

## **Deteksi dan Identifikasi Nematoda *Aphelenchoides besseyi* dari Benih Padi**

### **Detection and Identification of *Aphelenchoides besseyi* from Rice Seeds**

**Rizky Mailani Rahman, Abdul Munif\*, Fitrianingrum Kurniawati**  
Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

#### **ABSTRAK**

*Aphelenchoides besseyi* merupakan nematoda parasit tumbuhan penting pada padi dan dapat menyebabkan kehilangan hasil hingga 54%. Nematoda ini dapat bertahan selama 8 bulan hingga 3 tahun setelah panen dan dapat ditularkan melalui benih. Penelitian ini bertujuan mengamati tingkat infestasi nematoda *A. besseyi* pada benih dari lima varietas padi (Pak Tiwi 1, IR64, Ciherang, IPB 3S, dan SL 8 SHS), mengidentifikasi *A. besseyi* secara morfologi dan molekuler dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR), dan sikuensing. Nematoda diekstraksi dari 5 g benih setiap varietas menggunakan metode Baermann yang dimodifikasi. Identifikasi morfologi dilakukan menggunakan preparat semipermanen nematoda dewasa. Identifikasi molekuler dengan PCR menggunakan pasangan primer ITS rDNA dilanjutkan dengan sikuensing produk amplifikasi. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa *A. besseyi* didapatkan pada 5 varietas dengan jumlah yang bervariasi. Nematoda ini memiliki ciri khas yang dapat dibedakan dari spesies lain, yaitu mukro (tonjolan pada ujung ekor) berbentuk bintang dan berjumlah 2–4. Amplifikasi DNA menghasilkan pita DNA yang berukuran sekitar 830 pb. Hasil sikuensing menunjukkan bahwa *A. besseyi* Indonesia (isolat Pak Tiwi 1) mempunyai homologi yang tinggi dengan isolat *A. besseyi* India Drr Ab1 dan India Kolkata yaitu sebesar 98.1%, isolat India Hyderabad 98.0%, Cina HB 97.8%, Taiwan HW 97.7%, dan Cina AB11 97.5%.

Kata kunci: amplifikasi DNA, homologi, mukro, *polymerase chain reaction*, primer ITS rDNA

#### **ABSTRACT**

*Aphelenchoides besseyi* is an important plant parasitic nematode on rice and causes yield loss up to 54%. The nematodes are able to survive for 8 months to 3 years after harvest and can be transmitted through seeds. The research was conducted to determine infestation of *A. besseyi* on seeds of five rice cultivars, namely Pak Tiwi 1, IR64, Ciherang, IPB 3S, and SL 8 SHS; and to identify *A. besseyi* by morphological and molecular techniques using polymerase chain reaction (PCR), and nucleotide sequencing. The nematodes were extracted from 5 g seeds of each cultivar by modified Baermann funnel method. Morphological identification was done by observing semipermanent slide of adult nematodes. Molecular identification by PCR used universal primers to amplify ITS rDNA followed by nucleotide sequencing. The result showed that *A. besseyi* were found on 5 rice cultivars in varies numbers. *A. besseyi* has specific morphological character, i.e. it has 2–4 mucro (tail tip) arranged in a star shaped that can be distinguished from other species. DNA fragments with approximately 830 bp in length was successfully amplified. Further nucleotide sequence analysis showed that *A. besseyi* Indonesia (isolate Pak Tiwi 1)

---

\*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Jalan Kamper, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680  
Tel: 0251-8621267, Faks: 0251-8621267, Surel:munif73@gmail.com

had the highest homology level of 98.1% with *A. besseyi* isolat India Drr Ab 1 and Kolkata, 98.0% with India Hyderabad, 97.8% with China HB, 97.7% with Taiwan HW, and 97.5% with Cina AB11.

Key words: DNA amplification, homology, ITS rDNA primer, mucro, *polymerase chain reaction*

## PENDAHULUAN

*Aphelenchoides besseyi* merupakan spesies nematoda yang menyebabkan penyakit pucuk putih (*white tip disease*) dan tersebar luas di area pertanaman padi di seluruh dunia (Jamali dan Mousanejad 2011; Nicol *et al.* 2011). Nematoda *A. besseyi* sudah tersebar ke seluruh negara Eropa, Asia (termasuk Indonesia), Afrika, Amerika Utara, Amerika Tengah dan Karibian, Amerika Selatan dan Oceania (EPPO 2005). Spesies ini termasuk organisme pengganggu tanaman karantina (OPTK) A2 yang daerah penyebarannya pada areal terbatas di Jawa, Sumatera, dan Kalimantan Selatan (Kementan 2015).

Sejak awal abad ke-20, *A. besseyi* telah dilaporkan menyebabkan kehilangan hasil yang serius pada pertanaman padi di Jepang dan sebagian Amerika Serikat. Nematoda *A. besseyi* dapat menurunkan produksi padi sebesar 17–54% pada tanaman rentan dan 0–24% pada tanaman tahan (EPPO 2005). Setiap ditemukan 6000 nematoda per 1 g benih dapat mengakibatkan kehilangan hasil. Kehilangan hasil mencapai 14.5–46.7% di Jepang, 40–50% di Amerika Serikat, 29–46% di Taiwan, 41–71% di Rusia, dan 20–60% di India (Amin 2002).

Informasi tentang spesies nematoda *A. besseyi* di Indonesia masih terbatas. Kurniawati dan Supramana (2016) telah melaporkan keberadaan *A. besseyi* pada delapan varietas padi di Bogor, Jawa Barat dan mengidentifikasinya berdasarkan karakter morfologi. Identifikasi secara morfologi memerlukan ketelitian yang tinggi untuk mendapatkan hasil identifikasi yang akurat namun lebih praktis. Hasil identifikasi secara morfologi dapat diperkuat dengan identifikasi molekuler dengan *polymerase chain reaction* (PCR) dan sikuensing. Penelitian ini bertujuan mendeteksi dan mengidentifikasi *A. besseyi* pada 5 varietas benih padi secara morfologi dan molekuler dengan teknik PCR dan sikuensing.

## BAHAN DAN METODE

### Ekstraksi Nematoda

Sampel benih padi yang digunakan terdiri atas 5 varietas, yaitu IPB 3S, Pak Tiwi 1, Ciherang, IR64, dan SL 8 SHS yang banyak ditanam di wilayah Jawa Barat. Pemilihan varietas dilakukan berdasarkan pada pengamatan gejala di lapangan. Setiap varietas diambil sebanyak 5 g dengan masing-masing 3 ulangan. Ekstraksi nematoda dilakukan menggunakan metode corong Baermann yang dimodifikasi pada pemotongan bagian hilum benih padi dan diinkubasi 24 jam pada ruang gelap (Remeeus dan Pelazza 2014).

### Pembuatan Preparat Semipermanen

Preparat semipermanen dibuat berdasarkan metode Goodey (1937) yang dimodifikasi tanpa menggunakan *glass woll*. Lingkaran parafin dibuat di atas kaca objek menggunakan *cork borer*, kemudian ditetesi laktofenol di tengah lingkaran parafin. Sebanyak 3–5 ekor nematoda *A. besseyi* yang sebelumnya sudah difiksasi dalam larutan *fuchsin acetic acid* (FAA) diletakkan pada larutan laktofenol dengan posisi sejajar, selanjutnya ditutup dengan kaca penutup. Preparat kemudian dipanaskan sampai cincin parafin meleleh dan kaca penutup merekat bersama parafin. Di tepi kaca penutup direkatkan dengan kuteks bening.

### Identifikasi Nematoda *A. besseyi*

Identifikasi *A. besseyi* dilakukan secara morfologi dan molekuler. Pengamatan morfologi *A. besseyi* dilakukan dengan sampling, untuk tiap varietas diambil masing-masing 10 individu (kecuali varietas IR 64 diambil 8 individu) kemudian dikompositkan sehingga jumlah nematoda yang diamati morfologinya sejumlah 48 ekor. Morfologi nematoda betina *A. besseyi* yang diamati mengacu pada EPPO (2004) dan Fortuner (1970). Identifikasi molekuler dilakukan

menggunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR).

Proses PCR diawali dengan ekstraksi DNA total berdasarkan metode *cetyltrimethyl ammonium bromide* (CTAB) (Doyle dan Doyle 1990) yang dimodifikasi di bagian inkubasi pada suhu 60 °C selama 2 jam. Sebanyak 3 mL bufer ekstraksi (2 mL EDTA, 5 mL Tris-HCl, 12.6 mL NaCl, 20.4 mL dH<sub>2</sub>O) ditambahi 1% merkaptotanol, kemudian dipanaskan pada suhu 60 °C selama 10 menit. Sebanyak 0.1 g benih padi dari masing-masing varietas digerus dengan mortar dan pistil kemudian ditambah nitrogen cair, dan 500 µL bufer ekstraksi yang telah dipanaskan. Hasil gerusan dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* 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), didinginkan pada suhu ruang selama 3–5 menit, ditambahi 500 mL campuran klorofom dan isoamil alkohol (24:1), dan diaduk dengan vorteks selama 5 menit hingga homogen. Suspensi disentrifugasi pada kecepatan 11 000 rpm selama 20 menit. Supernatan hasil sentrifugasi diambil secara hati-hati dan dihitung volumenya. Sebanyak 1/10 sodium asetat (CH<sub>3</sub>COONa 3M; pH 5.2) dan 2/3 volume isopropanol dari total volume ditambahkan ke dalam supernatan. Tabung berisi suspensi selanjutnya diinkubasi pada suhu -20 °C selama 1 malam kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12 000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang, kemudian 500 µL etanol 80% ditambahkan ke dalam tabung. Tabung disentrifugasi kembali pada kecepatan 12 000 rpm selama 15 menit, supernatan dibuang, dan pelet DNA dikeringkan selama 1–2 jam. Pelet DNA kemudian disuspensi kembali menggunakan 30 µL bufer Tris-EDTA (TE) (pH 8.5) dan disimpan pada suhu -20 °C sampai digunakan.

Amplifikasi DNA *A. besseyi* dilakukan pada mesin Thermo Cycler PCR (Applied Biosystem P9700). Primer yang digunakan ialah primer untuk mengamplifikasi daerah ITS 1 dan 2 (5' TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT 3') dan (5' TTC ACT CGC CGT TAC TAA GG 3') (Joyce *et al.* 1994).

Sebanyak 1 µL suspensi DNA ditambahkan ke dalam campuran yang terdiri atas 12.5 µL *GoTaq green PCR master mix* (Promega USA), 1 µL primer (*reverse dan forward*), dan 9.5 µL ddH<sub>2</sub>O, sehingga diperoleh volume 25 µL pada masing-masing tabung mikro. Reaksi amplifikasi terdiri atas denaturasi pada suhu 95 °C selama 30 detik, aneling pada suhu 55 °C selama 30 detik, dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 90 detik; siklus ini berlangsung sebanyak 44 kali dengan ekstensi terakhir pada suhu 72 °C selama 5 menit (Khan *et al.* 2012).

Pita DNA hasil amplifikasi divisualisasi melalui elektroforesis. Sebanyak 5 µL sampel DNA dimasukkan ke dalam sumuran gel agarosa. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 50 V DC selama 50 menit, kemudian gel agarosa direndam ke dalam larutan etidium bromida selama 30 menit, selanjutnya ke dalam air steril selama 1 menit. Visualisasi dilakukan dengan transluminator UV dan didokumentasikan dengan kamera (Mirsam *et al.* 2015).

### Sikuensing ITS rDNA *A. besseyi*

Sikuensing ITS rDNA dilakukan dengan mengirimkan hasil amplifikasi PCR ke PT. Genetika Science Indonesia. Hasil peruntukan dianalisis menggunakan program *basic local alignment search tool* (BLAST) yang terdapat dalam situs *national center for biotechnology information* (NCBI). Runutan nukleotida yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan penyejajaran berganda *Clustal W* pada perangkat lunak Bioedit *sequence alignment editor* v 7.1.3. Hubungan kekerabatan antar isolat dikonstruksi menggunakan perangkat lunak *molecular evolutionery genetic analysis* v 6.06 (MEGA6) dengan pendekatan *maximum likelihood* dengan *bootstrap* 1000 kali ulangan.

## HASIL

### Infestasi dan Morfologi *A. besseyi*

Nematoda *A. besseyi* ditemukan menginfestasi semua varietas benih padi yang diamati dengan tingkat infestasi yang beragam (Tabel 1). Morfologi nematoda *A. besseyi*

yang ditemukan bertubuh ramping, silindris, anulasi tidak kasar, dan posisi tubuh pada saat inaktif atau mati lurus atau sedikit melengkung (Gambar 1 a–b), bibir *set off* dan stilet dengan tipe stomatostilet (Gambar 1 d).

Nematoda *A. besseyi* memiliki bulbus median yang berukuran besar, sekitar  $\frac{3}{4}$  dari lebar tubuhnya (Gambar 1 g). Ekor nematoda berbentuk seperti kerucut dan memiliki tonjolan (mukro) pada ujung ekor yang berjumlah 2–4 dan sering tampak seperti bintang sehingga disebut sebagai *star shaped mucro* (Gambar 1 e). Nematoda jantan memiliki spikula yang

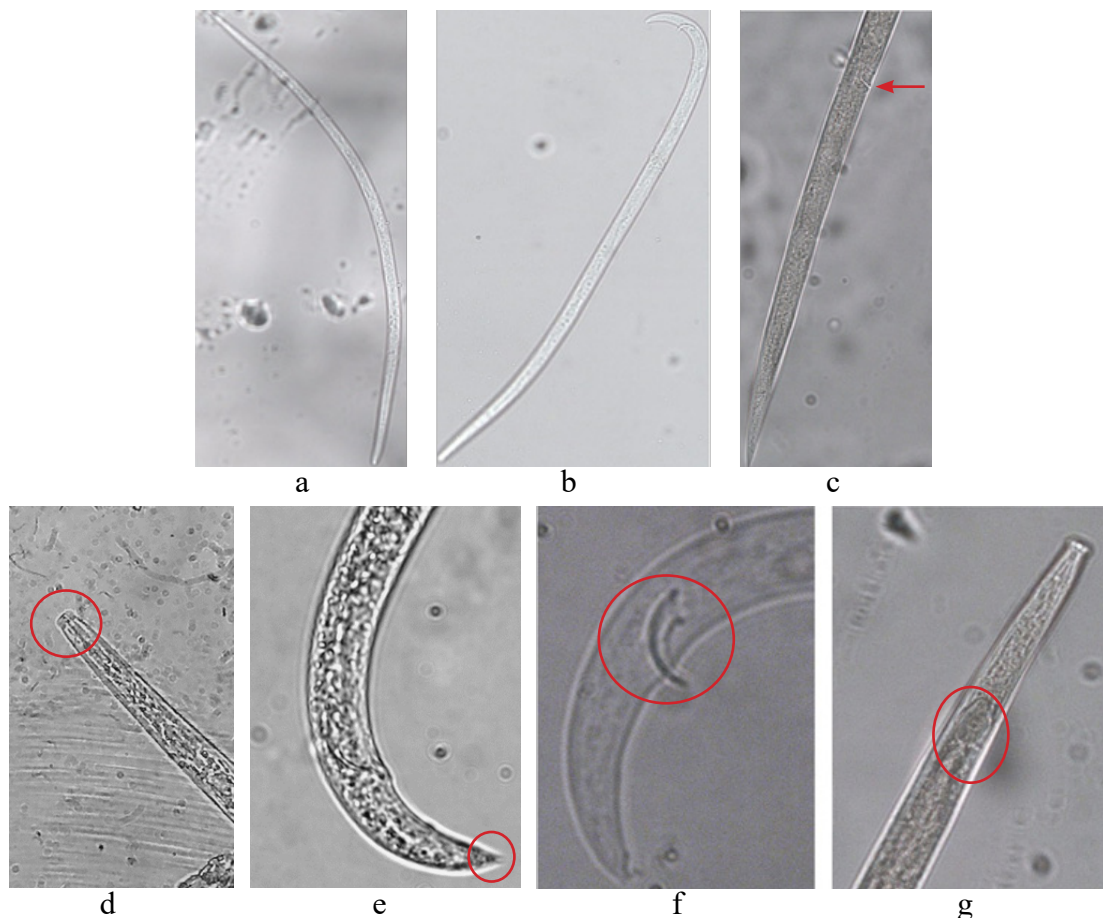
berbentuk seperti duri (Gambar 1 f), sedangkan betinanya memiliki vulva yang terletak 60-75% dari panjang tubuh (didelfik) (Gambar 1 c). Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Fortuner (1970), EPPO (2004), dan Kurniawati dan Supramana (2016).

**Amplifikasi DNA *A. besseyi* dengan PCR**

*A. besseyi* berhasil dideteksi dengan PCR. Hasil amplifikasi pada 5 varietas padi menunjukkan reaksi positif yang dapat dibuktikan dengan keberadaan pita DNA berukuran  $\pm 830$  pb (Gambar 2).

Tabel 1 Rata-rata jumlah nematoda *Aphelenchoides besseyi* pada lima varietas benih padi

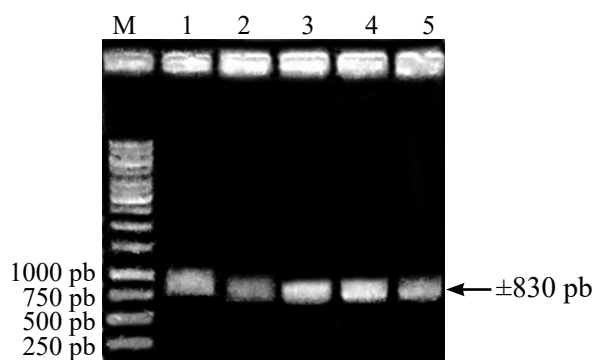
Varietas Padi	Rata-rata nematoda <i>A. besseyi</i> per 5 g benih
Pak Tiwi 1	478
SL 8 SHS	312
IPB 3 S	308
Ciherang	61
IR64	8



Gambar 1 Morfologi *A. besseyi*; a, Nematoda betina; b, Nematoda jantan; c, Vulva; d, Stilet; e, Mukro; f, Spikula, dan g, Median bulbus.

### Sikuensing DNA *A. besseyi*

Fragmen DNA *A. besseyi* isolat Pak Tiwi 1 berhasil dirunut dengan panjang sekitar 761 pb. Analisis kesejajaran dengan *ClustalW* menunjukkan bahwa isolat asal Indonesia tersebut mempunyai homologi dengan isolat asal India, Cina, dan Taiwan. Tingkat homologi isolat tersebut, yaitu 98.1% dengan isolat *A. besseyi* India Drr Ab1 dan India kolkata, 98.0% dengan isolat India Hyderabad, 97.8% dengan isolat Cina Hebei, 97.7% dengan isolat Taiwan, 97.5% dengan isolat Cina AB11, 71.6% dengan isolat *Aphelenchoides* sp. Jepang J8503, dan 53.3% dengan isolat *Bursaphelenchus mucronatus* RU-DE-30 (w) Polandia (Tabel 2). Analisis filogenetika menunjukkan bahwa *A. besseyi* Pak Tiwi 1 asal Indonesia berkerabat dekat dengan India Drr Ab1, India kolkata, India Hyderabad, Cina Hebei, Taiwan dan Cina AB11 (Gambar 3).



Gambar 2 Hasil amplifikasi DNA *A. besseyi* dari benih padi. M, Penanda DNA 1 kb (Thermo Scientific USA); Sampel benih padi: 1, varietas Pak Tiwi 1; 2, varietas IR64; 3, varietas Ciherang; 4, varietas IPB 3S; 5, varietas SL 8 SHS.

Tabel 2 Homologi runutan nukleotida spesies *A. besseyi* isolat Pak Tiwi 1 asal Indonesia dengan isolat-isolat yang ada pada GenBank

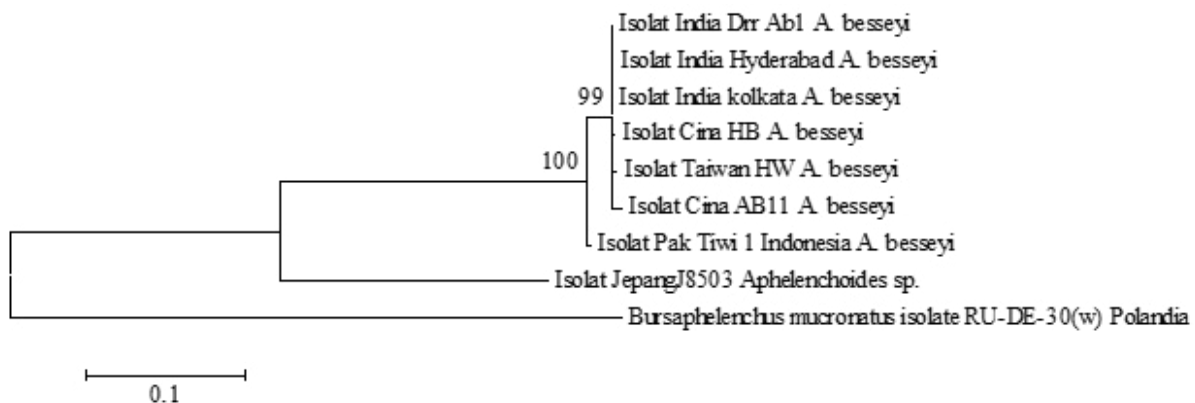
Spesies	Isolat	Asal	No Akses	Homologi (%)
<i>Aphelenchoides besseyi</i>	Drr Ab1	India	JF932290	98.1
	Kolkata	India	JF826517	98.1
	Hyderabad	India	JF826519	98.0
	HB	Cina	KP757373	97.8
	HW	Taiwan	MF669509	97.7
	AB11	Cina	KJ009342	97.5
<i>Aphelenchoides</i> sp.	J8503	Jepang	FJ768943	71.6
<i>Bursaphelenchus mucronatus</i>	RUDE30	Polandia	KT581991	53.3

### PEMBAHASAN

*A. besseyi* adalah nematoda ektoparasit berpindah dan dapat bertahan dalam benih padi pada kondisi anhidrobiosis. Ketika benih padi tersebut disemai *A. besseyi* akan aktif kembali karena adanya air, bergerak menuju titik tumbuh dan sejalan dengan pertumbuhan tanaman akan mencapai ujung daun sehingga menyebabkan gejala pucuk putih. Ketika padi masuk pada fase generatif dan menghasilkan malai, nematoda ini bergerak menuju malai, tumbuh dan berkembangbiak, dan kembali masuk fase bertahan dalam kondisi anhidrobiosis pada saat panen. *A. besseyi* mampu bertahan pada kondisi kering dan menetap di bawah sekam atau kulit padi, serta tersebar melalui benih yang terinfestasi (Togashi dan Hoshino 2001).

Mobilitas nematoda antarbagian tanaman bergantung pada keberadaan lapisan air di permukaan jaringan tanaman (Luc *et al.* 1995). *A. besseyi* dapat bertahan selama 2–3 tahun pada benih dalam kondisi kering dan mati dalam 4 bulan pada bulir padi yang tertinggal di lahan. Nematoda *A. besseyi* tidak bisa bertahan dalam waktu yang lama di dalam tanah (EPPO 2013).

Mao-song *et al.* (2004) melaporkan bahwa padi yang terinfeksi oleh *A. besseyi* menunjukkan gejala yang berbeda pada lingkungan dan kultivar yang berbeda. Dalam penelitiannya, gejala yang paling sering ditemukan bukan pucuk putih melainkan ukuran bulir yang kecil. Gejala khas lainnya ialah tanaman padi tumbuh kerdil, panikel



Gambar 3 Pohon filogenetika *A. besseyi* Pak Tiwi 1 asal Indonesia dengan *A. besseyi* dari negara lain yang terdapat pada GenBank berdasarkan runutan nukleotida menggunakan program MEGA v 6.06 dengan pendekatan *maximum likelihood*. Skala di bawah gambar ialah nilai koefisien jarak genetik yang menggambarkan jumlah rata-rata perubahan nukleotida di antara isolat. *Aphelenchoides* sp. dan *Bursaphelenchus mucronatus* digunakan sebagai pembanding di luar grup.

dan daun bendera lebih pendek dibandingkan dengan tanaman normal, jumlah bulir berkurang, dan sebagian bulir mengalami perubahan bentuk. Infeksi oleh *A. besseyi* juga dapat mengurangi produksi.

Jumlah individu nematoda pada benih padi yang diamati bervariasi dari 8–478 ekor. Salah satu faktor yang memengaruhi populasi *A. besseyi* ialah kondisi dan lama penyimpanan benih. Kondisi penyimpanan benih padi umumnya sangat sesuai untuk bertahannya *A. besseyi* pada benih. Nematoda *A. besseyi* memiliki kemampuan bertahan pada suhu rendah dan populasi nematoda dapat mengalami penurunan selama masa penyimpanan. Jumlah nematoda tertinggi ditemukan pada penyimpanan 30 bulan dan tidak berbeda secara nyata dengan penyimpanan 24 bulan (Tenente 1994). Pada penelitian ini kondisi benih yang diteliti ada yang merupakan hasil panen langsung dari petani dan ada yang telah disimpan selama 12–24 bulan sehingga *A. besseyi* yang ditemukan dalam benih tersebut masih tinggi populasinya.

Padi varietas Pak Tiwi 1 merupakan jenis padi inbrida yang tahan genangan air sehingga sesuai untuk pertumbuhan dan perkembangan *A. besseyi*. Varietas SL 8 SHS merupakan varietas padi hibrida yang diintroduksi dari Filipina dan dilepas tahun 2006. Varietas ini juga merupakan keturunan

pertama (F1) (Deptan 2006). Varietas IR64 dapat tumbuh baik di lahan irigasi dan tadah hujan dataran rendah (Khush dan Virk 2005). Namun, ketahanan varietas ini terhadap infeksi nematoda *A. besseyi* masih belum dilaporkan. Varietas Ciherang merupakan hasil persilangan antara IR64 dengan varietas atau galur lain. Varietas ini memiliki banyak kesamaan sifat dengan IR64, salah satunya sifat ketahanan terhadap OPT. Menurut Luc (1995) serangan dan kerusakan oleh *A. besseyi* pada pertanaman padi di dataran rendah yang berpengairan dan lahan air dalam lebih tinggi dari pada lahan dataran tinggi. Tamura dan Kegasawa (1958) juga menyatakan bahwa *A. besseyi* dapat ditularkan melalui air sawah pada padi yang ditanam di dataran rendah.

Identifikasi nematoda *A. besseyi* berdasarkan morfologi dapat didukung dengan hasil identifikasi dengan PCR. Bagian yang berhasil diidentifikasi pada amplifikasi DNA ialah ITS 1 dan 2. Hasil sikuensing menunjukkan bahwa isolat *A. besseyi* Pak Tiwi 1 Indonesia berkerabat dekat dan berada dalam kelompok yang sama dengan isolat *A. besseyi* asal India, Cina, dan Taiwan. Tingkat homologi yang tinggi menjadi indikasi bahwa nematoda tersebut adalah spesies yang sama. Masuknya *A. besseyi* ke wilayah Indonesia diduga berkaitan dengan impor benih padi dari negara-negara tersebut ke Indonesia.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amin AW. 2002. *Aphelenchoides besseyi* (Christie, 1942) on rice: a new record in Egypt. *J Biol Sci.* 5(3):297–298. DOI: <https://doi.org/10.3923/pjbs.2002.297.298>.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus.* 12:13–15. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18).
- [EPPO] European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2004. Diagnostic protocols for regulated pests. *EPPO Bulletin.* 34:155–157. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2004.00713.x>.
- [EPPO] European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2005. Pest risk analysis *Aphelenchoides besseyi* Christie on rice (*Oryza sativa* L.). Italia: Rice Research Centre.
- [EPPO] European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2013. *Aphelenchoides besseyi* [Internet]. [diunduh 2015 Mei 27]. Tersedia pada: [http://www.eppo/quarantine/nematodes/aphelenchoidesbesseyi/aplobe\\_ds.pdf](http://www.eppo/quarantine/nematodes/aphelenchoidesbesseyi/aplobe_ds.pdf).
- Fortuner. 1970. On the Morphology of *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 and *A. siddiqii* n.sp. (Nematoda, Aphelenchoidea). *J Helminthol.* 44(2):141–152. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022149X00021702>.
- Goodey T. 1973. Two methods for staining nematodes in plant tissue. *J Helminthol.* 15:137–144. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022149X00030790>.
- Jamali S, Mousanejad S. 2011. Resistance of rice cultivars to white tip disease caused by *Aphelenchoides besseyi* Christie. (*IJAT*) 7(2):441–447.
- Joyce SA, Reid A, Driver F, Curran J. 1994. Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to the identification of entomopathogenic nematodes. *Di dalam:*. Burnell M A, Ehlers UR, Masson PJ, editor. *Cost 812 Biotechnology: Genetics Of Entomopathogenic Nematodes Bacterium Complexes*. Proceedings of symposium and workshops DGXII; 1994; Luxembourg. Luxembourg (IE). Hlm. 178–187.
- [Kementan] Kementerian Pertanian Republik Indonesia. 2015. Peraturan Menteri Pertanian Nomor 51/Permentan / KR.010/9/2015. Jakarta (ID): Kementan.
- Khan MR, Handoo ZA, Rao U, Rao SB, Prasad JS. 2012. Observations on the foliar nematode, *Aphelenchoides besseyi*, infecting tuberoses and rice in India. *J Nematol.* 44(4):391–398.
- Kurniawati F, Supramana. 2016. Tingkat infestasi *Aphelenchoides besseyi* pada benih padi di Bogor. *J Fitopatol Indones.* 12 (1): 34–37. DOI: <https://doi.org/10.14692/jfi.12.1.34>.
- Khush GS, Virk PS. 2005. IR Varieties and their impact. Los Banos (PH): IRRI.
- Luc M, Sikora RA, Bridge J. 1995. *Nematoda Parasit Tumbuhan*. Supratoyo, penerjemah. Yogyakarta (ID): Gadjah Mada University Press. Terjemahan dari: *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. DOI: <https://doi.org/10.1079/9780851997278.0000>.
- Mao-song L, Xiao-fan D, Zi-ming W, Feng-ming Z, Na L. 2004. Description of *Aphelenchoides besseyi* from abnormal rice with ‘small grains and erect panicles’ symptom in China. *Rice Sci.* 12(4):289–294.
- Mirsam H, Supramana, Suastika G. 2015. Identifikasi nematoda parasit pada tanaman wortel di dataran tinggi malino, sulawesi selatan berdasarkan pada ciri morfologi dan morfometrik. *J Fitopatol Indones.* 11(3):85–90. DOI: <https://doi.org/10.14692/jfi.11.3.85>.
- Nicol JM, Turner SJ, Coyne DL, Nijs LD, Hockland S, Maafi ZT. 2011. Current nematode threats to world agriculture. *Genom Mol Genet Plant Nematode Interac.* 24:24–43. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0434-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0434-3_2).
- Powers TO, Todd TC, Burnell AM, Murray PCB, Fleming CC, Szalanski AL, Adams

- BA, Harris TS. 1997. The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *J Nematol.* 29(4):441–450.
- Remeus PM1, Pelazza N. 2014. Detection of *Aphelenchoides besseyi* on *Oryza sativa*. Di dalam: Kaufman B, El-Khadem R, Muschick P, Taylor, J, editor. International Rules of Seed Testing. Bassersdorf (CH): ISTA.
- Tamura I. Kegasawa K. 1958. Studies on the ecology of the rice nematode, *Aphelenchoides besseyi* Christie II on the parasitic ability of rice nematodes and their movement into hills. *Japan J Ecol.* 8:37-42.
- Tenente RCV, Wetzel MMVS, Manso ESBGC, Marques ASA. 1994. Survival of *Aphelenchoides besseyi* in infested rice seed stored under controlled conditions. *Nematol Bras.* 18(1994):85–92.
- Togashi K, Hoshino S. 2001. Distribution pattern and mortality of the white tip nematode *Aphelenchoides besseyi* (Nematoda: Aphelenchoididae), among rice seeds. *Nematology.* 3(1):17–24. DOI: <https://doi.org/10.1163/156854101300106847>.