

KERAGAMAN INTRASPEKIFIK AKSESI EKINASE (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) HASIL SELEKSI MASSA TAHAP I BERDASARKAN ANALISIS ISSR

Intraspecific Diversity of Ekinase Accessions (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) From Mass Selection Year I Based on ISSR Analysis

Dyah Subositi dan Fauzi

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional
Jl. Raya Lawu No. 11 Tawangmangu Karanganyar Jawa Tengah

*e-mail: dyah.subositi@gmail.com

ABSTRAK

Ekinase (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) merupakan salah satu tumbuhan obat yang mempunyai aktivitas sebagai imunostimulan. Tanaman ini telah ditanam dan dibudidayakan di Tawangmangu oleh Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional sejak tahun 2002. Sebanyak sepuluh aksesori ekinase telah dikarakterisasi berdasarkan keragaman morfologisnya, tiga aksesori diantaranya terpilih sebagai aksesori untuk pengembangan lebih lanjut yaitu BH2, BHU3 dan BHU5. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui keragaman intraspesifik 3 aksesori terpilih ekinase dan variannya hasil seleksi massa tahap I berdasarkan ISSR. Amplifikasi aksesori ekinase menggunakan 10 primer ISSR. Total 108 fragmen dihasilkan dari amplifikasi menggunakan 10 primer, 88 fragmen (81,5%) diantaranya merupakan fragmen polimorfik. Perhitungan indeks similaritas menggunakan koefisien Dice dan konstruksi dendrogram berdasarkan UPGMA. Keragaman intraspesifik antar aksesori ekinase sebesar 68,96-81,25%, nilai tersebut mengindikasikan keragaman yang rendah. Analisis ISSR dapat digunakan sebagai penanda untuk mengetahui keragaman intraspesifik aksesori ekinase hasil seleksi massa tahap I.

Kata kunci : Ekinase (*Echinacea purpurea* (L.) Moench), keragaman intraspesifik, seleksi massa tahap I

ABSTRACT

*Ekinase (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) is one of a medicinal plant that has immunostimulatory activity. This plant has been cultivating in Tawangmangu region by Medicinal Plant and Traditional Medicine Research and Development Office since 2002. Ten accessions of *E. purpurea* were found based on their morphological variation, three were selected as promising accessions namely BH2, BHU3 dan BHU5. The objective of this research was to observe the intraspecific variation of those accessions and 8 variants accession from mass selection year I using ISSR analysis. Those accessions were amplified using 10 ISSR primers. A total of 108 scorable fragments were generated from 10 ISSR primers, among which 88 fragments (81,5 %) were polymorphic. The Dice coefficient was used to calculated the genetic similarity and UPGMA was used to generate the dendrogram. The genetic similarity index among accessions ranged from 68,96-81,25% thus indicating that low level of genetic diversity. ISSR analysis proved to be efficient for intraspecific diversity of ekinase accessions from mass selection year I.*

Keywords: Ekinase (*Echinacea purpurea* (L.) Moench), intraspecific diversity, mass selection year I

PENDAHULUAN

Ekinase (*Echinacea purpurea* (L.) Moench; famili Asteraceae) merupakan tumbuhan obat berperawakan terna, tegak, tinggi mencapai 1,5 m. Batang beralur, daun tunggal, helaian berbentuk bulat telur sampai bulat memanjang, panjang helaian daun 6–26 cm, lebar 2-8 cm, Bunga tersusun dalam bunga majemuk bentuk cawan, bunga tepi satu seri, mahkota bunga tepi berwarna ungu, 12–20 bunga, panjang 3,5–7,5 cm, melengkung keluar. Diameter kumpulan bunga tengah 7–17 cm, daun-daun pembalut terdiri atas 6 seri, bentuk bulat memanjang, meruncing, panjang 12–17 mm. Buah kurung, biji kecil, keras, hitam (Backer and van den Brink, 1965).

Echinacea purpurea merupakan jenis ekinase yang paling banyak dibudidayakan dan dimanfaatkan sebagai tanaman obat serta paling banyak diproduksi secara komersial sebesar 80% dibandingkan *Echinacea angustifolia* dan *E. pallida* (Li, 1998). Kandungan kimia dalam ekinase antara lain yaitu derivat asam kafeat, alkamida, flavonoid, minyak esensial dan poliasetilen. Derivat asam kafeat diyakini dan terbukti secara ilmiah merupakan senyawa yang mempunyai efek imunoregulator (Thygesen *et al.*, 2007; Matthias *et al.*, 2008).

Ekinase ditanam dan dibudidayakan pertama kali di Tawangmangu oleh Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT) pada tahun 2002. Sebanyak 10 aksesori ekinase telah dikarakterisasi berdasarkan karakter morfologi terutama pada perbungaan, kandungan fenol total, dan genetik yang menunjukkan adanya keragaman (Subositi dan Fauzi, 2011). Tiga aksesori diantaranya yaitu BH2, BHU3 dan BHU5 merupakan aksesori unggulan untuk seleksi massa/pemurnian aksesori tahap pertama. Pada tahap tersebut ditemukan sebanyak 8 varian yang terdiri dari 6 varian aksesori dari aksesori BH2 dan 2 varian aksesori

dari aksesori BHU3 yang berbeda secara morfologi dengan induknya terutama pada karakter perbungaan (Subositi dan Fauzi, 2012).

Pengelompokkan berdasarkan karakter morfologis memiliki kelemahan yaitu dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan umur fisiologis tanaman sehingga dibutuhkan karakter lainnya untuk menentukan dan mengidentifikasi keragaman baik interspesifik maupun intraspesifik tumbuhan. Karakterisasi menggunakan karakter morfologi sangat disarankan untuk analisis keragaman sebelum menggunakan karakter lainnya (Caliskan and Polat, 2012). Penelitian keragaman genetik dapat dilakukan dengan menggunakan penanda molekuler ISSR (*inter simple sequence repeats*) yang mempunyai kelebihan dibandingkan dengan penanda molekuler lainnya karena memiliki reproduktibilitas dan polimorfisme tinggi, tidak memerlukan informasi awal mengenai sekuens DNA untuk desain primer (Ziekiewicz *et al.*, 1994).

Penelitian ini bertujuan untuk melihat keragaman intraspesifik aksesori ekinase hasil seleksi massa tahap I dari 3 aksesori unggulan (BH2, BHU3 dan BHU5) dan 8 varian aksesori berdasarkan analisis ISSR untuk mendukung standarisasi tumbuhan obat.

METODE PENELITIAN

Koleksi sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah daun muda dari 3 aksesori ekinase unggulan (BH2, BHU3 dan BHU5) dan 8 variannya yang berbeda karakter morfologisnya.

Isolasi dan kuantifikasi DNA

Isolasi DNA sampel daun muda ekinase 0,1 gr menggunakan kit isolasi DNA (*Sigma Gen Elute Plant Genomic DNA Miniprep Kit*). Penentuan kemurnian dan konsentrasi DNA hasil isolasi menggunakan metode spektrofotometri pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (λ 260/280).

Amplifikasi (PCR/ Polymerase Chain Reaction)

Amplifikasi DNA masing-masing aksesi ekinase menggunakan 10 primer ISSR (Tabel 1). Protokol amplifikasi menggunakan metode Heikal *et al.* (2008) dengan modifikasi waktu dan temperatur. Campuran reaksi untuk amplifikasi terdiri atas 2 µl *template* (30 ng DNA genom), 1 µl primer, 12,6 µl PCR Mix, kemudian ditambah *distillated water* sampai volume 25 µl. Campuran tersebut dimasukkan dalam *Thermalcycler* (C-1000 Bio Rad) dengan program sebagai berikut: pre-denaturasi 94°C selama 3 menit, dilanjutkan sebanyak 39x siklus yang terdiri dari tahap denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* 46-52°C (tergantung primer) selama 1 menit dan elongasi 72°C selama 2 menit, kemudian dilanjutkan *extention* 72°C selama 8 menit dan pada 4°C sebagai *holding temperature*.

Elektroforesis

Elektroforesis produk amplifikasi menggunakan gel agarosa 1,8% yang telah diberi *SYBR safe green* pada 60-70 volt selama 80-90 menit. Visualisasi hasil elektroforesis berupa fragmen DNA menggunakan sinar UV pada alat *Gel Documentation System* (Imaging System XR+ Bio Rad).

Analisis Data

Skoring fragmen DNA hasil amplifikasi dilakukan pada masing-masing aksesi yang diamplifikasi dengan primer yang berbeda, skor 1 apabila terdapat fragmen DNA dan skor 0 apabila tidak terdapat fragmen DNA. Indeks similaritas dihitung berdasarkan indeks similaritas Dice (Nei dan Li, 1979) selanjutnya disusun analisis kelompok (*cluster analysis*) untuk kemudian konstruksi dendogram menggunakan metode *Unweighted Pair Grup Method Using Arithmetic Method* (UPGMA). Data diolah menggunakan program komputer (*software*) NTSYS ver 2.02 (Rohlf, 1997).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penanaman aksesi unggulan ekinase BH2, BHU3 dan BHU 5 menghasilkan sebanyak 8 varian yang terdiri dari 6 varian aksesi dari aksesi BH2 dan 2 varian aksesi dari aksesi BHU3 yang mempunyai perbedaan morfologi yang dengan indukannya terutama pada karakter perbungaan (Gambar 1). Karakter perbungaan tersebut meliputi karakter filaris, reseptakel, bunga tepi, posisi bunga tepi terhadap ibu tangkai bunga, warna bunga saat kuncup.



Gambar 1. Keragaman morfologi perbungaan varian ekinase hasil pemurnian tahap 1 (a. bunga saat mekar; b. warna bunga tengah saat kuncup; c. irisan membujur reseptakel).

Varian aksesi tidak ditemukan pada aksesi BHU5 yang ditanam kembali, hal tersebut kemungkinan disebabkan anakan yang dihasilkan hampir seragam atau sedikit mempunyai perbedaan karakter morfologi terutama yang bersifat kuantitatif. Varian-varian baru tersebut ditemukan pada populasi aksesi unggulan yang kemungkinan disebabkan seleksi massa menggunakan biji/benih sehingga menghasilkan sebagian keturunan mempunyai sifat yang berbeda dengan induknya. Variabilitas genetik ekinase cenderung tinggi dikarenakan adanya perbanyakan secara generatif (Baum *et al.*, 1999). Karakter morfologis merupakan karakter yang paling mudah diamati dan

merupakan karakter yang dapat membedakan aksesi ekinase. Empat belas aksesi *E. purpurea* dapat dibedakan menggunakan karakter morfologi, akan tetapi karakter ini mudah dipengaruhi oleh lingkungan (Lin-na, 2013). Untuk memperkuat keragaman berdasarkan karakter morfologis maka diperlukan penanda molekuler untuk melihat keragaman genetik.

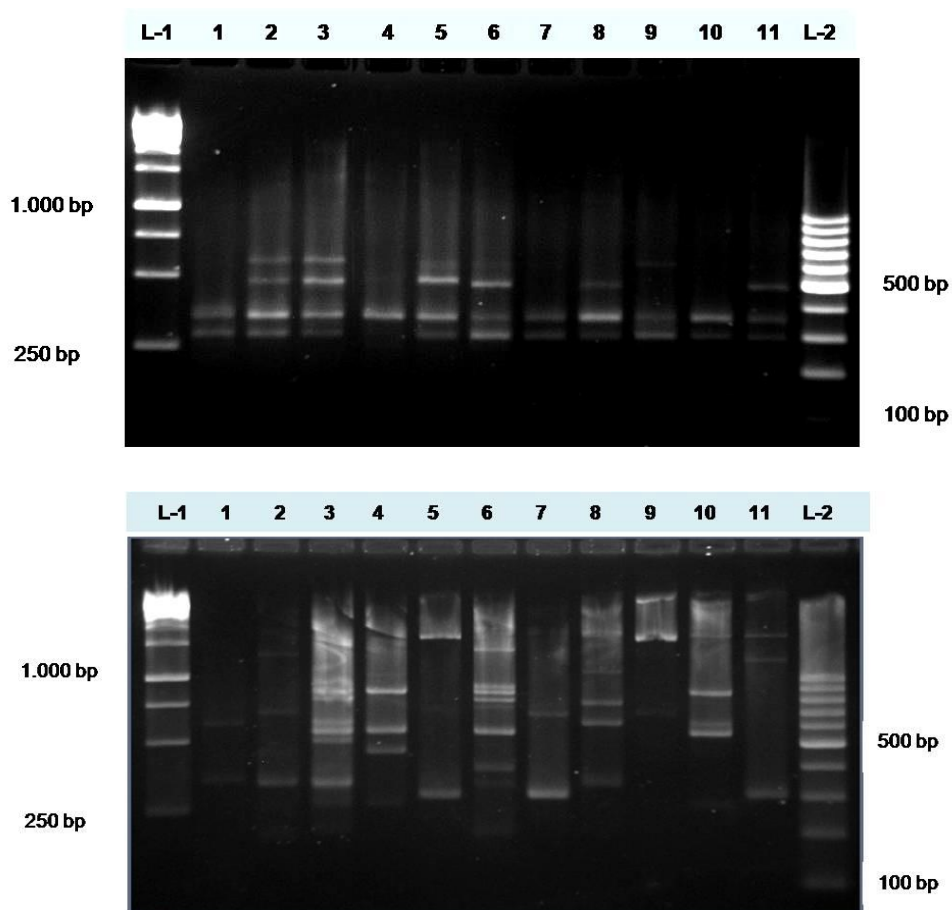
Isolasi DNA merupakan tahap pertama dalam analisis keragaman genetik suatu jenis. DNA aksesi ekinase dan variannya diamplifikasi menggunakan 10 primer ISSR dan menghasilkan 108 fragmen DNA (Tabel 1).

Tabel 1. Total fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan 10 primer RAPD dan prosentase fragmen polimorfik pada 11 aksesi ekinase

No	Primer	Sekuens	Total Fragmen	Fragmen Monomorfik	Polimorfisme (%)
1	UBC-866	(CTC)5	10	1	90
2	UBC-834	(AG)8YT	11	4	63,64
3	UBC-876	(GATA)4	4	2	50
4	UBC-807	(AG)8T	13	1	92,31
5	UBC-825	(AC)8T	8	4	50
6	UBC-812	(GA)8A	11	3	72,72
7	A830241	(ACTG)5	9	2	77,78
8	UBC-872	(CAG)5	8	1	87,5
9	17898B	(CA)6GT	16	2	87,5
10	UBC-814	(CT)8TG	18	0	100
Total			108	20	
Rerata			10,8	2	81,48

Tabel 1 memperlihatkan keseluruhan primer yang digunakan untuk amplifikasi dapat menghasilkan menghasilkan fragmen polimorfik dengan prosentase 50-100% antar aksesi ekinase. Prosentase polimorfisme tertinggi 100% dihasilkan

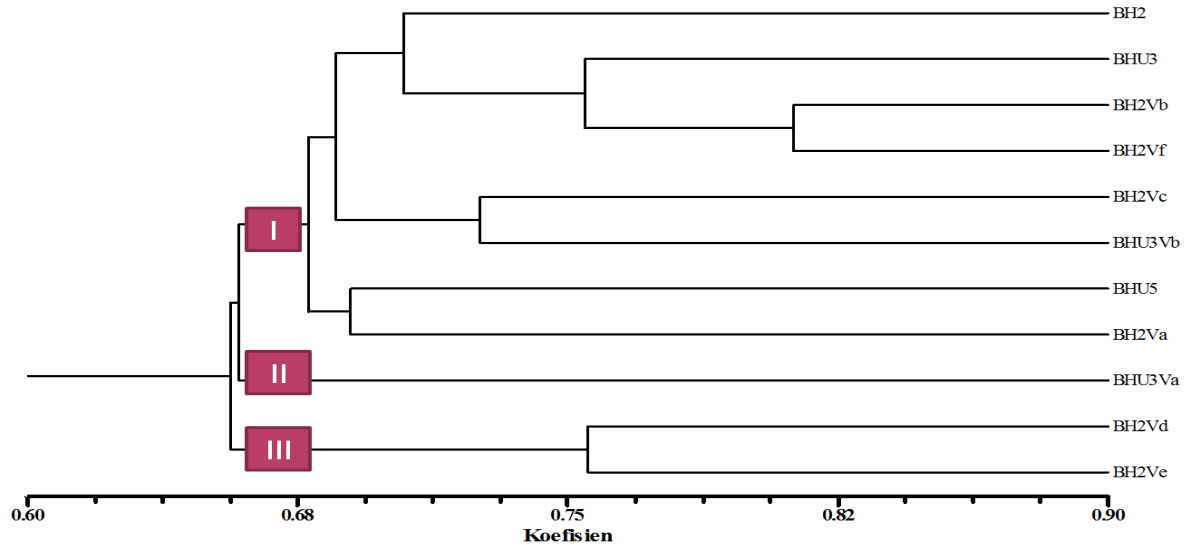
dari amplifikasi menggunakan primer (CT)8TG, polimorfisme terendah 50% apabila diamplifikasi menggunakan primer (GATA)4 dan (AC)8T, sedangkan polimorfisme rata-rata yaitu 81,48%.



Gambar 2. Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR UBC 872 dan UBC 814: **L-1:** *Ladder* 1 kb, **1:** aksesi F1-BH2, **2:** aksesi F1-BHU3, **3:** aksesi F1-BHU5, **4-9:** aksesi F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, **10-11:** aksesi F1-BHU3-Va dan Vb, **L-2:** *Ladder* 100 bp

Hasil amplifikasi menggunakan primer (CAG)5 (Gambar 2A) pada aksesi ekinase menghasilkan 8 fragmen berukuran 460-1.285 bp, sedangkan amplifikasi menggunakan primer (CT)8TG menghasilkan 18 fragmen berukuran 230-1.750 bp (Gambar 2B). Fragmen-fragmen

DNA hasil amplifikasi dengan primer ISSR digunakan untuk analisis indeks similaritas dan konstruksi dendrogram melalui analisis kluster. Keragaman intraspesifik aksesi ekinase dan variannya berdasarkan penanda molekular digambarkan dalam bentuk dendrogram (Gambar 3):



Gambar 3. Dendrogram 11 aksesi ekinase berdasarkan penanda molekuler ISSR

Dendrogram menunjukkan pembagian aksesi ekinase hasil seleksi massa tahap I menjadi 3 kluster utama pada indeks similaritas 68,96%. Pengelompokan OTU pada 85-100% similaritas menunjukkan sebagai kategori spesies, dan pengelompokan OTU pada 65% similaritas merupakan kategori genus. Akan tetapi interpretasi dari dendrogram dan persentase kemiripan tergantung pada pengetahuan taksonom dan OTU yang diteliti (Chaveerach et al., 2008).

Anggota kluster I terdiri atas aksesi utama BH2, BHU3 dan BHU5 serta variannya yaitu BH2Vb, BH2Vf, BH2Vc, BHU3Vb, BH2Va. Kluster II hanya beranggotakan BHU3Va, sedangkan kluster III terdiri atas aksesi BH2Vd dan BH2Ve. Aksesi BH2 dan BHU3 mengelompok menjadi satu kluster akan tetapi varian-varianannya sebagian terpisah dari aksesi indukannya membentuk kluster tersendiri. Asolkar *et al.* (2011) menyatakan bahwa genotip yang terpisah jauh dari kluster utama induknya dan kemudian menyusun kluster tersendiri menunjukkan adanya fenomena alami untuk menurunkan keragaman baru melalui rekombinasi genetik acak. Keragaman genetik ekinase lebih besar terjadi pada keragaman dalam

populasi dibandingkan keragaman antar populasi (Kapteyn *et al.*, 2002; Baum *et al.*, 1999).

Varian-varian ekinase yang berbeda secara morfologi dan genetik dengan aksesi utama pada tahap I seleksi massa kemungkinan disebabkan sifat *self-incompatibility* pada spesies ekinase. Biji ekinase dihasilkan dari penyerbukan silang sehingga individu yang dihasilkan menunjukkan keragaman morfologi berbeda dengan induknya. Chen *et al.* (2008) melaporkan bahwa ekinase merupakan tumbuhan dengan penyerbukan silang dan cenderung bersifat *self-incompatibility* hal tersebut menyebabkan adanya keragaman morfologis dan agronomis sangat yang tinggi pada ekinase. Adanya keragaman tersebut menjadi suatu hal yang tidak diharapkan dalam proses pemurnian.

Proses seleksi massa berkelanjutan dan program pemurnian sangat diperlukan untuk mengurangi heterogenitas pada karakter morfologis dan agronomis pada populasi ekinase yang dibudidayakan untuk menghasilkan aksesi unggulan yang seragam. Disisi lain keragaman genetik dan morfologis ekinase juga dapat digunakan untuk pengembangan aksesi unggulan

lainnya. Menurut (Partovi *et al.*, 2016), keragaman genetik yang berbeda antar aksesori maupun dari indukannya memegang peranan penting dalam program pemuliaan tanaman sebagai sumber plasma nutfah dibandingkan dengan aksesori yang mempunyai kemiripan tinggi.

Penanda molekuler ISSR mampu menunjukkan adanya keragaman genetik pada aksesori ekinase terpilih hasil seleksi massa tahun I yaitu aksesori BH2, BHU3 dan BHU5 yang telah menghasilkan 8 varian yang berbeda pada karakter morfologis. Proses seleksi massa dan pemurnian aksesori masih perlu dilanjutkan hingga diperoleh aksesori unggulan dalam rangka standarisasi tanaman obat.

KESIMPULAN

Penanda molekuler ISSR dapat digunakan untuk mengetahui keragaman intraspekif pada aksesori ekinase terpilih hasil seleksi massa tahun I yaitu aksesori BH2, BHU3 dan BHU5 yang telah menghasilkan 8 varian yang berbeda berdasarkan karakter morfologis. Keragaman intraspekif antar aksesori ekinase sebesar 68,96-81,25%, nilai tersebut mengindikasikan keragaman intraspekif yang rendah.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian merupakan bagian penelitian yang dibiayai dari DIPA Tahun 2011 Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT), Badan Litbang Kesehatan.

DAFTAR PUSTAKA

Asolkar T., Desai AR. and Singh NP. 2011. Molecular analysis of cashew genotypes and their half-sib progeny using RAPD

marker. *Journal of Agricultural Technology*, 7(4):1097-1106.

Backer CA. and van Den Brink RCB. 1965. *Flora of Java (Spermatophytes Only)*. Volume II. NVP Noordhoff. Groningen Netherlands.

Baum BR., Binns SE., Mechanda S., Arnason JT. 1999. The *Echinacea* germplasm enhancement project. in: *Proceedings of the 1999 International Echinacea Symposium*, Jun 3-5, Kansas City, MO.

Caliskan O. and Polat AA. 2012. Morphological diversity among fig (*Ficus carica* L.) accession sampled from the Eastern Mediterranean Region of Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 36: 179-193

Chaveerach A, Sudmoon R., Tanee T., Mookamul P., Sattayasai N. and Sattayasai J. 2008. Two new species of *Curcuma* (*Zingiberaceae*) used as cobra-bite antidotes. *Journal of Systematics and Evolution*, 46 (1): 80-88

Chen, CL., Zhang SC. and Sung JM. 2008. Biomass and caffeoyl phenols production of *Echinacea purpurea* grown in Taiwan. *Experimental Agriculture*, 44(4): 497-507. doi:10.1017/S0014479708006753

Heikal AH., Badawy OM. and Hafez AM. 2008. Genetic Relationships among Some *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Accessions Based on ISSR Analysis. *Research Journal of Cell and Molecular Biology*, 2(1): 1-5

Kapteyn J., Goldsbrough PB., Simon JE. 2002. Genetic relationships and diversity of commercially relevant *Echinacea* species. *Theor Appl Genet*, 105:369-376.

Li TSC. 1998. *Echinacea*: Cultivation and medicinal value. *Hort Technology*, 8:122-129.

Lin-na H. 2013. The morphological markers of Different phenotypes *Echinacea purpurea*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3 (09): 078-080

Matthias A., Banbury L., Bone KM., Leach DN. and Lehmann RP. 2008. *Echinacea* alkylamides modulate induced immune

- responses in T-cells. *Fitoterapia*, 79: 53-58.
- Nei M. and Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 76: 5269.
- Partovi N., Ebrahimi M., Alemi Z. 2016. Evaluation of Genetic Variation in Rye Germplasm using ISSR Markers. *Electronic Journal of Biology*, 12(1): 77-82
- Rohlf FJ. 1997. NTSYS-Pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.02. Exeter Software. New York.
- Subositi D. and Fauzi. 2011. Morphological variation of *Echinacea purpurea* (L.) Moench accessions in Medicinal Plant and Traditional Medicine Research and Development Office. *Proceedings of The 2nd International Symposium on Temulawak*. The 40th meeting National Working Group on Indonesian Medicinal Plants. Biopharmaca Research Center.
- Subositi D dan Fauzi. 2012. Variasi Morfologi Aksesori Ekinase (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) Hasil Pemurnian Tahap I di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT). *Prosiding Seminar Nasional POKJANAS TOI XLII: Pengendalian, Pelestarian, Pemanfaatan, dan Pengembangan Tumbuhan Obat Indonesia untuk Peningkatan Kesehatan Masyarakat*, Jurusan Farmasi FMIPA Universitas Jenderal Ahmad Yani Cimahi, 15-16 Mei 2012.
- Thygesen L., Thulin J., Mortensen A., Skibsted LH. and Molgaard P. 2007. Antioxidant activity of cichoric acid and alkamides from *Echinacea purpurea*, alone and in combination. *Food Chemistry*, 101: 74-81.
- Ziekiewicz E., Rafalski A., Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genome*, 20: 176-183