

---

# KERAGAMAN GENETIK DRINGO (*Acorus calamus* L.) BERDASARKAN INTER–SIMPLE SEQUENCE REPEATS (ISSR)

## Genetic Diversity of Dringo (*Acorus calamus* L.) Based on Inter–Simple Sequence Repeats (ISSR)

Dyah Subositi<sup>\*</sup>, Rohmat Mujahid dan Yuli Widiyastuti

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional  
Badan Litbangkes, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia

Jl. Raya Lawu, Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah, Tel.: (0271) 697010,  
Fax.: (0271) 697451

\* Email: dyah.subositi@gmail.com

---

### Abstract

Dringo (*Acorus calamus* L.) used as medicinal plant in Indonesian ethnic groups. Those information based on Ristoja (Research Programme on Medicinal Plants) in year 2012. The objective of Ristoja was to provide a database of local ethnomedicine knowledge, herbal formula and medicinal plant in Indonesia. The aim of this study was to assess the genetic diversity of Dringo from 20 selected ethnic groups in Indonesia based on Inter Simple Sequence Repeats (ISSR). Ten selected ISSR primers generated 82 amplified fragments with 51,2% were polymorphic. Dice coefficient was used to calculate similarity index and UPGMA was used to construct a dendrogram. The genetic similarity index among accessions ranged from 76,7–100% thus indicating that low level of genetic diversity in Dringo. Genetic diversity database can be useful for medicinal plant mapping and conservation especially for in situ conservation.

**Keywords:** database, Dringo (*Acorus calamus* L.), genetic diversity, Inter Simple Sequence Repeats (ISSR)

### Abstrak

Dringo (*Acorus calamus* L.) merupakan salah satu tumbuhan obat yang digunakan sebagai obat tradisional oleh berbagai etnis di Indonesia berdasarkan hasil Riset Tumbuhan Obat dan Jamu (Ristoja) tahun 2012. Tujuan umum Ristoja adalah tersedianya *database* pengetahuan etnomedisin, ramuan obat tradisional (OT) dan tumbuhan obat (TO) di Indonesia, termasuk data keragaman genetik tumbuhan obat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik Dringo yang digunakan di 20 etnis terpilih di Indonesia berdasarkan penanda molekular *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) untuk mendukung tersedianya *database* tumbuhan obat di Indonesia. Sebanyak 10 primer ISSR terpilih menghasilkan 82 fragmen DNA dengan polimorfisme 51,2 %. Koefisien Dice digunakan untuk menghitung indeks similaritas antar aksesi Dringo dan konstruksi dendrogram menggunakan UPGMA. Indeks similaritas aksesi Dringo sebesar 76,7–100%, hal tersebut menunjukkan bahwa keragaman genetik Dringo rendah. Adanya *database* keragaman genetik Dringo akan membantu dalam pemetaan dan upaya konservasi tumbuhan obat terutama secara *in situ*.

**Kata kunci:** database, Dringo (*Acorus calamus* L.), keragaman genetik, *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR)

## PENDAHULUAN

Penelitian Eksplorasi Pengetahuan Lokal Etnomedisin dan Tumbuhan Obat di Indonesia Berbasis Komunitas selanjutnya disebut Riset Tumbuhan Obat dan Jamu (Ristoja) telah dilakukan di 26 provinsi mencakup 209 etnis di 254 titik pengamatan pada tahun 2012. Tujuan umum Ristoja adalah tersedianya *database* pengetahuan etnomedisin, ramuan obat tradisional (OT) dan tumbuhan obat (TO) di Indonesia. Salah satu hasil Ristoja yaitu informasi jumlah ramuan yang digunakan sebanyak 15.733 ramuan dengan tumbuhan yang digunakan dalam ramuan sebanyak 19.738 data tumbuhan (1.740 spesies). Dari data ramuan tersebut terdapat beberapa ramuan untuk pengobatan penyakit yang menjadi program Kemenkes RI antara lain yaitu HIV-AIDS, TBC, Malaria serta kesehatan ibu dan anak. Selain itu, terdapat juga ramuan yang digunakan untuk menangani kanker.

*Acorus calamus* L. (Dringo) merupakan salah satu tumbuhan penyusun ramuan anti malaria dan kanker serta termasuk peringkat ke-17 sebagai tumbuhan yang paling banyak digunakan pada semua ramuan di seluruh etnis yang diteliti. Hasil Ristoja 2012 menunjukkan Dringo digunakan oleh 104 etnis di Indonesia untuk mengobati berbagai penyakit selain malaria dan kanker, antara lain demam, sakit perut, kecacingan, perawatan bayi dan pasca melahirkan, serta masuk angin (Wahyono dkk., 2012). Informasi keragaman genetik Dringo di Indonesia terutama yang digunakan sebagai penyusun ramuan obat tradisional oleh pengobat tradisional belum tersedia. Informasi tersebut diperlukan untuk mendukung tujuan Ristoja yaitu menyediakan *database* tumbuhan obat dan pemanfaatannya.

Dringo (*A. calamus* L.) merupakan salah satu tumbuhan yang dimanfaatkan sebagai tanaman obat anggota famili *Acoraceae*. Genus *Acorus* hanya beranggotakan 2 spesies yaitu *A. calamus* and *A. gramineus* (Liao and Hsiao, 1998). Berdasarkan perbedaan kariotipe terdapat empat keragaman Dringo berdasarkan perbedaan kariotipe yaitu: *A.*

*calamus* var. *americanus* (Raf.) Wulff: diploid, fertil, dijumpai di Amerika utara hingga Siberia; *A. calamus* var. *calamus*: triploid, steril, dijumpai di Eropa, Himalaya, India dan sebagian Amerika Serikat; *A. calamus* var. *angustatus* Bess: tetraploid, sebagian fertil, dijumpai di bagian timur dan selatan Asia dari Jepang dan China hingga wilayah Malesiana; *A. calamus* var. *verus* L. : tetraploid, ekotipe tropis (Nguyen, 1999; Khare, 2007).

Dringo mengandung senyawa kimia monoterpen, seskuiterpen, fenilpropanoid, flavonoid, kuinin dan senyawa  $\alpha$  dan  $\beta$ -asaron (Raja et al., 2009; Yende et al., 2008). Kandungan kimia tersebut bervariasi tergantung genotipe dan level ploidi tanamannya. Dringo diploid dilaporkan tidak mengandung  $\beta$ -asaron, sedangkan pada triploid kadar  $\beta$ -asaron sebesar 3–19%. Dringo tetraploid yang berasal dari India, Taiwan dan Indonesia mengandung  $\beta$ -asaron mencapai 96% (McGaw et al., 2002; Berteau et al., 2005).

*DNA fingerprinting* sangat penting dalam upaya konservasi dan pemanfaatan sumber daya genetik tumbuhan obat berkaitan dengan adanya pola distribusi, ekologi, budidaya dan nilai komersial. Teknik molekular membantu peneliti bukan hanya dalam hal autentifikasi genetik tetapi juga memperkirakan dan mengeksplorasi variabilitas genetik spesies tumbuhan (Rout, 2006). *Inter simple sequence repeats* (ISSR) merupakan salah satu penanda molekular yang telah banyak digunakan dalam penelitian karena memiliki kelebihan dibandingkan penanda molekular lainnya terutama untuk studi keragaman genetik. ISSR menghasilkan polimorfisme fragmen DNA lebih tinggi, terpercaya dan reproduksibel bila dibandingkan dengan RAPD (Li and Ge, 2001).

Keragaman genetik Dringo dari berbagai etnis di Indonesia diperlukan untuk penyusunan *database* tumbuhan obat yang merupakan salah satu tujuan Ristoja. Keragaman genetik dapat diketahui dengan menggunakan penanda molekular sebagai *tools* karena tidak terpengaruh oleh kondisi lingkungan dan fase tumbuh. ISSR merupakan penanda molekular dengan teknik yang cukup mudah dan

sederhana, dapat mendeteksi polimorfisme pada lokus inter-mikrosatelit menggunakan primer yang didesain dari motif SSR dinukleotida maupun trinukleotida sehingga lebih stabil, polimorfisme dan reproduibilitas tinggi (Ziekiewicz *et al.*, 1994). Penelitian keragaman genetik Dringo lebih banyak dilakukan di India menggunakan penanda molekular RAPD (Giri *et al.*, 2012), ISSR (Kareem *et al.*, 2011), DAMD dan ISSR (Rana *et al.*, 2013)

Perbedaan habitat atau lokasi tempat tumbuh mempengaruhi keanekaragaman spesies tumbuhan baik secara morfologi, kandungan senyawa aktif dan genetik (Wu *et al.*, 2013). Diperlukan adanya suatu teknik atau metode untuk memberikan informasi variasi genetik tumbuhan yang mendukung justifikasi penggunaan tumbuhan obat (TO) dalam ramuan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik Dringo yang dimanfaatkan sebagai tumbuhan obat pada beberapa etnis di Indonesia berdasarkan penanda molekular ISSR.

## BAHAN DAN METODE

### Koleksi sampel

Koleksi sampel Dringo (*Acorus calamus*) dilakukan pada bulan September – Oktober 2014. Pengambilan sampel dilaksanakan pada 20 etnis/titik pengamatan Ristoja (Riset Tumbuhan Obat dan Jamu) tahun 2012 di Indonesia berdasarkan perbedaan wilayah geografis yang mewakili pulau Sumatera, Kalimantan, Sulawesi, Maluku dan kepulauan Maluku, Nusa Tenggara, dan Papua (Gambar 1).

Pemilihan sampel Dringo didasarkan pada semua Dringo yang digunakan oleh pengobat tradisional (battra) sebagai penyusun ramuan obat tradisional (perbedaan karakter morfologi dan kariotipe diabaikan). Material yang diambil adalah daun Dringo segar dari minimal tiga individu per sampel Dringo yang umumnya diperoleh dari sekitar tempat tinggal battra.

### Isolasi dan kuantifikasi DNA

Sebanyak 0,1 gram daun muda Dringo disimpan pada freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  kemudian diisolasi menggunakan protokol dan kit isolasi DNA (*Sigma Gen Elute Plant Genomic DNA Miniprep Kit*). Genom Dringo yang berhasil diisolasi diencerkan 1.000X kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm ( $\lambda$  260/280) menggunakan spektrofotometer untuk menentukan kemurnian dan konsentrasi DNA.

### Amplifikasi (PCR/ Polymerase Chain Reaction)

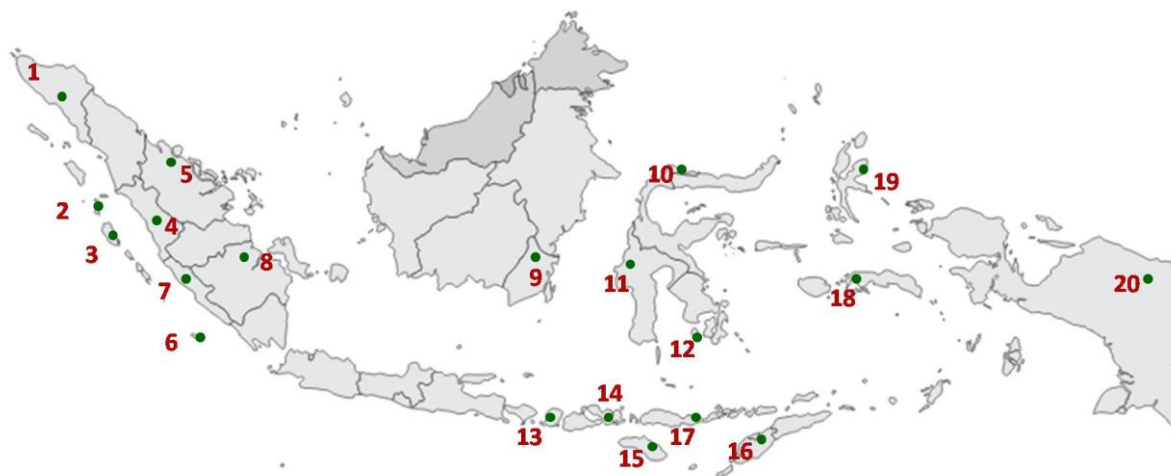
DNA masing-masing aksesori Dringo kemudian diamplifikasi menggunakan 10 primer ISSR terpilih dari total 28 primer yang diujikan (Tabel 1). Pemilihan primer berdasarkan kemampuan primer untuk mengamplifikasi dan mendeteksi polimorfisme pada semua aksesori Dringo (tidak monomorfik). Sebanyak 2  $\mu\text{l}$  *template* (25 ng DNA genom), 1  $\mu\text{l}$  primer, 12,6  $\mu\text{l}$  PCR Mix, kemudian ditambah *distillated water* sampai volume 25  $\mu\text{l}$ . Campuran tersebut dimasukkan dalam *Thermocycler* (BioRad) dengan program sebagai berikut: pre-denaturasi  $95^{\circ}\text{C}$  selama 3 menit, dilanjutkan sebanyak 39x siklus yang terdiri atas tahap denaturasi  $95^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit, *annealing*  $46-52^{\circ}\text{C}$  (tergantung primer) selama 50 detik dan elongasi  $72^{\circ}\text{C}$  selama 2 menit, kemudian dilanjutkan *extention*  $72^{\circ}\text{C}$  selama 8 menit dan pada  $4^{\circ}\text{C}$  sebagai *holding temperature*.

### Elektroforesis

Produk amplifikasi dicek menggunakan elektroforesis 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* (BioRad).

### Analisis Data

Fragmen DNA yang jelas hasil amplifikasi dengan primer yang berbeda pada masing-masing aksesori diberi skor 1 apabila terdapat fragmen DNA



**Gambar 1.** Distribusi sampel Dringo *Acorus calamus* di Indonesia berdasarkan kegiatan Riset Tumbuhan Obat Jamu (Ristoja) tahun 2012 ; **1:** Kluet (Aceh), **2:** Nias (Sumatera Utara), **3:** Mentawai (Sumatera Barat), **4:** Minangkabau (Sumatera Barat), **5:** Sakai (Riau), **6:** Enggano (Bengkulu), **7:** Muko–Muko (Bengkulu), **8:** Musi (Sumatera Selatan), **9:** Lawangan (Kalimantan Selatan), **10:** Buol (Sulawesi Tengah), **11:** Mamuju (Sulawesi Barat), **12:** Moronene (Sulawesi Tenggara), **13:** Sasak (Nusa Tenggara Barat), **14:** Mbojo (Nusa Tenggara Barat), **15:** Kambera (Nusa Tenggara Timur), **16:** Belu Tetun (Nusa Tenggara Timur), **17:** Ngada (Nusa Tenggara Timur), **18:** Alune (Maluku), **19:** Togutil (Maluku Utara), **20:** Nimboran (Papua).

dan bila tidak terdapat fragmen diberi skor 0. Penghitungan indeks similaritas menggunakan rumus indeks similaritas Dice kemudian disusun analisis kelompok (*cluster analysis*) selanjutnya konstruksi dendrogram menggunakan metode *Unweighted Pair Grup Method Using Arithmetic Method* (UPGMA). Data diolah menggunakan program komputer (*software*) NTSYS ver 2.02.

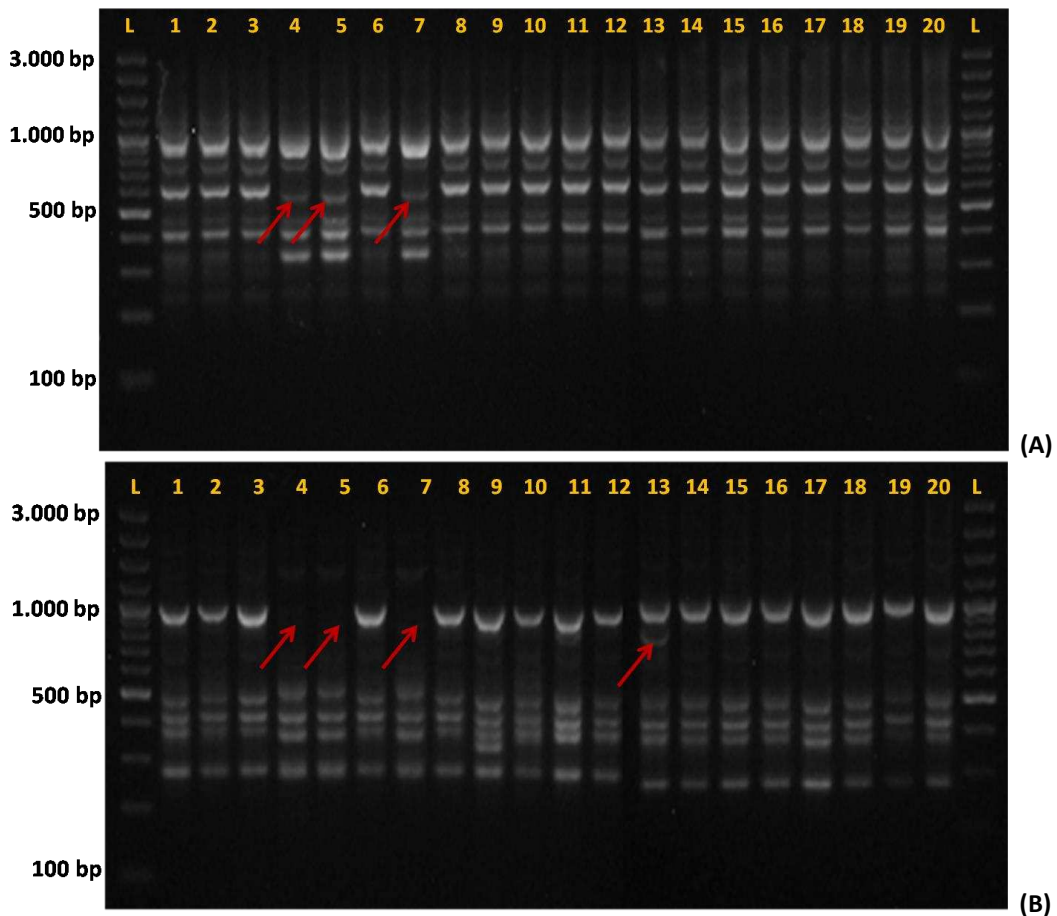
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 82 fragmen DNA Dringo yang berukuran 130–2.225 bp berhasil diamplifikasi menggunakan 10 primer terpilih. Beberapa aksesori Dringo menunjukkan fragmen spesifik berdasarkan asal wilayah, sebagai contoh Dringo yang berasal dari etnis di Sumatera diketahui mempunyai fragmen spesifik (Gambar 2).

Hasil amplifikasi menggunakan primer (TC)8C (Gambar 2A) pada 20 aksesori menghasilkan 8 fragmen berukuran 220–930 bp. Terdapat fragmen spesifik yang berukuran 570 bp dijumpai pada Dringo yang digunakan oleh etnis Minangkabau (Sumatera Barat), etnis Sakai (Riau) dan etnis Muko–muko (Bengkulu). Namun, fragmen berukuran 620 bp tidak terdapat pada Dringo yang digunakan oleh tiga etnis di tiga provinsi tersebut. Amplifikasi menggunakan primer (GT)8YA (Gambar 2B) pada 20 aksesori menghasilkan sembilan fragmen berukuran 254–1.474 bp. Dringo dari etnis Minangkabau (Sumatera Barat), Sakai (Riau) dan Muko–muko (Bengkulu) tidak mempunyai fragmen DNA yang konservatif dengan ukuran 1.000 bp. Frgamen spesifik 850 bp hanya terdapat pada Dringo dari etnis Mamuju (Sulawesi Barat) dan Sasak (NTB).

**Tabel 1.** Total fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan 10 primer ISSR dan prosentase fragmen polimorfik pada 20 aksesi Dringo (*Acorus calamus* L.) dari berbagai etnis

No	Sekuens primer (5' → 3')	Total fragmen teramplifikasi	Fragmen Monomorfik	Prosentase Polimorfik (%)
1.	(CAG)5	10	2	80
2.	(AG)9C	7	4	42,3
3.	(GT)8C	7	2	71,4
4.	(TC)8C	8	6	25
5.	(AC)8C	8	7	12,5
6.	(GA)8YT	8	3	62,5
7.	(GT)8YA	9	4	55,6
8.	(AC)8YA	10	5	50
9.	(CA)6GT	7	1	85,7
10.	(GT)6CC	8	6	25
<b>TOTAL</b>		<b>82</b>	<b>40</b>	
<b>RATA-RATA</b>				<b>51,2</b>



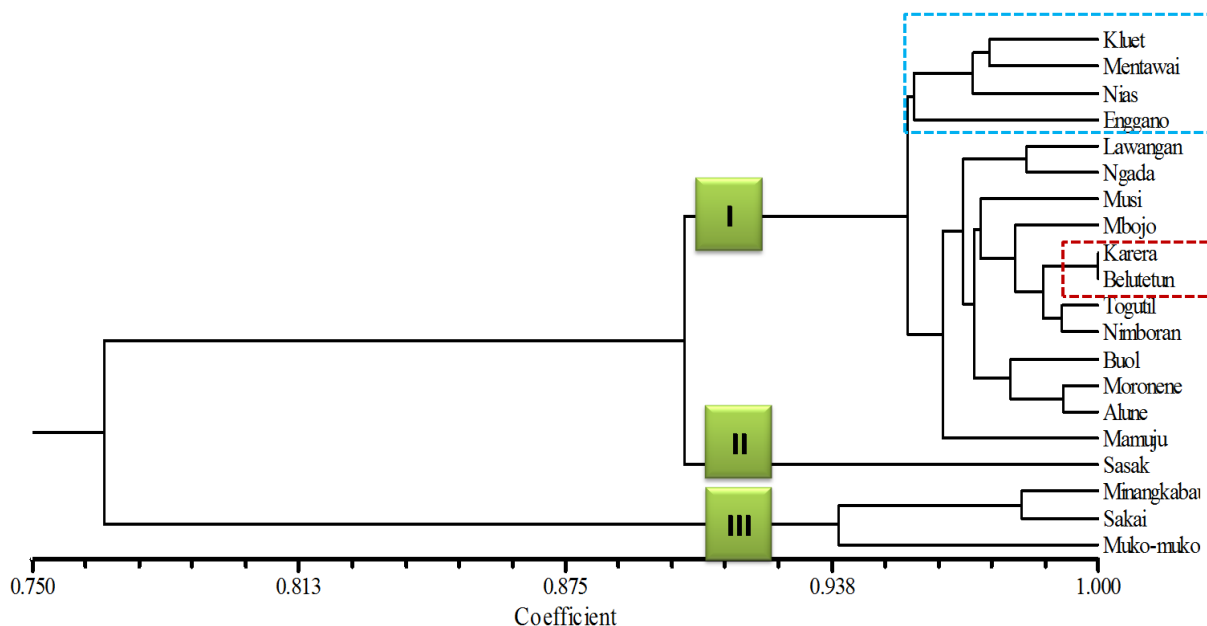
**Gambar 2.** Fragmen DNA Dringo (*Acorus calamus* L.) hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR (TC)8C dan (GT)8YA: L-1: Ladder 100 bp; 1: Kluet, 2: Nias, 3: Mentawai, 4: Minangkabau, 5: Sakai, 6: Enggano, 7: Muko–Muko, 8: Musi, 9: Lawangan, 10: Buol, 11: Mamuju, 12: Moronene, 13: Sasak, 14: Mbojo, 15: Kambera, 16: Belu Tetun, 17: Ngada, 18: Alune, 19: Togutil, 20: Nimboran.

Sepuluh primer ISSR yang digunakan dapat mengamplifikasi DNA dan menghasilkan fragmen polimorfik (Tabel 1). Fragmen DNA yang dihasilkan yaitu  $\geq 7$  fragmen tiap primer, hal tersebut menunjukkan motif SSR dalam jumlah yang melimpah dan tersebar pada genom Dringo. Polimorfisme tertinggi dihasilkan amplifikasi menggunakan primer (CA)<sub>6</sub>GT yaitu 85,7%, polimorfisme terendah 12,5% bila diamplifikasi menggunakan primer (AC)<sub>8</sub>C, sedangkan polimorfisme rata-rata yaitu 51,2%. Rerata polimorfisme hanya 51,2% tersebut kemungkinan disebabkan keragaman genetik Dringo rendah. Kareem et al. (2011) menggunakan 14 primer terseleksi dari 100 primer ISSR yang digunakan untuk analisis genetik Dringo dan polimorfisme yang dihasilkan 51,5% dengan ukuran fragmen 450–2.250 bp. Penelitian Rana et al. (2013) menggunakan sebanyak 10 primer ISSR digunakan dalam analisis keragaman genetik Dringo yang menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran 350–3.000 bp dan polimorfisme sebesar 20,19%.

Pengelompokkan Dringo dari 20 etnis pada 15 provinsi di Indonesia terbagi menjadi 3 kluster besar (Gambar 2) pada indeks similaritas 90,3% yang umumnya memisahkan aksesi Dringo wilayah barat dan timur Indonesia. Kluster I beranggotakan 16

aksesi Dringo, sedangkan kluster II hanya beranggotakan Dringo dari etnis Sasak (Nusa Tenggara Barat). Dringo yang berasal dari etnis Minangkabau (Sumatera Barat), Sakai (Riau) dan Muko–muko (Bengkulu) membentuk kluster tersendiri pada kluster III. Sedangkan sub kluster I memisahkan Dringo dari pulau Sumatera {Kluet (Aceh), Mentawai (Sumatera Barat), Enggano (Bengkulu) dan Nias (Sumatera Utara)} dengan Dringo dari pulau Kalimantan, Sulawesi, Nusa Tenggara, Maluku dan Papua. Dringo dari etnis Kambera dan Belu Tetun (Nusa Tenggara Timur) mempunyai indeks similaritas 100% atau identik.

Dendogram (Gambar 3) menunjukkan Dringo mempunyai keragaman genetik yang rendah sebesar 76,7–100% dan menjadi 3 kluster besar berdasarkan penanda molekuler ISSR. Hal tersebut sesuai dengan sifat perbanyak Dringo secara vegetatif menggunakan rimpang dan tumbuh berkelompok serta sistem penyerbukannya belum diketahui secara pasti sehingga menyebabkan keragaman genetik yang rendah (Rana et al., 2013). Menurut Pai (2005), keragaman genetik yang rendah pada Dringo berdasarkan ISSR di Ohio Tenggara mengindikasikan bahwa Dringo mempunyai sifat monoklonal dengan perbanyak secara vegetatif.



**Gambar 3.** Dendogram 20 aksesi Dringo (*Acorus calamus L.*) berdasarkan penanda molekuler ISSR

Aksesi Dringo dari wilayah timur mengelompok menjadi satu kluster dengan Dringo dari wilayah Sumatera yaitu Kluet (Aceh), Nias (Sumatera Utara), Mentawai (Sumatera Barat), dan Enggano (Bengkulu) serta Musi (Sumatera Selatan). Sedangkan Dringo dari etnis Minangkabau (Sumatera Barat), Muko–muko (Bengkulu) dan Sakai (Riau) mengelompok menjadi satu kluster terpisah. Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena populasi Dringo pada pulau Sumatera mempunyai tetua klon atau varietas yang berbeda dan kemungkinan adanya kariotipe (jumlah kromosom) yang berbeda. Menurut Nguyen (1999) dan (Khare, 2007) *A. calamus* var. *angustatus* Bess dan *A. calamus* var. *verus* L. mempunyai ploidi tetraploid dengan daerah penyebaran di wilayah Malesiana dan ekotipe tropis. Selain itu kondisi geografik yang berbeda antara Indonesia wilayah timur dan barat menyebabkan adanya variasi genetik (Ahlawat *et al.*, 2010; Kareem *et al.*, 2012).

Kemungkinan lainnya adalah Dringo mempunyai tempat tumbuh pada wilayah yang berdekatan dan berasal dari klon yang sama seperti pada Dringo aksesi dari Belu Tetun dan Kambara yang berasal dari Nusa Tenggara Timur serta mempunyai kemiripan 100%. Keragaman genetik yang rendah juga dijumpai pada enam populasi Dringo di India berdasarkan penanda molekular RAPD (Giri *et al.*, 2012). Dua ekotipe Dringo di Korea menunjukkan keragaman genetik yang rendah dengan rerata jarak genetik sebesar 0,27 (Lee *et al.*, 2011). Menurut Zhou *et al.* (2008) keragaman genetik suatu spesies ditentukan oleh beberapa faktor yaitu faktor geografis, sistem persilangan, reproduksi vegetatif, pola penyebaran dan ukuran populasi.

Pola pengelompokan Dringo berdasarkan ISSR hampir sama dengan pola pengelompokan berdasarkan *chemical profiling* secara *Spektrofotometri Fourier Transform Infra Red* (FTIR) dan *High–Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Dringo dari Mentawai, Kluet dan Musi mengelompok dengan Dringo yang berasal dari wilayah timur Indonesia, selain itu Dringo Belu Tetun dan Kambara mengelompok sangat dekat (data tidak ditampilkan). Avadhani *et al.* (2013) menunjukkan

adanya keragaman kandungan kimia Dringo dengan rentang sempit terutama kadar  $\beta$ -asaron pada beberapa aksesi yang dikoleksi dari lokasi geografi dan varietas yang berbeda. Sempitnya keragaman kandungan kimia tersebut juga disebabkan perbanyakannya Dringo secara vegetatif.

Keragaman genetik yang rendah kemungkinan akan menyebabkan berkurangnya ketahanan populasi suatu spesies dalam menghadapi perubahan lingkungan (Ellstrand and Elam, 1993). Beberapa batra di 8 etnis dari 5 provinsi yaitu Lampung, Sulawesi Utara, Sulawesi Tenggara, Nusa Tenggara Timur dan Maluku yang diteliti saat Ristoja 2012 melaporkan Dringo merupakan tumbuhan yang semakin sulit diperoleh. Populasi Dringo pada beberapa bagian wilayah di India mulai berkurang akibat adanya eksploitasi besar-besaran dan di Eropa juga dilaporkan populasi Dringo sudah jarang dijumpai akibat kerusakan habitat karena pengeringan area basah (Bhat *et al.*, 2011; Dusek *et al.*, 2007).

Oleh sebab itu dibutuhkan langkah-langkah efektif untuk melindungi spesies tersebut dari hilangnya keragaman genetik terutama untuk tumbuhan yang banyak digunakan sebagai bahan baku obat tradisional. Adanya *database* keragaman genetik Dringo akan membantu dalam pemuliaan, pemetaan dan upaya konservasi tumbuhan obat terutama secara *in situ*.

## KESIMPULAN

Berdasarkan penanda molekular ISSR Dringo (*Acorus calamus* L.) yang digunakan oleh berbagai etnis Indonesia yang tersebar di 20 lokasi geografis berbeda mempunyai keragaman genetik yang rendah sebesar 76,7–100%. Hal ini disebabkan karena perbanyakannya Dringo dilakukan secara klonal (vegetatif). Upaya konservasi serta pemuliaan Dringo diperlukan mengingat keragaman genetik yang rendah dan kebutuhan sebagai bahan baku ramuan yang kemungkinan akan mengakibatkan ketahanan dan jumlah populasi menurun.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini merupakan salah satu bagian dari penelitian Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT), Badan Litbang Kesehatan yang dibiayai dari DIPA Tahun 2014.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahlawat, A., M. Katoch, G. Ram and A. Ahuja. 2010. Genetic diversity in *Acorus calamus* L. as revealed by RAPD markers and its relationship with  $\beta$ -asarone content and ploidy level. *Scientia Horticulturae*, 124: 294–297.
- Avadhani, M.M.N., I. Selvaraj, P.E. Rajasekharan, C. Rajasekharan, C. Tharachand, VK. Rao and H. Munirapaja. 2013. HPLC profiling of  $\beta$ -Asarone content and cytogenetic studies of Medicinally Important Indian *Acorus calamus* L., Accessions. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 22(2): 73–78.
- Berteau, C.M., C.M.M. Azzolin, S. Bossi, G. Doglia, ME Maffei. 2005. Identification of an Eco RI restriction site for a rapid and precise determination of  $\beta$ -asarone free *Acorus calamus* cytotypes. *Phytochemistry*, 66: 507–514.
- Bhat, S., BK. Ashok, DV. Bhat, R. Acharya, VJ. Shukl. 2011. A comparative phytochemical evaluation of wild and cultivated *Acorus calamus* Linn (*Vacha*) with special reference to  $\beta$ -Asarone content. *Inventi Rapid Pharm Analysis and Quality Assurance*, 2(1):1–4.
- Dusek, K., B. Galambosi, E.B. Hethelyi, K. Korany, K. Karlova. 2007. Morphological and chemical variations of sweet flag (*Acorus calamus* L.) in the Czech and Finnish gene bank collection. *Horticultural Science (Prague)*, 34 (1): 17–25.
- Ellstrand, N.C. and D.R. Elam. 1993. Population genetic consequences of small population size: implication for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematic*, 24: 217–242.
- Giri, P., G. Taj and H.S. Ginwal. 2012. Molecular characterization of six populations of *Acorus calamus* L. using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *African Journal of Biotechnology*, 11(40): 9522–9526.
- Kareem, V.K., P.E. Rajasekharan, B.S. Ravish, S. Mini, A. Sane and T.V. Kumar. 2011. Analysis of genetic diversity in *Acorus calamus* populations in South and North East India using ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 40 (2012): 156–161.
- Khare, C.P. 2007. *Indian medicinal plants*. 1st edition. Springer Science Business Media, LLC., 16–17.
- Lee J.H., I.S. Kim, S.G. Lee, K.S. Rim, S. Kim and T.H. Han. 2011. Analysis of genetic diversity of Korean accessions of the genus *Acorus* using RAPD markers and NIR Spectroscopy. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, 29(3):232–239.
- Liao L.C. and J.Y. Hsiao. 1998. Relationship between population genetic structure and riparian habitat as revealed by RAPD analysis of the rheophyte *Acorus gramineus* Soland. (Araceae) in Taiwan. *Molecular Ecology*, 7(10): 1275–1281.
- Li, A. and S. Ge. 2001. Genetic variation and clonal diversity of *Psammochloa villosa* (Poaceae) detected by ISSR Markers. *Annals of Botany*, 87: 585–590.
- McGaw, L.J., A.K. Jager, J. Staden. 2002. Isolation of  $\beta$ -asarone, an antibacterial and anthelmintic compound, from *Acorus calamus* in South Africa. *South African Journal of Botany*, 68(1):31–35.
- Nguyen, D. 1999. *Acorus calamus* L. [Internet] Record from Proseabase. de Padua, L.S., Bunyapraphatsara, N. and Lemmens, R.H.M.J. (Editors). PROSEA (*Plant Resources of South-East Asia*) Foundation, Bogor, Indonesia. <http://www.proseanet.org>.
- Pai, A. 2005. The population ecology of a perennial clonal herb *Acorus calamus* L. (Acoraceae) in southeast Ohio, USA Ph.D. *Dissertation*. Ohio Univ., USA p. 1–153.



- Raja, A.E., M. Vijayalakshmi, G. Devalarao. 2009. *Acorus calamus* Linn.: chemistry and biology. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2(2): 256–261.
- Rana, T.S., S.M. Kamalesh, M.M. Pandey, S.K. Srivastava and A.K.S. Rawat. 2013. Molecular and chemical profiling of 'sweet flag' (*Acorus calamus* L.) germplasm from India. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(2):231–237.
- Rout, G.R. 2006. Identification of *Tinospora cordifolia* (Willd.) Miers ex Hook.f & Thomas Using RAPD Markers. *Journal of Biosciences*, 61c: 118–122.
- Wahyono, S., R. Mujahid, Y. Widiyastuti, D. Subositi, S. Haryanti, N. Supriyati, H. Widodo, T. Widayat, A.P.K. Dewi, W.J. Priyambodo, N. Rahmawati dan M.B.S. Adi. 2012. *Laporan Nasional Ristoja 2012 (Riset Tumbuhan Obat dan Jamu 2012): Eksplorasi Pengetahuan Lokal Etnomedisin dan Tumbuhan Obat di Indonesia Berbasis Komunitas*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional. Badan Litbang Kesehatan. Kementerian Kesehatan RI.
- Wu, Y.B., L.J. Zheng, J. Yi, J.G. Wu, T.Q. Chen and J.Z. Wu. 2013. Quantitative and chemical fingerprint analysis for the quality evaluation of receptaculum *Nelumbinis* by RP-HPLC coupled with hierarchical clustering analysis. *International Journal of Molecular Science*, 14(1): 1999–2010.
- Yende, S.R., U.N. Harle, D.T. Rajgure, T.A. Tuse, N.S. Vyawahare. 2008. Pharmacological profile of *Acorus calamus*: An Overview, *Pharmacognosy Reviews*, 2: 22–26.
- Zhou Y., C. Zhou, H. Yao, Y. Liu, R. Tu. 2008. Application of ISSR markers in detection of genetic variation among Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb) cultivars. *Life Science Journal*, 5(4):6–12.
- Ziekiewicz, E., A. Rafalski, D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genome*, 20: 176–183.

