwi”; 4, “Hibrida Prima”; 5, “Sintanur”; 6, “Inpari Sidenuk”.

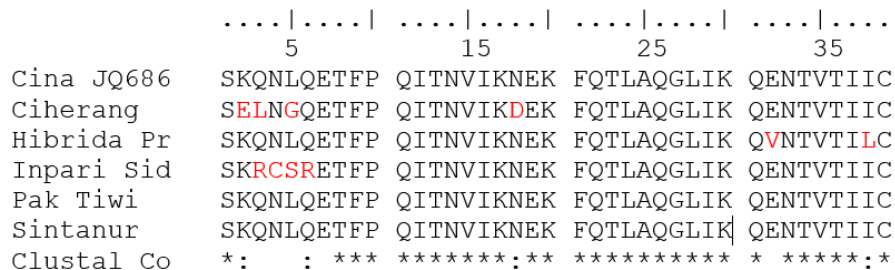
Tabel 2 Matriks homologi sekuen nukleotida dan asam amino gen AB-FAR1 *Aphelenchoides besseyi* pada varietas benih padi asal Indonesia dibandingkan dengan asal Cina

No	AB FAR-1 varietas	Negara asal	No Akses	Homologi sekuen nukleotida (%)	
				Nukleotida	Asam amino
1	“Cina JQ686690.1”	Cina	JQ686690.1	100	100
2	“Ciherang”	Indonesia	Na	95	89.70
3	“Hibrida Prima”	Indonesia	Na	98.30	94.80
4	“Inpari Sidenuk”	Indonesia	Na	92.50	89.70
5	“Pak Tiwi”	Indonesia	Na	100	100
6	“Sintanur”	Indonesia	Na	100	100

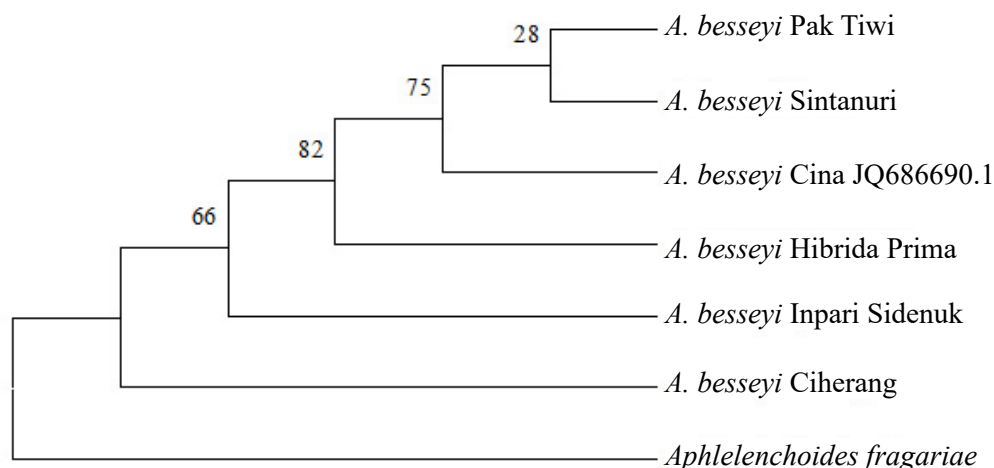
Keterangan: Na (belum ada nomor akses).



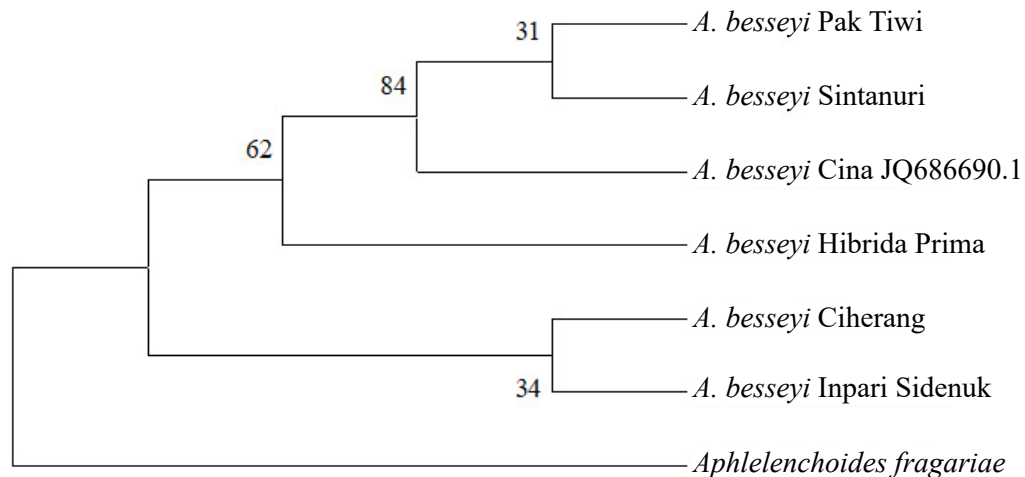
Gambar 3 Hasil analisis penyejajaran runutan nukleotida gen AB FAR-1 *Aphelenchoides besseyi* pada lima varietas padi menggunakan program ClustalW (tanda * menunjukkan nukleotida yang identik).



Gambar 4 Hasil analisis penyejajaran runutan asam amino gen AB FAR-1 menggunakan program ClustalW (tanda * menunjukkan asam amino yang identik).



Gambar 5 Pohon filogenetika *Aphelenchoides besseyi* dari benih padi galur “Ciherang”, “Inpari Sidenuk”, “Sintanur”, “Hibrida Prima”, dan “Pak Tiwi” dengan outgroup *Aphelenchoides fragariae* berdasarkan peruntukan nukleotida AB FAR-1 menggunakan program MEGA v.10.0 dengan metode Maximum Likelihood dengan bootstrap 1000×.



Gambar 6 Pohon filogenetika *Aphelenchoides besseyi* dari benih padi galur “Ciherang”, “Inpari Sidenuk”, “Sintanur”, “Hibrida Prima”, dan “Pak Tiwi” berdasarkan perunutatan asam amino AB FAR-1 menggunakan program MEGA v.10.0 dengan metode Maximum Likelihood dengan bootstrap 1000×.

PEMBAHASAN

PCR merupakan salah satu teknik identifikasi molekuler suatu gen target dari suatu spesies dengan menggunakan primer spesifik. Gen yang menjadi target dalam identifikasi nematoda parasit tumbuhan, di antaranya ialah gen CO1, daerah ITS rDNA, SSU rDNA, dan gen AB-FAR 1.

Primer FAR-F1 dan FAR-R1 merupakan primer spesifik untuk mengamplifikasi gen AB-FAR 1 *A. besseyi* dengan ukuran target sebesar 150 pb. Pasangan primer dianggap spesifik hanya jika tidak memiliki ampikon pada target apa pun selain *template* yang digunakan dalam ambang kekhususan yang ditentukan oleh pengguna. Jika tidak, primer tersebut dianggap tidak spesifik. Amplifikasi spesifik dari target yang dituju mensyaratkan bahwa primer tidak memiliki kecocokan dengan target lain dalam orientasi tertentu dan dalam jarak tertentu yang memungkinkan amplifikasi yang tidak diinginkan (Ye *et al.* 2012). Dalam mendesain primer, banyak kondisi yang harus dipertimbangkan secara seksama, yaitu panjang primer, perbedaan panjang pasangan primer, kandungan GC primer, komposisi nukleotida pada ujung primer 3, (yaitu GC clamp), ukuran produk PCR, konsentrasi reagen buffer PCR, struktur sekunder yang stabil (eliminasi *dimer* dan

hairpin), suhu leleh primer, dan perbedaan suhu leleh pasangan primer (Yuryev *et al.* 2002; Housley *et al.* 2006; Andreson *et al.* 2008 ; Boyle *et al.* 2009).

Nematoda *A. besseyi* merupakan patogen terbawa benih yang ditemukan pada benih varietas “Pak Tiwi”, “Sintanur”, “Hibrida Prima”, “Ciherang”, dan “Inpari Sidenuk”. Benih varietas “Pak Tiwi”, “Sintanur”, dan “Cina JQ686690.1” memiliki homologi atau kemiripan yang sama baik dari sikuen nukleotida maupun asam amino. Jika sikuen nukleotida atau sikuen asam amino suatu protein dari suatu organisme yang dibandingkan memiliki kemiripan, maka kedua sikuen tersebut diduga diturunkan dari sikuen nenek moyang yang sama (*common ancestor*).

Analisis penyejajaran sikuen nukleotida akan menunjukkan di mana posisi sikuen yang tidak berubah atau terkonservasi dan mana yang berubah atau bervariasi dan berkembang menjadi berbeda dari nenek moyang yang sama. Penyejajaran sikuen jamak (*multiple sequence alignment*) nukleotida dan asam amino dapat dilakukan dengan program *Clustal W* yang tersedia pada *software* “BioEdit *sequence alignment editor* versi 7.1.3”. Penyejajaran sikuen jamak merupakan penyejajaran tiga atau lebih sikuen nukleotida dan asam amino (Mount 2004). Penyejajaran ini dapat

digunakan untuk melihat homologi baik secara keseluruhan ataupun parsial, yang nanti hasilnya dapat digunakan untuk melihat kekerabatan antar spesies (Mount 2004). Tujuan dari analisis penyejajaran ialah mencocokkan urutan nukleotida yang homolog, yang mempunyai nenek moyang yang sama (Kemena dan Notredame 2009), sehingga dapat melihat hubungan evolusi antar sikuen (Mount 2004).

Pada analisis penyejajaran, AB FAR-1 varietas “Hibrida Prima”, “Ciherang”, dan “Inpari Sidenuk” mengalami perubahan basa nitrogen pada beberapa posisi tertentu. Adanya perubahan tersebut akan mempengaruhi pembentukan asam amino sehingga berpengaruh pula pada pembentukan protein. Dalam analisis filogenetika data sikuen nukleotida atau protein diolah sehingga dapat menggambarkan hubungan kekerabatan evolusi suatu kelompok organisme (Hidayat dan Pancoro 2008). Hasil peruntukan nukleotida digunakan untuk menganalisis filogenetika nematoda *A. besseyi* sehingga dapat mengetahui asal usulnya.

Karakterisasi suatu gen AB FAR-1 secara lengkap perlu dilakukan untuk mengetahui keberhasilan pengendalian menggunakan RNA-*i*. RNA-*i*. Hal ini merupakan teknik menghambat atau mencegah ekspresi gen melalui pemanfaatan sifat komplemen (berpasangan) RNA dengan potongan nukleotida atau RNA berukuran pendek (sekitar 21–23 nukleotida) (Cheng *et al.* 2013). Ada tiga mekanisme RNA-*i* dalam melakukan inaktivasi terhadap gen, yaitu mendorong terjadinya degradasi akibat terbentuknya kompleks gen dengan RNA-*i*, menghambat terjadinya translasi akibat terhalangnya RNA ribosom membaca urutan gen karena terbentuknya kompleks RNA-gen, serta induksi modifikasi kromatin dengan promoter sehingga gen mengalami inaktivasi (Cheng *et al.* 2013). Gen FAR memiliki peranan yang sangat penting dalam proses perkembangan infeksi nematoda parasit tumbuhan dan mengganggu reaksi pertahanan tanaman terhadap nematoda. Dengan demikian, penghambatan gen FAR berpotensi sebagai

salah satu cara pengendalian *A. besseyi* (Cheng *et al.* 2013).

Gen AB-FAR 1 berhasil diamplifikasi menggunakan primer spesifik FAR-F1 dan FAR-R1. Analisis penyejajaran dan filogenetika juga telah dilakukan untuk mengetahui runutan nukleotida dan asam amino gen AB FAR-1 *A. besseyi* pada beberapa varietas benih padi. Hasil ini dapat digunakan dalam karakterisasi lanjut pengendalian *A. besseyi* dengan inaktivasi gen AB FAR-1.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia untuk dana penelitian melalui Skema Penelitian PDUPT tahun 2018 dengan kontrak no. 1744/IT3.11/PN/2018. Terima kasih kepada Ade Indra Maulana Sembiring, Derma Erni Harefa, dan Maurice Yosua Hutauruk untuk bantuan dalam ekstraksi nematoda dan DNA.

DAFTAR PUSTAKA

- Andreson R, Mols T, Remm M. 2008. Predicting failure rate of PCR in large genomes. *Nucleic Acids Res.* 36(11):e66. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkn290>.
- Boyle B, Dallaire N, MacKay J. 2009. Evaluation of the impact of single nucleotide polymorphisms and primer mismatches on quantitative PCR. *BMC Biotechnol* 9:75. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-75>.
- Chalanska A, Labanowski G, Malewski T. 2011. Rapid microscopic and molecular method *Aphelenchoides* species identification. *Comm Agric Appl Biol Sci.* 76(3):399–402.
- Cheng X, Xiang Y, Xie H, Xu LC, Xie FT, Zhang C, Li Y. 2013. Molecular characterization and functions of fatty acid and retinoid binding protein gene (Ab-far-1) in *Aphelenchoides besseyi*. *PLoS One.* 8(6):1–9. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066011>.

- Doyle JJ, Doyle JL. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus*. 12:13–15. DOI: <https://doi.org/10.2307/2419362>.
- [EPPO] European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2017. *Aphelenchoides besseyi*. EPPO Bull. 47(3):384–400. DOI: <https://doi.org/10.1111/epp.12432>.
- Hidayat T, Pancoro A. 2008. Ulasan kajian filogenetika molekuler dan peranannya dalam menyediakan informasi dasar untuk meningkatkan kualitas sumber genetik anggrek. *J ArgoBiogen*. 4(1):35–40. DOI: <https://doi.org/10.21082/jbio.v4n1.2008.p35-40>.
- Housley DJE, Zalewski ZA, Beckett SE, Venta PJ. 2006. Design factors that influence PCR amplification success of cross-species primers among 1147 mammalian primer pairs. *BMC Genomics*. 7(1):253. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-253>.
- Kemena C, Notredame C. 2009. Upcoming challenges for multiple sequence alignment methods in the high-throughput era. *Bioinformatics* 25(19):2455–2465. DOI: <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp452>.
- Mount DW. 2004. *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*. New York (US): Cold Spring Harbor Laboratory.
- Remeus PM, Pelazza N. 2014. Detection of *Aphelenchoides besseyi* on *Oryza sativa*. Annexe to chapter 7: Seed Health Testing Methods. Switzerland (CH): ISTA.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13:134. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.
- Yuryev A, Huang J, Pohl M, Patch R, Watson F, Bell P, Donaldson M, Phillips MS, Boyce-Jacino MT. 2002. Predicting the success of primer extension genotyping assays using statistical modeling. *Nucleic Acids Res*. 30(23):e131. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gnf131>.