

**154**

**LIT**

Tawangmangu

**LAPORAN AKHIR PENELITIAN**

Standarisasi Tanaman *Echinacea purpurea* (L.) Moench  
Untuk Bahan Baku Imunomodulator

**Sub Judul**

**Kajian Karakteristik Aksesori dan Pengembangan Teknis  
Pembibitan Secara *In Vitro Echinacea purpurea* L.**



**Dyah Subositi, M.Sc.**

**BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN  
TANAMAN OBAT DAN OBAT TRADISIONAL  
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN RI  
KEMENTERIAN KESEHATAN RI**

**2011**

**LAPORAN AKHIR PENELITIAN**

**Standarisasi Tanaman *Echinacea purpurea* (L.) Moench  
Untuk Bahan Baku Imunomodulator**

**Sub Judul  
Kajian Karakteristik Aksesori dan Pengembangan Teknis  
Pembibitan Secara *In Vitro Echinacea purpurea* L.**



Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan  
**PERPUSTAKAAN**

Tanggal : \_\_\_\_\_  
No. Indek : \_\_\_\_\_  
No. Klass : 154  
LIT  
Tawangmanggar

**Dyah Subositi, M.Sc.**

**BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN  
TANAMAN OBAT DAN OBAT TRADISIONAL  
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN RI  
KEMENTERIAN KESEHATAN RI  
2011**



# KEMENTERIAN KESEHATAN RI

## BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN

TANAMAN OBAT DAN OBAT TRADISIONAL

Jalan Raya Lawu No. 11 Tawangmangu, Karanganyar, Surakarta, Jawa Tengah

Telepon: (0271) 697010 Faksimile: (0271) 697451

E-mail: b2p2to2t@litbang.depkes.go.id Website: <http://www.b2p2toot.litbang.depkes.go.id>

### SURAT KEPUTUSAN KEPALA BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN TANAMAN OBAT DAN OBAT TRADISIONAL BADAN LITBANG KESEHATAN NO. HK.03.07/3/242e/2011

Tentang

#### KAJIAN KARAKTERISTIK AKSESI DAN PENGEMBANGAN TEKNIS PEMBIBITAN SECARA *IN VITRO Echinacea purpurea L.*

MENIMBANG

1. Bahwa *Echinacea purpurea L.* yang ditanam di B2P2TO2T telah mengalami variasi aksesi yang berbeda secara morfologis
2. Bahwa untuk mendapatkan bibit *Echinacea purpurea L.* yang identik dengan induknya, perlu dilakukan perbanyakan secara *in vitro* dengan teknik kultur jaringan tanaman.
3. Bahwa mereka yang namanya tercantum dalam Surat Keputusan ini dipandang cukup cakap untuk melaksanakan penelitian tersebut.

MENINGGAT

1. Undang-undang No. 18 Tahun 2001 tentang Sistem Nasional Penelitian, Pengembangan dan Penerapan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi.
2. Peraturan Pemerintah Nomor 39 Tahun 1995 tentang Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
3. Surat Persetujuan Pelaksanaan Penelitian No: LB.01.07/3/ /2011 tanggal Januari 2011, tentang Kajian Karakteristik aksesi dan Pengembangan teknis Pembibitan secara *in vitro Echinacea purpurea L.*
4. Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan Obat Tradisional tahun Anggaran 2010, No. 0156/024-11.2/XIII/2011 tanggal 31 Desember 2010, Program Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi.

MEMUTUSKAN

MENETAPKAN  
Pertama

: Membentuk Tim Pelaksana Penelitian Kajian Karakteristik aksesi dan Pengembangan teknis Pembibitan secara *in vitro Echinacea purpurea L.*

1. Ketua Pelaksana : Dyah Subositi, M.Sc.
2. Peneliti : DR. Budi Sediadi D., M.Agr.Sc  
Fauzi, SP  
Awal Prichatin KD, M.Sc., Apt  
Nurul Husniati L., SP
3. Pembantu Peneliti : Fitriana, Amd  
Didik Suharto  
Suparno, S.Pd



# KEMENTERIAN KESEHATAN RI

## BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

### BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN

#### TANAMAN OBAT DAN OBAT TRADISIONAL

Jalan Raya Lawu No. 11 Tawangmangu, Karanganyar, Surakarta, Jawa Tengah

Telepon: (0271) 697010 Faksimile: (0271) 697451

E-mail: b2p2to2t@litbang.depkes.go.id Website: <http://www.b2p2toot.litbang.depkes.go.id>

- Kedua : Tim bertugas:
- Melaksanakan penelitian sampai selesai dengan menyerahkan laporan kepada Kepala Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional sesuai dengan Surat Peretujuan Pelaksanaan Penelitian.
  - Membuat pertanggung jawaban penggunaan anggaran sesuai ketentuan yang berlaku.
- Ketiga : Semua pengeluaran untuk pelaksanaan Surat Keputusan ini dibebankan pada DIPA Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan Obat Tradisional tahun anggaran 2011 sesuai peraturan yang berlaku.
- Keempat : Surat Keputusan ini berlaku sejak tanggal 1 Februari 2011 sampai dengan 31 Desember 2011, dengan catatan segala sesuatu akan ditinjau kembali apabila di kemudian hari ternyata terdapat kekeliruan dalam penetapan ini.

Ditetapkan di : Tawangmangu  
Pada Tanggal : 8 Februari 2011

A.n. Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan  
Kepala Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan  
Obat Tradisional

Indah Yuning Prapti, SKM., MKes  
NIP. 19550810 197712 2001

Surat Keputusan ini disampaikan Kepada Yth:

- Kepala Badan Litbang Kesehatan, Kemenkes RI
- Inspektur Jenderal Kemenkes RI
- Sekretaris Jenderal Kemenkes RI
- Dekan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada
- Kepala Biro Keuangan dan Perlengkapan Set. Jend. Kemenkes RI
- Kepala Kantor Pelayanan Perbendaharaan Negara Sragen
- Bendahara Pengeluaran Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan Obat Tradisional
- Yang bersangkutan



# KEMENTERIAN KESEHATAN RI

## BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

### BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN

#### TANAMAN OBAT DAN OBAT TRADISIONAL

Jalan Raya Lawu No. 11 Tawangmangu, Karanganyar, Surakarta, Jawa Tengah

Telepon: (0271) 697010 Faksimile: (0271) 697451

E-mail: b2p2to2t@litbang.depkes.go.id Website: http://www.b2p2toot.litbang.depkes.go.id

### LAMPIRAN KEPUTUSAN KEPALA BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN TANAMAN OBAT DAN OBAT TRADISIONAL

NO. HK.O3.07/3/242e/2011

#### TENTANG PENELITIAN:

#### KAJIAN KARAKTERISTIK AKSESI DAN PENGEMBANGAN TEKNIS PEMBIBITAN SECARA *IN VITRO Echinacea purpurea L.*

Rincian Honorarium Ketua Pelaksana, Peneliti dan Pembantu Peneliti tahun 2011 adalah sebagai berikut:

No	N A M A	JABATAN FUNGSIONAL	URAIAN TUGAS	HONOR/JAM (Rp)
1	Dyah Subositi, M.Si.	Calon Peneliti /Gol III	Ketua Pelaksana	27.500,-
2	DR. Budi Sediadi D., M.AgSc	Peneliti/Gol IIII	Peneliti	35.000,-
3	Fauzi, SP	Peneliti Muda/Gol III	peneliti	35.000,-
4	Awal Prichatin KD, M.Sc., Apt	Calon Peneliti/Gol III	Peneliti	27.500,-
5	Nurul Husnia, SP	Calon Peneliti/Gol III	Peneliti	27.500,-
6	Fitriana, Amd	Calon Litkayasa/Gol II	Pembantu Peneliti	20.000,-
7	Didik Suharto	Calon Litkayasa/Gol II	Pembantu Peneliti	20.000,-
8	Suparno, S.Pd	Litkayasa/Gol III	Pembantu Peneliti	20.000,-

Sesuai dengan DIPA No. 0811/024-11.2.01/13/2011 tanggal 20 Desember 2011 dan Perdirjen No. Per-66/PB/2005 tentang Mekanisme Pelaksanaan Pembayaran Atas Beban Anggaran Pendapatan dan Belanja Negara, dan Perdirjen No Per-11/PB/2011 tentang Perubahan atas Perdirjen No Per-66/PB/2005, yang bersangkutan berhak menerima honor yang terkait dengan operasional satuan kerja sebesar tersebut pada tabel diatas.

Tawangmangu, 08 Februari 2011  
Kuasa Pengguna Anggaran

Indah Yuning Prapti, SKM., MKes  
NIP. 19550810 197712 2001

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbil'alamin, segala puji hanya bagi Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan Laporan Akhir Penelitian ini dengan lancar.

Terwujudnya Laporan Akhir ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak yang telah mendukung baik secara moril maupun materiil. Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Indah Yuning Prapti, SKM, M. Kes., selaku Kepala Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT) yang telah mengizinkan penulis menggunakan sarana dan prasarana penelitian di Laboratorium Terpadu
2. Ketua PPI B2P2TO-OT, Ir. Yuli Widiyastuti, MP yang telah memberikan arahan dan masukan mulai dari perencanaan, pelaksanaan dan pelaporan penelitian
3. Segenap anggota peneliti dan pembantu penelitian dalam penelitian ini yang telah melaksanakan kewajibannya sehingga penelitian dapat terlaksana dengan lancar
4. Pihak-pihak lain yang telah banyak membantu dan tidak dapat disebutkan satu persatu oleh penulis

Laporan akhir penelitian ini masih jauh dari kata sempurna, oleh karena itu kritik dan saran yang bersifat membangun sangat dibutuhkan. Semoga karya yang sederhana ini dapat bermanfaat bagi pihak-pihak yang membutuhkan.

Tawangmangu, Januari 2012

Penulis

## RINGKASAN EKSEKUTIF

Tanaman *Echinacea purpurea* (L.) Moench (ekinase) berasal dari Amerika Utara dan dikenal sebagai tumbuhan obat yang penting. Ekinase menunjukkan efek imunoregulasi, anti inflamasi dan sebagai antioksidan serta tidak mempunyai efek samping ataupun hipersensitivitas pada uji klinis. Ekinase mengandung senyawa metabolit sekunder antara lain yaitu derivat asam kafein, alkamid, flavonoid dan poliasetilen. Alkamid dan derivat asam kafein merupakan senyawa aktif yang menunjukkan efek imunoregulasi (Lee *et al.*, 2010).

Di Indonesia tanaman ini mulai diteliti pada tahun 1998 dan berdasarkan hasil adaptasi menunjukkan bahwa ekinase mampu tumbuh baik di daerah Tropis dari ketinggian 400 – 1.200 m dpl. Pertumbuhan optimal dihasilkan apabila ekinase ditanam pada ketinggian 800 m dpl dengan curah hujan 2.000 – 3.000 mm/tahun serta jenis tanah andosol dan latosol yang mempunyai sifat fisik baik dengan kandungan bahan organik tinggi (Rahardjo, 2000)

*Echinacea purpurea* yang ditanaman di Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT) telah mengalami variasi, saat ini telah ditemukan 10 aksesori yang berbeda secara morfologi, molekular dan kandungan fenol (Fauzi *et al.*, 2010). Penelitian lanjutan aksesori ekinase pilihan perlu dilakukan untuk melihat ada tidaknya variasi F1 aksesori dalam rangka pemurnian aksesori ekinase serta perlu dilakukan pengembangan teknis pembibitan secara *in vitro* ekinase yang merupakan salah satu langkah menuju standarisasi tanaman ekinase sebagai bahan baku untuk imunomodulator.

Tiga aksesori unggulan (BH2, BHU3 dan BHU5) ditanam di tiga lahan yang berbeda tetapi mempunyai kemiripan kondisi lingkungan, serta 7 aksesori lainnya ditanam dalam lahan yang sama. Karakter morfologi, data tumbuh, karakter molekular dan kadar fenol masing-masing F1 aksesori diamati. Selain itu juga dilakukan pembibitan *in vitro* terhadap 3 aksesori ekinase unggulan tersebut.

Tiga aksesori pilihan ekinase yaitu aksesori BH2, BHU3 dan BHU5 yang ditanam di masing-masing lahan penelitian masih menunjukkan adanya variasi dan keturunan pertama (F1) yang mempunyai sifat morfologi yang sama dengan

induknya masih rendah. Aksesori BH2 mempunyai kemurnian keturunan sebesar 13,6% dari total populasi aksesori BH2 yang ditanam, sedangkan kemurnian keturunan aksesori BHU3 sebesar 18% dan BHU5 sebesar 24%. Keturunan F1 dari aksesori BH2 menunjukkan adanya keragaman, terdapat 6 varian dari F1 aksesori ini berdasarkan karakter morfologi dan 2 varian dari keturunan BHU3. Sebelas aksesori termasuk varian-varian tersebut menunjukkan adanya perbedaan genetik dengan menggunakan penanda molekuler ISSR dan RAPD.

Pembibitan *in vitro* aksesori ekinase menggunakan 4 macam Zat pengatur tumbuh (ZPT) yaitu NAA, BAP, IBA dan Giberelin dengan konsentrasi 2,4,dan 6 ppm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa NAA dan BAP memberikan hasil pertumbuhan yang optimum pada konsentrasi 2 ppm, sedangkan IBA dan Giberelin menunjukkan hasil yang optimum dalam penumbuhan ekinase pada konsentrasi 6 ppm.

**Kajian Karakteristik Aksesori dan Pengembangan Teknis Pembibitan Secara  
*In Vitro Echinacea purpurea L.***

Dyah Subositi, dkk

Balai Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional  
Badan Litbang Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI

**ABSTRAK**

Ekinase (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) merupakan tumbuhan obat yang mempunyai aktivitas sebagai imunomodulator. Ekinase pertama kali ditanam di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT) sejak tahun 2002. Ekinase selama ditanam hingga saat telah mengalami variasi morfologi, sebanyak 10 aksesori ditemukan pada tahun 2010. Penelitian ini bertujuan untuk melihat keragaman F1 dari 3 aksesori unggulan (BH2, BHU3 dan BHU5) secara morfologi, molekular dan kadar fenol total, selain itu untuk membudidayakan ekinase secara *in vitro*. Tiga aksesori unggulan (BH2, BHU3 dan BHU5) ditanam di tiga lahan yang berbeda tetapi mempunyai kemiripan kondisi lingkungan, serta 7 aksesori lainnya ditanam dalam lahan yang sama. Karakter morfologi, data tumbuh, karakter molekular dan kadar fenol masing-masing F1 aksesori diamati. Selain itu juga dilakukan pembibitan *in vitro* terhadap 3 aksesori ekinase unggulan tersebut. Tiga aksesori unggulan masih menunjukkan adanya variasi dan keturunan pertama (F1) yang mempunyai sifat morfologi yang sama dengan induknya masih rendah. Keturunan F1 dari aksesori BH2 menunjukkan adanya keragaman, terdapat 6 varian dari F1 aksesori ini berdasarkan karakter morfologi dan 2 varian dari keturunan BHU3. Sebelas aksesori termasuk varian-varian tersebut menunjukkan adanya perbedaan genetik dengan menggunakan penanda molekular ISSR dan RAPD. Zat pengatur tumbuh NAA dan BAP memberikan hasil pertumbuhan yang optimum pada konsentrasi 2 ppm, sedangkan IBA dan Giberelin menunjukkan hasil yang optimum dalam penumbuhan ekinase pada konsentrasi 6 ppm.

Kata kunci: Ekinase (*Echinacea purpurea*), karakter morfologi, molekular, pembibitan *in vitro*

## DAFTAR ANGGOTA TIM PENELITIAN

Sesuai dengan Surat Keputusan Kepala Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan RI Nomor: HK.03.07/3/242e/2011, tertanggal 8 Februari 2011 telah ditetapkan susunan tim peneliti pada penelitian "**Kajian Karakteristik Aksesori dan Pengembangan Teknis Pembibitan Secara *In Vitro* *Echinacea purpurea* L.**" dengan susunan sebagai berikut :

Ketua Pelaksana	: Dyah Subositi, M.Sc
Peneliti	: DR. Budi Setiadi Daryono, M.AgrSc
	: Fauzi, SP
	: Awal Prichatin Kusuma Dewi, S.Si, Apt
	: Nurul Husniati L, SP
	: Fitriana, A.Md
Pembantu Peneliti	: Didik Suharto, A.Md
	: Suparno, S.Pd
	: Samingan
Administrator	: Prasetyo Hermanto, S.Kom

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	.....	i
SK PENELITIAN	.....	ii
CHECKLIST	.....	iv
KATA PENGANTAR	.....	v
RINGKASAN EKSEKUTIF	.....	vi
ABSTRAK	.....	viii
DAFTAR ANGGOTA TIM PENELITI	.....	ix
DAFTAR ISI	.....	x
DAFTAR GAMBAR/TABEL	.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	.....	xv
PENDAHULUAN	.....	1
TUJUAN DAN MANFAAT		
A. Tujuan	.....	4
B. Manfaat	.....	4
METODE PENELITIAN	.....	5
HASIL dan PEMBAHASAN	.....	
A. Karakter Morfologi	.....	17
B. Karakter Molekular	.....	23
C. Pembibitan <i>In vitro</i>	.....	39
KESIMPULAN DAN SARAN	.....	41
UCAPAN TERIMAKASIH	.....	42
DAFTAR PUSTAKA	.....	43
LAMPIRAN	.....	45
LEMBAR PENGESAHAN	.....	47

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Morfologi bunga ekinase aksesori F1 BH2 varian A (BH2-Va) pada lahan di ketinggian 1200 mdpl; A. Bunga mekar, B. Kuncup	18
Gambar 2.	Morfologi bunga ekinase aksesori F1 BH2 varian B (BH2-Vb) pada lahan di ketinggian 1200 mdpl; A. Bunga mekar, B. Kuncup	18
Gambar 3.	Morfologi bunga ekinase aksesori F1 BH2 varian C (BH2-Vc) pada lahan di ketinggian 1200 mdpl; A. Bunga mekar, B. Kuncup	19
Gambar 4.	Morfologi bunga ekinase aksesori F1 BH2 varian D (BH2-Vd) pada lahan di ketinggian 1200 mdpl; A. Bunga mekar, B. Kuncup	19
Gambar 5.	Morfologi bunga ekinase aksesori F1 BH2 varian E (BH2-Ve) pada lahan di ketinggian 1200 mdpl; A. Bunga mekar, B. Kuncup	20
Gambar 6.	Morfologi bunga ekinase aksesori F1 BH2 varian F (BH2-Vf) pada lahan di ketinggian 1200 mdpl; A. Bunga mekar, B. Kuncup	20
Gambar 7.	Morfologi bunga ekinase aksesori F1 BHU3 varian A (BHU3-Va) pada lahan di ketinggian 1200 mdpl; A. Bunga mekar, B. Kuncup	21
Gambar 8.	Morfologi bunga ekinase aksesori F1 BHU3 varian B (BHU3-Vb) pada lahan di ketinggian 1200 mdpl; A. Bunga mekar, B. Kuncup	22
Gambar 9.	DNA genom F1 tiga aksesori ekinase (BH2, BHU3 dan BHU5) menggunakan metode CTAB	24
Gambar 10.	DNA genom F1 aksesori ekinase menggunakan kit isolasi DNA; L-1:Ladder1 kb, 1: aksesori F1-BH2, 2: aksesori F1-BHU3, 3: aksesori F1-BHU5, 4-9: aksesori F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, 10-11: aksesori F1-BHU3-Va dan Vb	24
Gambar 11.	Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR UBC-866: L-1:Ladder1 kb, 1: aksesori F1-BH2, 2: aksesori F1-BHU3, 3: aksesori F1-BHU5, 4-9: aksesori F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, 10-11: aksesori F1-BHU3-Va dan Vb, L-2: Ladder 100 bp	26
Gambar 12.	Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR UBC-834: L-1:Ladder1 kb, 1: aksesori F1-BH2, 2: aksesori F1-BHU3, 3: aksesori F1-BHU5, 4-9: aksesori F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, 10-11: aksesori F1-BHU3-Va dan Vb, L-2: Ladder 100 bp	27
Gambar 13.	Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR UBC-834: L-1:Ladder1 kb, 1: aksesori F1-BH2, 2: aksesori F1-BHU3, 3: aksesori F1-BHU5, 4-9: aksesori F1-BH2-Va, Vb,	28

	Vc, Vd, Ve dan Vf, <b>10-11</b> : aksesii F1-BHU3-Va dan Vb, <b>L-2</b> : Ladder 100 bp	
Gambar 14.	Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR UBC-807: <b>L-1</b> :Ladderl kb, <b>1</b> : aksesii F1-BH2, <b>2</b> : aksesii F1-BHU3, <b>3</b> : aksesii F1-BHU5, <b>4-9</b> : aksesii F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, <b>10-11</b> : aksesii F1-BHU3-Va dan Vb, <b>L-2</b> : Ladder 100 bp	28
Gambar 15.	Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR UBC-825: <b>L-1</b> :Ladderl kb, <b>1</b> : aksesii F1-BH2, <b>2</b> : aksesii F1-BHU3, <b>3</b> : aksesii F1-BHU5, <b>4-9</b> : aksesii F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, <b>10-11</b> : aksesii F1-BHU3-Va dan Vb, <b>L-2</b> : Ladder 100 bp	29
Gambar 16.	Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR UBC-812: <b>L-1</b> :Ladderl kb, <b>1</b> : aksesii F1-BH2, <b>2</b> : aksesii F1-BHU3, <b>3</b> : aksesii F1-BHU5, <b>4-9</b> : aksesii F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, <b>10-11</b> : aksesii F1-BHU3-Va dan Vb, <b>L-2</b> : Ladder 100 bp	30
Gambar 17.	Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR A830241: <b>L-1</b> :Ladderl kb, <b>1</b> : aksesii F1-BH2, <b>2</b> : aksesii F1-BHU3, <b>3</b> : aksesii F1-BHU5, <b>4-9</b> : aksesii F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, <b>10-11</b> : aksesii F1-BHU3-Va dan Vb, <b>L-2</b> : Ladder 100 bp	31
Gambar 18.	Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR (CAG)5: <b>L-1</b> :Ladderl kb, <b>1</b> : aksesii F1-BH2, <b>2</b> : aksesii F1-BHU3, <b>3</b> : aksesii F1-BHU5, <b>4-9</b> : aksesii F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, <b>10-11</b> : aksesii F1-BHU3-Va dan Vb, <b>L-2</b> : Ladder 100 bp	31
Gambar 19.	Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR 17898B: <b>L-1</b> :Ladderl kb, <b>1</b> : aksesii F1-BH2, <b>2</b> : aksesii F1-BHU3, <b>3</b> : aksesii F1-BHU5, <b>4-9</b> : aksesii F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, <b>10-11</b> : aksesii F1-BHU3-Va dan Vb, <b>L-2</b> : Ladder 100 bp	32
Gambar 20.	Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR 814: <b>L-1</b> :Ladderl kb, <b>1</b> : aksesii F1-BH2, <b>2</b> : aksesii F1-BHU3, <b>3</b> : aksesii F1-BHU5, <b>4-9</b> : aksesii F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, <b>10-11</b> : aksesii F1-BHU3-Va dan Vb, <b>L-2</b> : Ladder 100 bp	33
Gambar 21.	Dendogram 11 aksesii <i>Echinacea purpurea</i> (ekinase) berdasarkan penanda molekular ISSR	36
Gambar 22.	Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer RAPD OPA-10: <b>L-1</b> :Ladderl kb, <b>1</b> : aksesii F1-BH2, <b>2</b> : aksesii F1-BHU3, <b>3</b> : aksesii F1-BHU5, <b>4-9</b> : aksesii F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, <b>10-11</b> : aksesii F1-BHU3-Va dan Vb, <b>L-2</b> : Ladder 100 bp	37
Gambar 23.	Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer RAPD OPA-16: <b>L-1</b> :Ladderl kb, <b>1</b> : aksesii F1-BH2, <b>2</b> : aksesii	38

	F1-BHU3, 3: aksessi F1-BHU5, 4-9: aksessi F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, 10-11: aksessi F1-BHU3-Va dan Vb, L-2: Ladder 100 bp	
Gambar 24.	Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer RAPD OPA-17: L-1:Ladder1 kb, 1: aksessi F1-BH2, 2: aksessi F1-BHU3, 3: aksessi F1-BHU5, 4-9: aksessi F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, 10-11: aksessi F1-BHU3-Va dan Vb, L-2: Ladder 100 bp	38
Gambar 25.	Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer RAPD OPA-18: L-1:Ladder1 kb, 1: aksessi F1-BH2, 2: aksessi F1-BHU3, 3: aksessi F1-BHU5, 4-9: aksessi F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, 10-11: aksessi F1-BHU3-Va dan Vb, L-2: Ladder 100 bp	39
Gambar 26.	Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer RAPD OPA-19: L-1:Ladder1 kb, 1: aksessi F1-BH2, 2: aksessi F1-BHU3, 3: aksessi F1-BHU5, 4-9: aksessi F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, 10-11: aksessi F1-BHU3-Va dan Vb, L-2: Ladder 100 bp	40
Gambar 27.	Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer RAPD OPB-4: L-1:Ladder1 kb, 1: aksessi F1-BH2, 2: aksessi F1-BHU3, 3: aksessi F1-BHU5, 4-9: aksessi F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, 10-11: aksessi F1-BHU3-Va dan Vb, L-2: Ladder 100 bp	40
Gambar 28.	Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer RAPD OPE-5: L-1:Ladder1 kb, 1: aksessi F1-BH2, 2: aksessi F1-BHU3, 3: aksessi F1-BHU5, 4-9: aksessi F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, 10-11: aksessi F1-BHU3-Va dan Vb, L-2: Ladder 100 bp	41
Gambar 29.	Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer RAPD OPE-6: L-1:Ladder1 kb, 1: aksessi F1-BH2, 2: aksessi F1-BHU3, 3: aksessi F1-BHU5, 4-9: aksessi F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, 10-11: aksessi F1-BHU3-Va dan Vb, L-2: Ladder 100 bp	42
Gambar 30.	Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer RAPD OPH-13: L-1:Ladder1 kb, 1: aksessi F1-BH2, 2: aksessi F1-BHU3, 3: aksessi F1-BHU5, 4-9: aksessi F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, 10-11: aksessi F1-BHU3-Va dan Vb, L-2: Ladder 100 bp	42
Gambar 31.	Dendogram 11 aksessi <i>Echinacea purpurea</i> (ekinase) berdasarkan penanda molekular RAPD	45
Gambar 32.	Kurva standar penetapan kadar fenol total	46
Gambar 33.	Bibit ekinase usia 2 bulan hasil pembibitan <i>In Vitro</i> dengan berbagai konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) yang optimum; (A) BAP 2 ppm, (B) NAA 2 ppm, (C) Giberelin 6 ppm, (D) IBA 6 ppm	47

## DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Data tumbuh 11 aksesi ekinase sebelum panen	22
Tabel 2.	Primer ISSR dan RAPD serta <i>annealing temperature</i> (Ta) optimal yang digunakan untuk amplifikasi	25
Tabel 3.	Total fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan 10 primer ISSR dan prosentase fragmen polimorfik pada 11 aksesi ekinase	33
Tabel 4.	Total fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan 10 primer RAPD dan prosentase fragmen polimorfik pada 11 aksesi ekinase	43
Tabel 5.	Rerata Jumlah daun dan akar ekinase menggunakan ZPT berbeda dan konsentrasi yang optimum	46

## DAFTAR LAMPIRAN

- |             |  |    |
|-------------|--|----|
| Lampiran 1. | Bentuk reseptakel masing-masing varian aksesi (A. BH2-Va, B. BH2-Vb, C. BH2-Vc, D. BH2-Vd, E. BH2-Ve, F. BH2-Vf, G. BHU3-Va, H. BHU3-Vb) | 52 |
| Lampiran 2. | Data berat basah masing-masing aksesi  | 53 |

## PENDAHULUAN

Tanaman *Echinacea purpurea* (L.) Moench (ekinase) berasal dari Amerika Utara dan dikenal sebagai tumbuhan obat yang penting. Ekinase menunjukkan efek imunoregulasi, anti inflamasi dan sebagai antioksidan serta tidak mempunyai efek samping ataupun hipersensitivitas pada uji klinis. Ekinase mengandung senyawa metabolit sekunder antara lain yaitu derivat asam kafein, alkaloid, flavonoid dan poliasetilen. Alkaloid dan derivat asam kafein merupakan senyawa aktif yang menunjukkan efek imunoregulasi (Lee *et al.*, 2010).

Di Indonesia tanaman ini mulai diteliti pada tahun 1998 dan berdasarkan hasil adaptasi menunjukkan bahwa ekinase mampu tumbuh baik di daerah Tropis dari ketinggian 400 – 1.200 m dpl. Pertumbuhan optimal dihasilkan apabila ekinase ditanam pada ketinggian 800 m dpl dengan curah hujan 2.000 – 3.000 mm/tahun serta jenis tanah andosol dan latosol yang mempunyai sifat fisik baik dengan kandungan bahan organik tinggi (Rahardjo, 2000)

*Echinacea purpurea* yang ditanam di Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B3P21O-OT) telah mengalami variasi, saat ini telah ditemukan 10 aksesori yang berbeda secara morfologi, molekular dan kandungan fenol total (Fauzi *et al.*, 2010). Variasi tanaman merupakan hasil kerja sama antara genotip dan faktor lingkungan sehingga menghasilkan variasi anatomi, sitologi dan kandungan kimia (Allard, 1992).

Sampai saat ini karakter morfologi masih digunakan sebagai dasar pengenalan dari penyusunan klasifikasi tumbuhan. Klasifikasi yang didasarkan pada sifat morfologi dapat dipakai sebagai acuan umum yang tepat dan cepat untuk penyusunan peta keanekaragaman tumbuhan, khususnya Angiospermae. Sifat morfologi dapat diamati dengan lebih mudah dan praktis dibandingkan dengan sifat-sifat yang lainnya (Jones dan Luchsinger, 1986).

Karakter morfologi mempunyai kekurangan yaitu dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan umur fisiologis tanaman sehingga harus didukung dengan karakter lainnya misalnya karakter biokimia dan molekular untuk menentukan dan mengidentifikasi keragaman baik interspesifik maupun intraspesifik tumbuhan

(Zhao *et al.*, 2007). Beberapa penanda molekular telah digunakan untuk studi-studi keanekaragaman atau variasi genetik diantara atau antar populasi spesies tanaman. Penanda molekular tersebut antara lain *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), Mikrosatelit atau *Simple Sequence Repeats* (SSRs) dan *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSRs) (Muthusamy *et al.*, 2008).

Penanda molekular RAPD merupakan metode efektif yang umum digunakan oleh peneliti untuk identifikasi variasi genetik intraspesies maupun interspesies karena mempunyai beberapa keuntungan yaitu: 1. Tidak perlu mengetahui sekuen DNA, 2. Lebih cepat dan mudah pelaksanaannya, 3. Aplikasinya dapat digunakan untuk identifikasi kultivar atau plasma nutfah dan pemetaan genetik, 4. Pita DNA yang dihasilkan lebih banyak (Hasan *et al.*, 2009; Hasnaoui *et al.*, 2010).

Menurut Xiao-Ying *et al.* (2007) ISSR merupakan teknik atau penanda molekular yang berkembang lebih akhir dibanding marker lainnya dan paling banyak digunakan untuk studi genetik pada tanaman karena mempunyai sifat yang sangat sensitif, efektif dan reproduksibel. ISSR merupakan penanda molekular yang menunjukkan sifat dominan tetapi menunjukkan variabilitas yang tinggi sehingga ISSR sangat cocok untuk menyelidiki variasi genetik di antara individu yang berkerabat sangat dekat dan klasifikasi kultivar tanaman budidaya (Dje *et al.*, 2006).

*Echinacea purpurea* (L.) Moench termasuk Familia Asteraceae, bunga majemuk cawan dan tanaman menyerbuk bebas, bila diperbanyak dengan biji terutama jika berasal dari tanaman yang belum stabil secara genetis akan terjadi segregasi pada keturunannya sehingga bibit yang dihasilkan tidak sama dengan induknya. Untuk mendapatkan bibit klonase yang identik dengan induknya secara konvensional sulit untuk dilakukan sehingga perlu dilakukan perbanyakan dengan cara kultur jaringan (*in vitro*) karena perbanyakan tanaman melalui teknik kultur jaringan tersebut dapat menghasilkan tanaman yang identik dengan sifat induknya seragam dalam jumlah besar dan waktu singkat (Priyono *et al.*, 2000).

Media kultur merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan perbanyak tanaman secara kultur jaringan. Berbagai komposisi media kultur telah diformulasikan untuk mengoptimalkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman yang dikulturkan. Dalam media kultur jaringan diperlukan penambahan zat pengatur tumbuh untuk mendukung pertumbuhan eksplan. Dalam kultur jaringan, dua golongan zat pengatur tumbuh yang sangat penting adalah sitokinin dan auksin (Gunawan, 1990). Dalam pertumbuhan jaringan, sitokinin bersama-sama dengan auksin memberikan pengaruh interaksi terhadap diferensiasi jaringan (Sriyanti dan Wijayani, 1994).

Sitokinin memacu pembelahan sel, serta mampu memacu tunas samping dan menstimulasi perluasan daun sebagai hasil dari pembesaran sel. Sitokinin menyebabkan mobilisasi metabolit dari daerah yang tidak diperlukan ke daerah yang diperlukan sehingga membentuk hubungan *source-sink* dan sintesis asam nukleat serta protein dapat berlanjut (Moore, 1979). Menurut Badriah *et al.* (1998) sitokinin berpengaruh terhadap inisiasi tunas. Jenis sitokinin yang paling sering dipakai adalah 6-Benzyl Amino Purine (BAP) karena efektivitasnya tinggi dan harganya murah (Yusnita, 2003). IBA (*Indole Butiric Acid*) adalah zat pengatur tumbuh yang tergolong auksin yang bersifat lebih aktif dibanding auksin yang lainnya (Salisbury dan Ross, 1995).

Penelitian lanjutan aksesi ekinase pilihan perlu dilakukan untuk melihat ada tidaknya variasi FI aksesi dalam rangka pemurnian aksesi ekinase serta perlu dilakukan pengembangan teknis pembibitan secara *in vitro* ekinase yang merupakan salah satu langkah menuju standarisasi tanaman ekinase sebagai bahan baku untuk imunomodulator.

## TUJUAN DAN MANFAAT

### A. TUJUAN

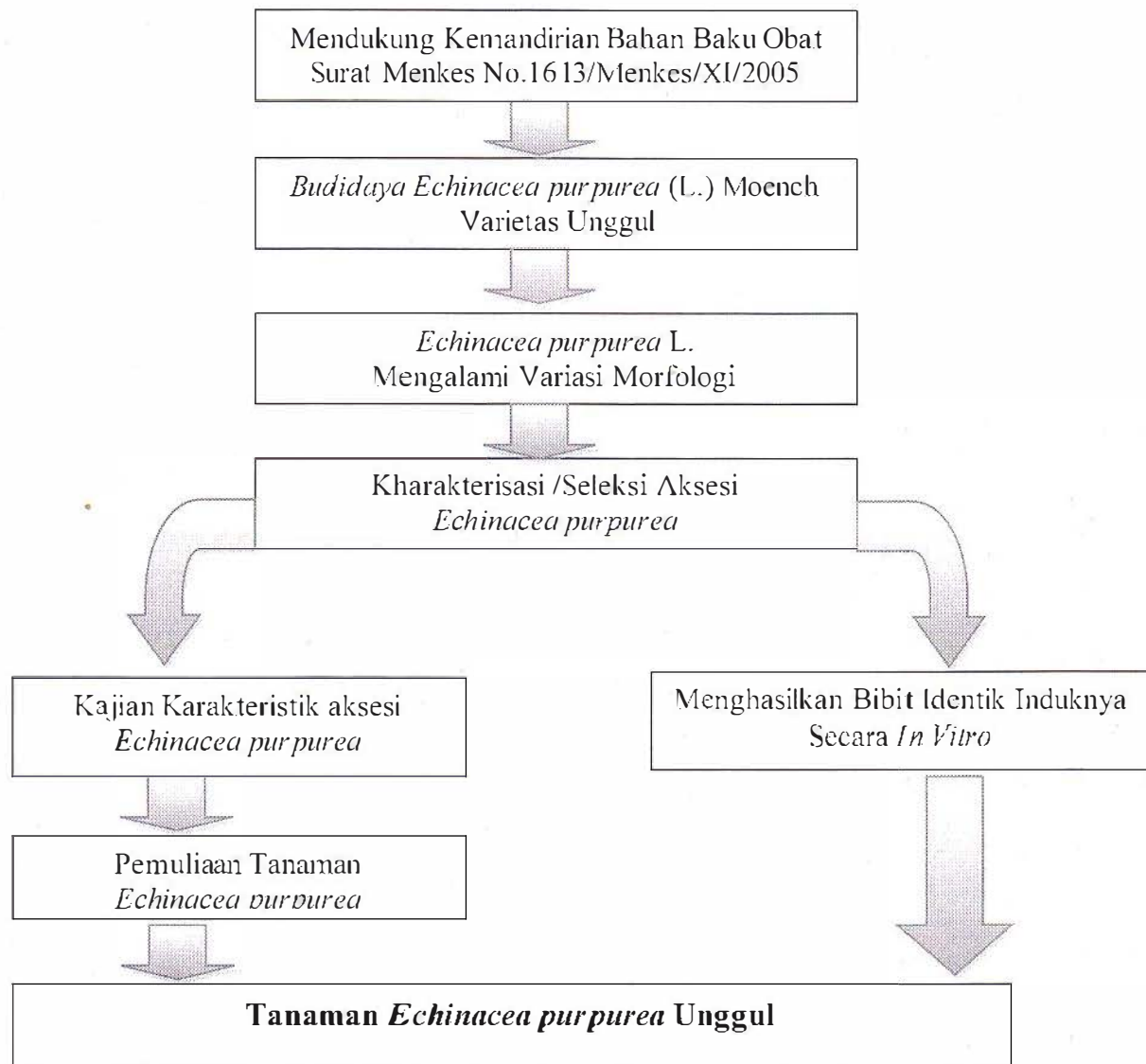
1. Tujuan Umum : Mendapatkan tanaman *Echinacea purpurea* L. (ekinase) yang standar guna penyediaan bahan baku imunomodulator berkualitas
2. Tujuan Khusus :
  - a. Mengetahui karakter masing-masing keturunan aksesi tanaman ekinase
  - b. Mendapatkan aksesi tanaman ekinase yang stabil guna menghasilkan varietas unggul
  - c. Mendapatkan metode perbanyakan ekinase secara *in vitro* bibit yang identik dengan sifat induknya

### B. MANFAAT

Mendapatkan karakter aksesi unggul dan metode perbanyakan tanaman *Echinacea purpurea* (ekinase) secara *in vitro* untuk mendukung standardisasi tanaman ekinase sebagai bahan baku imunomodulator.

## METODE PENELITIAN

### A. Kerangka Pikir



## **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di 4 kebun percobaan pada ketinggian 1.200 m dpl dan di Laboratorium Terpadu Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan Obat Tradisional pada bulan Februari 2011-Desember 2011

## **C. Desain Penelitian**

### **1. Karakterisasi Akses**

Merupakan penelitian deskriptif eksploratif yang meliputi pengambilan data morfologi, pengambilan data molekuler untuk menguji karakteristik keturunan masing-masing akses *Echinacea purpurea* (L.) Moench

### **2. Pembibitan *Echinacea purpurea* Secara *In Vitro***

Penelitian ini menggunakan media MS dan zat pengatur tumbuh bertujuan untuk menginduksi tunas. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang disusun secara faktorial dengan menggunakan dua faktor. Faktor pertama adalah Jenis Zat Pengatur Tumbuh IBA yang terdiri dari 3 taraf yaitu:

N1 = IBA konsentrasi 2 ppm

N2 = IBA konsentrasi 4 ppm

N3 = IBA konsentrasi 6 ppm

Faktor kedua adalah konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh BAP yang terdiri dari 3 taraf yaitu:

K1 = BAP konsentrasi 2 ppm

K2 = BAP konsentrasi 4 ppm

K3 = BAP konsentrasi 6 ppm

Faktor kedua adalah konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh NAA yang terdiri dari 3 taraf yaitu:

K1 = NAA konsentrasi 2 ppm

K2 = NAA konsentrasi 4 ppm

K3 = NAA konsentrasi 6 ppm

Faktor kedua adalah konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh Giberelin yang terdiri dari 3 taraf yaitu:

K1 = Giberelin konsentrasi 2 ppm

K2 = Giberelin konsentrasi 4 ppm

K3 = Giberelin konsentrasi 6 ppm

Kontrol= tanpa zat pengatur tumbuh

#### **D. Jenis Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental di lapangan dan di laboratorium.

#### **E. Populasi dan Sampel**

##### **1. Karakterisasi Aksesori**

Keturunan 3 aksesori *Echinacea purpurea* (L.) Moench ditanam di tempat yang berbeda pada kondisi lingkungan sama dan 7 aksesori lainnya di lahan yang sama untuk melihat keragaman F1.

##### **2. Pembibitan *Echinacea purpurea* (L.) Moench Secara *In Vitro***

Kombinasi perlakuan sebanyak 10 perlakuan yang diulang sebanyak 3 kali, masing-masing perlakuan menggunakan 3 sampel eksplan tanaman ekinase. Sehingga jumlah semua populasi eksplan tanaman ekinase adalah 270.

#### **F. Variabel dan Cara Pengumpulan Data**

##### **1. Karakterisasi Aksesori**

Variabel bebas adalah aksesori *Echinacea purpurea* (L.) Moench

Variabel tergantung adalah:

- a. Tinggi tanaman: pengamatan tinggi tanaman dilakukan dengan cara mengukur tinggi dari pangkal batang sampai titik tumbuh tertinggi dilakukan setiap bulan
- b. Ukuran Tajuk
- c. Jumlah Kuntum Bunga
- d. Jumlah daun: pengamatan jumlah daun dengan menghitung seluruh daun yang muncul setiap bulan
- e. Saat berbunga: dilakukan pengamatan saat mulai tanaman ekinase berbunga
- f. Jumlah anakan

- g. Berat segar herba: dilakukan apa bila tanaman telah berproduksi, pengukuran dilakukan dengan cara menimbang hasil panen dalam keadaan segar.
- h. Berat kering: dilakukan penimbangan setelah hasil panen dikeringkan sehingga mencapai kadar air 10 %.
- i. Rendemen kering simplisia: dihitung berdasarkan selisih antara berat segar dengan berat kering herba dibagi berat segar herba dikalikan 100 %.
- j. Kadar polifenol, diperoleh dari penetapan kadar polifenol menggunakan Reagen Folin Cio-chalteu

## **2. Pembibitan *Echinacea purpurea* Secara In Vitro**

Variabel bebas adalah Zat Pengatur Tumbuh IBA, BAP, NAA dan Giberelin.

Variabel tergantung adalah

- a) Saat muncul kalus: eksplan diamati setiap hari setelah penanaman sampai mulai terbentuk tanda munculnya kalus dinyatakan hari setelah tanam
- b) Kondisi kalus diamati secara kualitatif berdasarkan banyak atau sedikitnya kalus yang tumbuh, warna kalus, jenis kalus dan tempat tumbuhnya kalus pada pangkal batang atau akar
- c) Warna dan tekstur kalus: warna dan tekstur kalus diamati mulai 3 HST
- d) Saat muncul tunas: terbentuknya tunas ditandai dengan adanya tonjolan berwarna putih kehijauan ( $\pm 2$  mm) pada permukaan eksplan bagian atas
- e) Jumlah tunas: Jumlah tunas dihitung berdasarkan akumulasi jumlah tunas pada eksplan
- f) Saat muncul daun: penentuan saat muncul daun yaitu pada saat daun telah terbuka sempurna dinyatakan dalam HST
- g) Jumlah daun: jumlah daun dihitung berdasarkan akumulasi jumlah daun yang telah membuka sempurna, termasuk daun yang sudah kering.
- h) Panjang akar, diukur dari leher akar sampai ujung akar dengan menggunakan kertas milimeter yang diletakkan di bawah cawan petri. Planlet dikeluarkan dari botol dan diletakkan pada cawan petri, kemudian planlet diluruskan dengan bantuan pinset untuk diukur akarnya. Pengamatan dilakukan di dalam I.A.F.

## H. Bahan dan Cara Kerja

### 1. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain bahan kimia untuk analisis, bahan kimia untuk kultur jaringan (Unsur Hara Makro, Mikro, ZPT, Vitamin) benih dan bibit *E. purpurea*, pupuk organik, pupuk NPK dan perlengkapan panen. Bahan yang diperlukan untuk karakterisasi morfologi antara lain yaitu aksesi tanaman ckinase dan alkohol 70%, sedangkan bahan yang digunakan untuk karakterisasi molekular menggunakan penanda molekular ISSR dan RAPD adalah daun dari aksesi ekinase. Kimikalia yang digunakan dalam penelitian dikelompokkan untuk setiap tahap penelitian yaitu tahap isolasi DNA, kuantifikasi, amplifikasi dan visualisasi. Bahan-bahan untuk isolasi DNA genom: larutan buffer CTAB (3% CTAB, 2% PVP),  $\beta$ -mercapthoethanol, isopropanol, natrium asetat, etanol 70%, etanol absolut, buffer TE, larutan FKI (Fenol:Kloroform:Isoamilalkohol=25:24:1), larutan KI (kloroform:Isoamilalkohol=24:1) dan RNase, selain itu juga digunakan kit isolasi DNA Genelute dari Sigma. Bahan-bahan untuk kuantifikasi: akuabides steril dan DNA genom. Bahan-bahan untuk amplifikasi: PCR mix, aquades steril, DNA template, 10 primer RAPD dan 10 primer ISSR. Bahan-bahan untuk visualisasi: agarosa, parafilm, TBE 1X, ethidium bromide 0,01%, marker DNA 1 kb dan 100 bp, aquades steril dan *loading dye*.

### 2. Cara kerja:

#### a. Budidaya Aksesi

- 1) Penentuan lokasi penanaman, penanaman keturunan masing-masing aksesi *E. purpurea* dilakukan di tempat berbeda tetapi pada keadaan lingkungan yang sama. Untuk mencegah perkawinan silang antar aksesi.
- 2) Penyiapan dan pengolahan lahan: lahan dibersihkan dari gulma lalu dicangkul dan diratakan, dibuat 3 blok yang masing-masing blok berisi 9 petak tanam. Jarak antar blok 100 cm, sedangkan jarak antar petak 50 cm.
- 3) Penanaman: penanaman dilakukan dengan jarak tanam 30 cm x 30 cm, pada setiap lobang tanam diberi 500 gram pupuk organik, dan 3 gram/lobang tanam pupuk NPK

- 4) Penyiangan: dilakukan secara manual atau dengan menggunakan sabit apabila gulma banyak
- 5) Pengairan atau penyiraman: pengairan dilakukan seminggu sekali, sedangkan penyiraman dilakukan melihat kondisi dilahan.
- 6) Panen: dilakukan setelah 75 % populasi yang ditanam sudah mulai berbunga.
- 7) Pengamatan: dilakukan sesuai dengan cara pengumpulan data
- 8) Analisis laboratorium untuk analisa kandungan kimia masing-masing aksesori ekinase

#### **b. Karakterisasi Aksesori**

##### 1). Pengambilan Data Morfologi

Langkah pertama dalam pengambilan data morfologi adalah pemilihan dan pengambilan sampel secara random di kebun penelitian ekinase, tiap aksesori ekinase diambil 5 individu sebagai ulangan. Masing-masing sampel diamati karakter morfologinya baik kualitatif dan kuantitatif pada bagian vegetatif dan generatif tanaman yaitu meliputi organ batang, daun, bunga, buah dan biji. Sampel didokumentasikan dalam bentuk foto dan herbarium kering.

##### 2). Pengambilan data molekular

Pengambilan data molekular adalah pemilihan dan pengambilan sampel secara random, tiap aksesori ekinase diambil 3 individu sebagai ulangan. Langkah-langkah kerja pengambilan data molekular dengan menggunakan penanda molekular ISSR dan RAPD meliputi:

###### a). Isolasi DNA

Daun ekinase dibersihkan dengan akuades dan ditimbang sebanyak 0,1 gram kemudian digerus dalam nitrogen cair sampai halus menggunakan pestel dan mortar kemudian ditambahkan buffer CTAB (3% CTAB, 2% PVP) sebanyak 800  $\mu$ l dan 2%  $\beta$ -mercapthoetanol setelah itu dimasukkan ke dalam tabung 1,5 ml yang selanjutnya diinkubasi pada suhu 65°C selama 60 menit. FKI sebanyak 500  $\mu$ l ditambahkan dan digojog selama 15 menit

hingga terjadi emulsi kemudian disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung baru dan diukur volume pengambilan supernatan kemudian ditambahkan KI sebanyak volume yang sama dengan supernatan dan disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung baru dan diukur volume pengambilan supernatan kemudian ditambahkan natrium asetat sebanyak 0,1 volume supernatan dan isopropanol dingin sebanyak 2/3 volume supernatan. Tabung tersebut digojog perlahan kemudian diinkubasi di *freezer* selama 60 menit, setelah itu disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm, suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan 500 µl etanol 70% dingin kemudian disentrifus pada kecepatan 12.000 rpm, suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang dan endapan dikeringanginkan kemudian pelet diresuspensi dengan penambahan 30 µl buffer TE kemudian ditambahkan 1 µl larutan RNase A. Isolasi DNA menggunakan kit isolasi mengikuti prosedur dalam kit isolasi tersebut.

#### b). Kuantifikasi DNA

##### i). Estimasi konsentrasi DNA secara elektroforetik

Kualitas DNA genom diukur dengan membandingkan kejelasan dan ketebalan pita DNA genom dengan DNA marka pada 0,8% gel elektroforesis.

##### ii). Penentuan konsentrasi DNA dengan spektrofotometri

Larutan DNA genom diencerkan 1000x dengan akuabides. DNA yang telah diencerkan diukur konsentrasi dan nilai OD-nya pada cahaya UV dengan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm ( $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ ). Konsentrasi dan kemurnian DNA genom dihitung dengan rumus :

$$\text{Konsentrasi DNA genom (ng)} : \frac{\lambda_{260} \times 50 \times \text{faktor pengenceran}}{1000}$$

$$\text{Kemurnian DNA genom} : \frac{\lambda_{260}}{\lambda_{280}}$$

Kemurnian DNA dianggap baik apabila nilainya berkisar antara: 1.8-2.

#### c). Amplifikasi (PCR/ *Polymerase Chain Reaction*)

Bahan-bahan untuk amplifikasi PCR dimasukkan dalam PCR *tube* yang meliputi: 2  $\mu$ l Template (30 ng DNA genom), 12,6  $\mu$ l PCR *mix*, 1  $\mu$ l primer (semua primer) 100 mM, kemudian ditambah steril *aquadest* sampai volume 25  $\mu$ l. Campuran reagen-reagen pada PCR *tube* tersebut dimasukkan dalam mesin PCR (*Thermocycler*) dengan program sebagai berikut:

1. Denaturasi I : 94°C 3'
2. Denaturasi II : 94°C 1'
3. *Annealing* : 52°C 1' (tergantung primer)
4. *Elongation* : 72°C 1'30"
5. Kembali ke langkah ke-2 dengan ulangan 44 kali
6. *Extention* : 72°C 8'
7. *Hold* 4°C

Amplifikasi diulang sebanyak 3 kali untuk memastikan reproduisibilitas metode.

d). Visualisasi Hasil PCR/ Elektroforesis

Produk PCR dicek dengan metode elektroforesis pada minigel agarosa 1,8%. Sebanyak 0,396 gram bubuk agarosa dimasukkan dalam erlenmeyer dan ditambahkan 22 ml TBE 1X kemudian dipanaskan di *microwave* selama  $\pm$  45 detik atau agarosa larut sempurna. Larutan dibiarkan setengah dingin kemudian dituang dalam cetakan gel dengan sisir tegak lurus. Gel dibiarkan menjendal dan sisir diangkat kemudian gel direndam dalam bufer TBE 1X. Produk PCR sebanyak 5  $\mu$ l dipipet dan dicampur dengan 1  $\mu$ l *loading dye* (pencampuran dilakukan di atas kertas parafilm dan dalam pipet *tip*) kemudian dimasukkan dalam sumuran gel. Sumuran sebelah kiri diisi dengan *marker*. Elektroda kemudian dihubungkan dengan *power supply* pada voltase 70 volt selama 90-110 menit. Minigel tersebut kemudian direndam dalam ethidium bromide selama 20 menit kemudian visualisasi hasil di bawah sinar UV pada alat *gel documentation*.

e). Analisis data

Data yang diperoleh dari karakter morfologi diberi skor yang ditabulasikan dalam bentuk angka, yaitu 1, 2, 3,..... dan seterusnya. Sifat yang sudah

dalam bentuk angka (numerik) dikelompokkan dalam jangkauan tertentu, sedangkan sifat-sifat yang bersifat deskriptif seperti warna daun dinilai secara numerik dengan memberikan angka-angka yang menggambarkan perbedaan warna yang ada. Setelah itu dilakukan pembakuan terhadap semua sifat yang telah dinilai secara numerik. Data diperoleh dari hasil visualisasi fragmen DNA tiap aksesori ekinase pada primer yang berbeda. Bila terdapat fragmen diberikan skor 1 dan bila tidak terdapat fragmen diberi skor 0. Indeks similaritas karakter morfologi dihitung menggunakan rumus indeks similaritas SSm (*simple matching coefficient*), sedangkan karakter molekular dihitung menggunakan rumus Dice. Indeks similaritas masing-masing karakter kemudian disusun analisis kelompok (*cluster analysis*) menggunakan metode *Sequential Agglomerative Hierarchical Non-overlapping* (SAHN). Konstruksi dendogram dilakukan dengan menggunakan metode *Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Mean* (UPGMA). Analisis data ini dilakukan dengan menggunakan *software* NTSYS ver. 2.02.

### c. Pembibitan *Echinacea purpurea* L. Secara *In Vitro*

#### 1). Pembuatan Larutan Stok

Media yang digunakan adalah media dasar MS yang mengandung hara makro dan mikro. Media dikelompokkan menjadi beberapa stok dengan kode sebagai berikut: (A) nitratos ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  41,25 g dan  $\text{KNO}_3$  47,5 g); (B) sulfates ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  9,25 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2150 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,5575 g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,0006 g); (C) holidos ( $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  11g, KI 0,0208 g,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,0006 g); (D) P-B-Mo ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4,25 g,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,155 g,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,0063 g); (E) Fe-EDTA ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,6950 g,  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  0,9325 g); (F) garam organik (tiamin-HCl 0,0025 g, asam nikotinat 0,0125 g, piridoksin-HCl 0,0125 g, glisin 0,05 g) dan (G) mioinositol 2,5 g. Masing-masing bahan kimia ditimbang lalu dilarutkan dalam 100 ml akuades steril. Setelah semua bahan larut, ditambahkan akuades hingga volume 250 ml kemudian masing-masing diberi label nitratos, sulfatos, holidos, P-BMO, Fe-

EDTA, garam organik dan mioinositol sesuai dengan kelompoknya. Untuk BAP ditimbang 100 mg dan dilarutkan dengan NaOH 1 N, ditambahkan akuades steril hingga volume 100 ml. Semua larutan stok disimpan dalam *refrigerator*.

## 2). Pembuatan media

Media yang digunakan pada tahap inisiasi dan tahap multiplikasi adalah media MS yang telah dimodifikasi dengan penambahan Zat Pengatur Tumbuh IBA, BAP, NAA dan Giberelin. Untuk pembuatan media, senyawa makronutrient, myo-inositol dan sukrosa ditimbang dan dilarutkan ke dalam erlenmeyer. Kemudian ditambahkan larutan mikronutrient, vitamin, Fe, Na-EDTA dan zat pengatur tumbuh sesuai perlakuan yang dibuat dalam larutan stok.

Keasaman larutan disesuaikan pH-nya sekitar 5,7 dengan bantuan HCl 0,1 N atau KOH 0,1 N. Tambahkan agar dan panaskan di atas *hot plate* dengan dibantu *magnetic stirer* sebagai pengaduk sampai larutan jernih dan mendidih.

Media yang sudah dimasukkan ke dalam botol-botol kultur dengan volume masing-masing lebih kurang 20 ml, mulut botol ditutup aluminium foil dan dilapisi plastik kemudian diikat dengan gelang karet. Kemudian botol-botol itu disterilkan dengan otoklaf pada tekanan 1,5 atm, suhu 121<sup>o</sup> C selama 15 menit, lalu disimpan dalam ruangan dengan suhu kamar 23 – 28<sup>o</sup> C.

## 3). Sterilisasi dan penanaman eksplan

Daun *E. purpurea* dicuci dengan air mengalir, direndam dalam larutan agrept selama 3 menit, dalam larutan Dithane 3 menit dan dalam larutan Clorox selama 3 menit kemudian dibilas dengan aquadest steril sebanyak 3 kali lalu dibawa ke *Laminar Air Flow* (LAF).

## 4). Penanaman eksplan

Eksplan yang digunakan adalah bagian daun *E. purpurea*, eksplan tersebut ditanam dalam botol kultur yang berisi media MS yang dimodifikasi dan zat pengatur tumbuh sesuai dengan perlakuan, lalu diinkubasi di ruang kultur yang suhunya dipertahankan antara 23<sup>o</sup>-28<sup>o</sup> C.

#### **d. Penentuan Kadar Fenol Total**

##### ***Pembuatan Reagen***

a. Pembuatan larutan induk asam galat ( 5 mg/ml) (Waterhouse, A, 1999) Ditimbang 0,25 g asam galat tambahkan 5 ml etanol 96 % tambahkan aquabidest sampai 50 ml.

b.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20 % (Waterhouse A,1999) Ditimbang 5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dan tambahkan 20 ml aquabidest lalu dididihkan kemudian diamkan selama 24 jam, saring dan encerkan dengan aquabidest sampai 25 ml.

c. Reagent Folin-ciocalteau (Muruganathan, 2008). Dibuat larutan reagen Folin-ciocalteau (RFC) 1:2 dalam aquadest.

##### ***d. Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam Galat dengan Reagen Fenol Folin – Ciocalteu (Waterhouse A,1999)***

d.1 Pembuatan larutan induk asam galat (5 mg/ml) Timbang 0,25 g asam galat tambahkan 5 ml etanol 96 % tambahkan aquabidest sampai 50 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 5 mg/ml.

Dari larutan induk dipipet 6, 8, 10, 12, 14 ml dan diencerkan dengan aquabidest sampai volume 100 ml. sehingga dihasilkan dengan konsentrasi 300, 400, 500, 600, dan 700 mg/L asam galat.

Dari masing-masing konsentrasi diatas dipipet 0.2 ml tambah 15,8 ml aquabidest ditambah 1

ml Reagen Folin Ciocalteu kocok. Diamkan selama 8 menit tambah 3 ml larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  kocok homogen. Diamkan selama 2 jam pada suhu kamar. Ukur serapan pada panjang gelombang serapan maksimum 765 nm, lalu buat kurva kalibrasinya hubungan antara konsentrasi asam galat (mg/L) dengan absorban.

d.2. *Penentuan Kandungan Fenol Total dengan Metoda Folin –Ciocalteu (Orak, H.H, 2006)* Ditimbang 0,3 gram ekstrak kemudian dilarutkan sampai 10 ml dengan metanol : air (1 : 1). Dipipet 0,2 ml larutan ekstrak dan tambahkan 15,8 ml aquabidest tambahkan 1 ml reagen Folin – Ciocalteu kocok. Diamkan selama 8 menit kemudian tambahkan 3 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20 % kedalam campuran, diatkan larutan selama 2 jam pada suhu kamar. Ukur serapannya dengan

spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang serapan maksimum 765 nm yang akan memberikan kompleks biru. Lakukan 3 kali pengulangan sehingga kadar fenol yang diperoleh hasilnya didapat sebagai mg ekuivalen asam galat/g sampel segar.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. KARAKTER MORFOLOGI

Tiga aksesori pilihan ekinase yaitu aksesori BH2, BHU3 dan BHU5 yang ditanam di masing-masing lahan penelitian masih menunjukkan adanya variasi dan keturunan pertama (F1) yang mempunyai sifat morfologi yang sama dengan induknya masih rendah. Aksesori BH2 mempunyai kemurnian keturunan sebesar 13,6% dari total populasi aksesori BH2 yang ditanam, sedangkan kemurnian keturunan aksesori BHU3 sebesar 18% dan BHU5 sebesar 24%.

Keturunan F1 dari aksesori BH2 menunjukkan adanya keragaman, terdapat 6 varian dari F1 aksesori ini berdasarkan karakter morfologi dan 2 varian dari keturunan BHU3. Karakter morfologi yang dapat digunakan untuk membedakan varian aksesori tersebut (polimorfik) sebanyak 23 karakter, 19 diantaranya merupakan karakter dari perbungaan. Jones dan Luchsinger (1986) menyatakan ciri morfologi bunga merupakan ciri-ciri yang paling penting dalam klasifikasi tumbuhan berbunga. Ciri tersebut mudah diamati dan praktis digunakan dalam pembuatan kunci dan pendeskripsian. Lebih lanjut dinyatakan bahwa ciri-ciri generatif ideal untuk mencirikan kelompok taksonomi karena konstan, lebih banyak jumlahnya dan menyediakan lebih banyak karakter untuk perbedaan taksonomi. Berikut adalah varian-varian dari F1 aksesori BH2 dan BHU3:

#### 1. F1 aksesori BH2 Varian A (BH2-Va)

Tinggi tanaman mencapai 82 cm, batang hijau keunguan. Daun bulat telur memanjang, tepi daun bergigi-bergerigi jarang, rasio panjang: lebar daun=4-5:1. Filaris 3-4, rapat, melengkung. Reseptakel bentuk segitiga, tepi ungu tua. Bunga tepi berjumlah 18-21, warna merah muda tk.2. rapat, bentuk bulat telur memanjang, rasio panjang: lebar=5:1, ujung berlekuk 3, posisi bunga tepi terhadap ibu tangkai bunga 90°. Warna bunga saat kuncup merah (Gambar 1).



(A)



(B)

Gambar 1. Morfologi bunga ekinase aksesori F1 BH2 varian A (BH2-Va) pada lahan di ketinggian 1200 mdpl; A. Bunga mekar, B. Kuncup

### 2. F1 aksesori BH2 Varian B (BH2-Vb)

Tinggi tanaman mencapai 50 cm, batang hijau keunguan. Daun bulat telur, tepi daun hampir rata, rasio panjang: lebar daun=4:1. Filaris 3, tidak rapat, menyebar. Reseptakel bentuk segitiga, tepi putih. Bunga tepi berjumlah 17-19, warna merah muda tk.1, jarang, bentuk sudip/bulat telur terbalik, rasio panjang: lebar=3-3,5:1, ujung bercangap 2, posisi bunga tepi terhadap ibu tangkai bunga 80-90°. Warna bunga saat kuncup merah tua (Gambar 2).



(A)



(B)

Gambar 2. Morfologi bunga ekinase aksesori F1 BH2 varian B (BH2-Vb) pada lahan di ketinggian 1200 mdpl; A. Bunga mekar, B. Kuncup

### 3. F1 aksesori BH2 Varian C (BH2-Vc)

Tinggi tanaman mencapai 95 cm, batang ungu kehijauan. Daun bulat telur, tepi daun hampir rata, rasio panjang: lebar daun=4:1. Filaris 3-4, rapat, melengkung. Reseptakel bentuk segitiga, tepi ungu tua. Bunga tepi berjumlah 15-18, warna merah muda, jarang, bentuk bulat telur terbalik, rasio panjang: lebar=3,5-4:1, ujung bergerigi 3, posisi bunga tepi terhadap

ibu tangkai bunga 80-90°. Warna bunga saat kuncup merah tua (Gambar 3).



(A)



(B)

Gambar 3. Morfologi bunga ekinase aksesi F1 BH2 varian C (BH2-Vc) pada lahan di ketinggian 1200 mdpl; A. Bunga mekar, B. Kuncup

#### 4. F1 aksesi BH2 Varian D (BH2-Vd)

Tinggi tanaman mencapai 80 cm, batang hijau kemerahan. Daun bulat telur, tepi daun bergerigi-bercangap, rasio panjang: lebar daun=4:1. Filaris 3, rapat, melengkung. Reseptakel bentuk segitiga, tepi ungu muda. Bunga tepi berjumlah 19-21, warna merah muda, rapat, bentuk lanset, rasio panjang: lebar=3-4:1, ujung bergerigi 2, posisi bunga tepi terhadap ibu tangkai bunga 80-90°. Warna bunga saat kuncup merah muda cerah (Gambar 4).



(A)



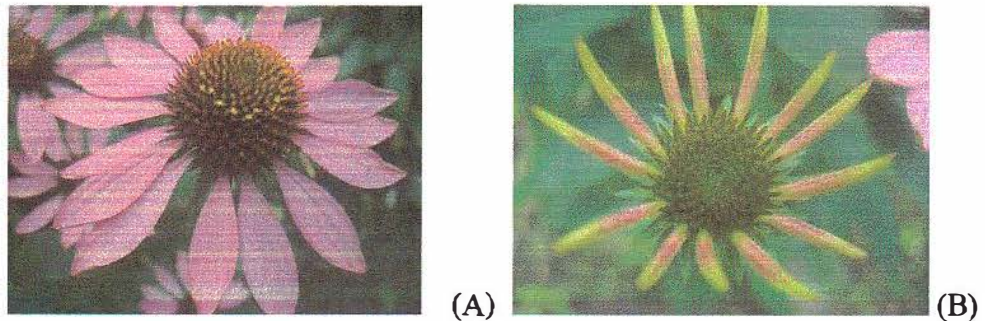
(B)

Gambar 4. Morfologi bunga ekinase aksesi F1 BH2 varian D (BH2-Vd) pada lahan di ketinggian 1200 mdpl; A. Bunga mekar, B. Kuncup

#### 5. F1 aksesi BH2 Varian E (BH2-Ve)

Tinggi tanaman mencapai 70 cm, batang hijau. Daun bulat telur memanjang, tepi daun rata, rasio panjang: lebar daun=3-4:1. Filaris 2-3,

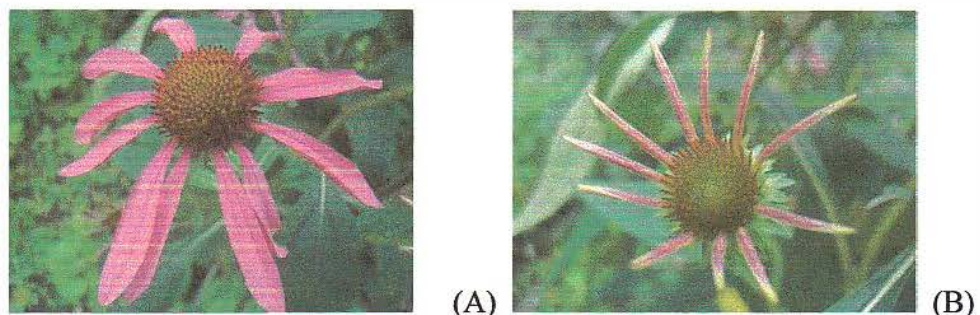
tidak rapat, melengkung. Reseptakel bentuk segitiga, tepi putih. Bunga tepi berjumlah 13-17, warna merah muda, jarang, bentuk oval-bulat telur terbalik, rasio panjang: lebar=3-3,5:1, ujung bergerigi 2, melipat, posisi bunga tepi terhadap ibu tangkai bunga 80-95°. Warna bunga saat kuncup hijau kemerahan (Gambar 5).



Gambar 5. Morfologi bunga ekinase aksesori F1 BH2 varian E (BH2-Ve) pada lahan di ketinggian 1200 mdpl; A. Bunga mekar, B. Kuncup

#### 6. F1 aksesori BH2 Varian F (BH2-Vf)

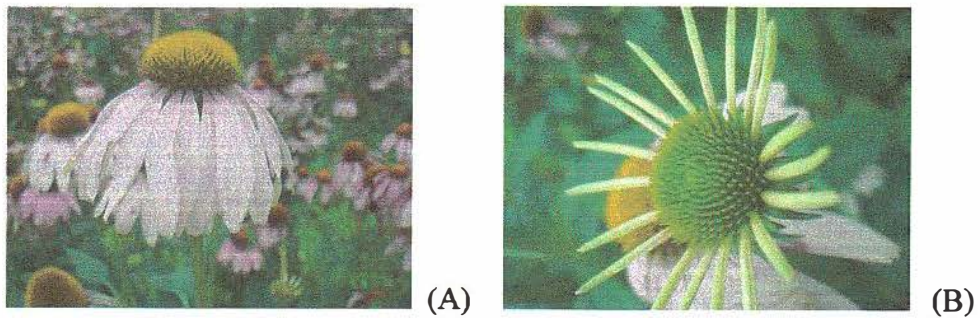
Tinggi tanaman mencapai 60 cm, batang hijau. Daun bulat telur memanjang, tepi daun bergerigi, rasio panjang: lebar daun=4-4,5:1. Filaris 3-4, rapat, melengkung. Reseptakel bentuk membulat, tepi ungu muda. Bunga tepi berjumlah 12-13, warna merah muda tk.2, jarang, bentuk lanset, rasio panjang: lebar=6:1, ujung berlekuk 2, posisi bunga tepi terhadap ibu tangkai bunga 60-80°. Warna bunga saat kuncup hijau kemerahan (Gambar 6).



Gambar 6. Morfologi bunga ekinase aksesori F1 BH2 varian F (BH2-Vf) pada lahan di ketinggian 1200 mdpl; A. Bunga mekar, B. Kuncup

#### 7. F1 aksesori BHU3 Varian A (BHU3-Va)

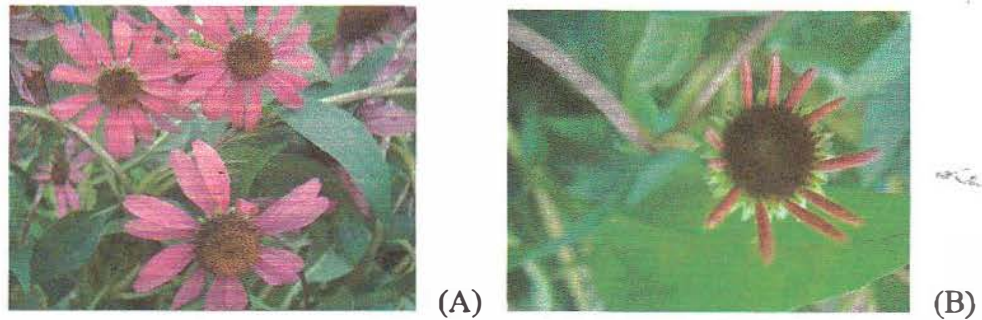
Tinggi tanaman mencapai 80 cm, batang hijau. Daun bulat telur memanjang, tepi daun berlekuk-bergerigi, rasio panjang: lebar daun=3-4:1. Filaris 3, rapat, menyebar. Reseptakel bentuk membulat, tepi ungu muda. Bunga tepi berjumlah 18-21, warna merah muda pucat-putih, rapat, bentuk oval, rasio panjang: lebar=4,5-5:1, ujung berlekuk 2, posisi bunga tepi terhadap ibu tangkai bunga 50°. Warna bunga saat kuncup hijau (Gambar 7).



Gambar 7. Morfologi bunga ekinase aksesori F1 BHU3 varian A (BHU3-Va) pada lahan di ketinggian 1200 mdpl; A. Bungamekar, B. Kuncup

#### 8. F1 aksesori BHU3 Varian B (BHU3-Vb)

Tinggi tanaman mencapai 80 cm, batang hijau keunguan. Daun bulat telur memanjang, tepi daun rata, rasio panjang: lebar daun=4:1. Filaris 3, rapat, menyebar. Reseptakel bentuk segitiga, tepi ungu muda. Bunga tepi berjumlah 13-19, warna merah muda tk.2, jarang, bentuk oval, rasio panjang: lebar=3,5-4:1, ujung berlekuk 2, posisi bunga tepi terhadap ibu tangkai bunga 90°. Wama bunga saat kuncup merah (Gambar 8).



Gambar 8. Morfologi bunga ekinase aksesori F1 BHU3 varian B (BHU3-Vb) pada lahan di ketinggian 1200 mdpl; A. Bunga mekar, B. Kuncup

Variasi morfologi ekinase juga ditemukan di Jerman sebanyak 7 aksesori ekinase (Banga *et al.*, 2010) dan sebanyak 9 genotip ekinase yang juga diteliti di Jerman (Varban *et al.*, 2010). Karakter morfologi lainnya yang diamati adalah karakter tumbuh, berikut data tumbuh 11 aksesori ekinase sebelum panen:

Tabel 1. Data tumbuh 11 aksesori ekinase sebelum panen

no	Kode Aksesori	Karakter				
		Tinggi (cm)	Lebar Tajuk (cm)	Jumlah Kuntum Bunga	Jumlah anakan	panjang akar (cm)
1	BH2 D	88	50	36	11	22,5
2	BH2 VA	92	59	47	7	27
3	BH2 VB	48	38	13	11	23,5
4	BH2 VC	106	64	102	8	27,5
5	BH2 VD	87	45	29	10	25
6	BH2 VE	83	65	34	5	22
7	BH2 VF	88	55	71	15	26,5
8	BHU3 D	102	78	66	13	34
9	BHU3 VA	114	77	45	15	28
10	BHU3 VB	104	74	62	14	27,5
11	BHU5 G	103	59	72	15	29

Langkah pertama untuk pengembangan kultivar adalah dengan karakterisasi aksesori, cara yang paling mudah adalah dengan menggunakan karakter morfologi. Karakter morfologi mudah dan cepat untuk diamati tetapi karakter morfologi mempunyai kelemahan yaitu dipengaruhi oleh faktor luar atau

faktor lingkungan. Pengelompokan berdasarkan karakter morfologi dapat diperkuat dengan menggunakan karakter lainnya antara lain yaitu karakter molekular dan fitokimia. Pengetahuan tentang keanekaragaman genetik pada spesies tanaman budidaya sangat penting untuk peningkatan kualitas. Karakter molekular, fitokimia dan morfologi digunakan untuk karakterisasi keanekaragaman genetik interspesies dan intraspesies tanaman budidaya (Ozkaya *et al.*, 2006)

## **B. KARAKTER MOLEKULAR**

Selain berdasarkan karakter morfologi, Fl tiga aksesori dan varian-varianya juga dilihat berdasarkan karakter molekular untuk melihat ada tidaknya keragaman genetik. Untuk mendapatkan karakter molekular dengan menggunakan penanda molekular ISSR, langkah pertama yang harus dilakukan adalah isolasi DNA genom masing-masing aksesori ekinase. Metode yang digunakan untuk isolasi DNA genom adalah dengan menggunakan metode CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*). Ekinase mengandung senyawa-senyawa metabolit sekunder salah satunya polifenol yang akan mengganggu dalam isolasi DNA. Penambahan PVP (*polyvinylpyrrolidone*) bertujuan untuk mengikat protein terutama polifenol oksidase yang dapat mengoksidasi senyawa fenolik pada sampel dan berikatan dengan DNA yang menyebabkan warna coklat serta mendegradasi DNA. Senyawa fenol akan diikat oleh PVP yang ditambahkan pada buffer ekstraksi (Vaze *et al.*, 2010).

Kuantifikasi DNA genom ekinase dengan metode spektrofotometri mempunyai kemurnian 1,54-1,68. Nilai tersebut menunjukkan bahwa DNA genom mempunyai kemurnian yang cukup tinggi. Berikut adalah hasil isolasi DNA genom ekinase menggunakan metode CTAB:



Gambar 9. DNA genom F1 tiga aksesori ekinase (BH2, BHU3 dan BHU5) menggunakan metode CTAB

Dari gambar 9 tersebut menunjukkan pita DNA yang bersih dan tebal, walaupun masih ada kontaminan yang kemungkinan senyawa fenol dan polisakarida, akan tetapi tidak dapat diamplifikasi (PCR) atau tidak terbentuk fragmen-fragmen DNA. Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena RNA dalam genom masih ada dan selain itu daun yang digunakan sudah terlalu tua sehingga DNA yang dihasilkan sangat sedikit. Oleh karena itu digunakan kit isolasi DNA, berikut hasil isolasi DNA menggunakan kit:



Gambar 10. DNA genom F1 aksesori ekinase menggunakan kit isolasi DNA; L-1:Ladder1 kb, 1: aksesori F1-BH2, 2: aksesori F1-BHU3, 3: aksesori F1-

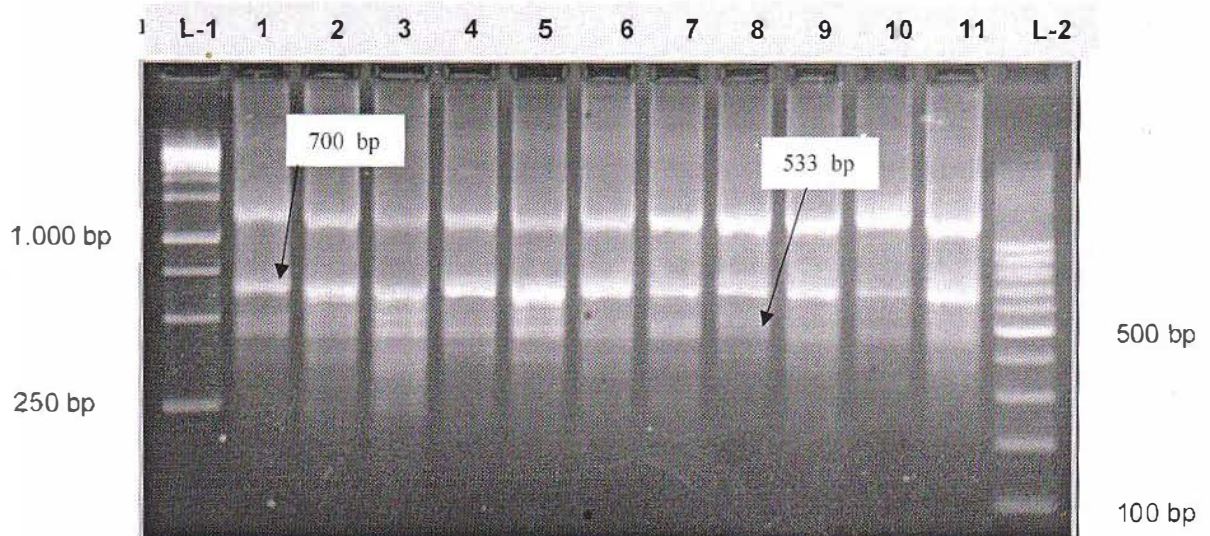
BHU5, 4-9: aksesi F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, 10-11: aksesi F1-BHU3-Va dan Vb

Amplifikasi DNA menggunakan 10 primer ISSR dan 10 primer RAPD harus dilakukan optimasi masing-masing primer terutama *annealing temperature* yang optimal dan konsentrasi primer. Berikut daftar primer ISSR dan RAPD yang digunakan dan hasil optimasi *annealing temperature* masing-masing primer:

Tabel 2. Primer ISSR dan RAPD serta *annealing temperature* (Ta) optimal yang digunakan untuk amplifikasi

No	Oligo Name (Primer)	Sequence	Annealing Temperature (Ta) °C Optimal
1	UBC-866	(CTC)5	58
2	UBC-834	(AG)8YT	54
3	UBC-876	(GATA)4	36
4	UBC-807	(AG)8T	54
5	UBC-825	(AC)8T	53
6	UBC-812	(GA)8A	53
7	A830241	(ACTG)5	53
8	UBC-872	(CAG)5	52
9	17898B	(CA)6GT	52
10	UBC-814	(CT)8TG	52
11	OPA-6	GGTCCCTGAC	-
12	OPA-10	GTGATCGCAG	36
13	OPA-16	AGCCAGCGAA	37
14	OPA-17	GACCGCTTGT	36
15	OPA-18	AGGTGACCGT	36
16	OPA-19	CAAACGTCGG	35
17	OPB-4	GGA CTGGAGT	36
18	OPE-5	TCAGGGAGGT	35
19	OPE-6	AAGACCCCTC	36
20	OPH-13	GACGCCACAC	36

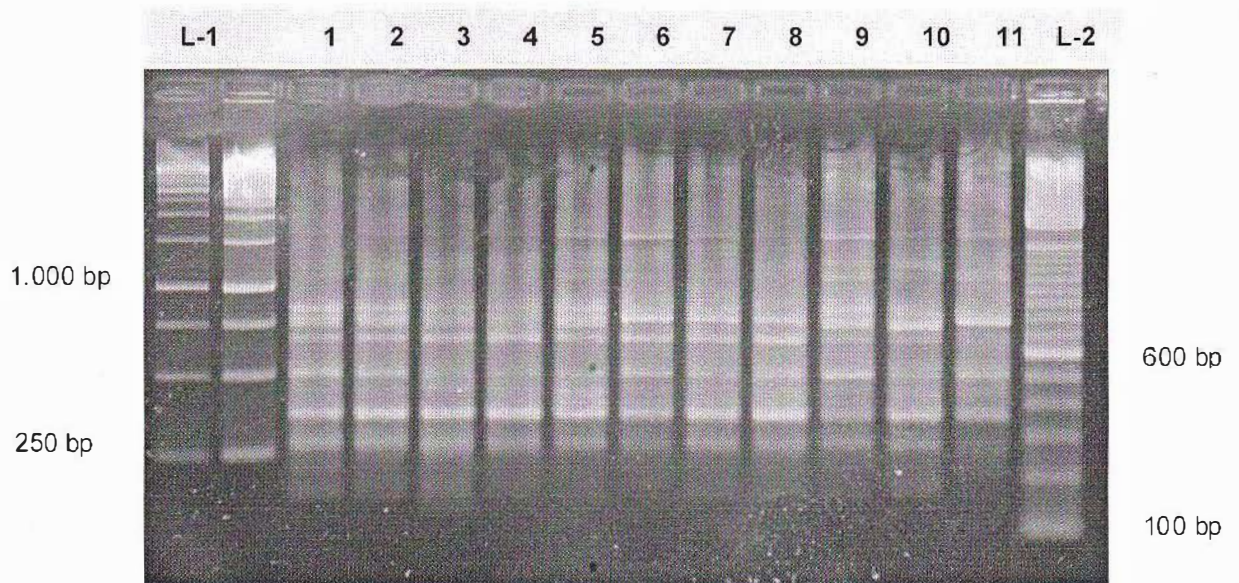
Tiap primer ISSR mempunyai *annealing temperature* ( $T_a$ ) yang spesifik dan umumnya selalu lebih tinggi dari  $T_m$  karena dibutuhkan kekuatan (*stringency*) untuk memfasilitasi primer menempel pada *template* (Oliviera *et al.*, 2010). Jabbarzadeh *et al.* (2010) menyatakan bahwa  $T_a$  yang optimal untuk hibridisasi adalah  $2^\circ - 14^\circ\text{C}$  lebih tinggi dari pada  $T_m$ . Dalam penelitian ini dilakukan optimasi untuk memperoleh nilai  $T_a$  yang optimal pada ketujuh primer ISSR dan nilai  $T_a$  lebih tinggi dari pada  $T_m$ . Jika nilai  $T_a$  terlalu rendah maka primer akan menempel di sembarang tempat dan menghasilkan fragmen DNA yang tidak diinginkan, akan tetapi bila nilai  $T_a$  terlalu tinggi maka fragmen yang teramplifikasi sedikit dan tidak sempurna (Oliviera *et al.*, 2010). *Annealing temperature* lebih tinggi dan primer dengan panjang basa 16-18 menghasilkan lebih banyak pita atau fragmen polimorfik yang reliabel dan reproduibel apabila dibandingkan dengan penanda molekular RAPD (Mohsen dan Ali, 2008; Wahyuni *et al.*, 2004). Berikut hasil amplifikasi F1 aksesi ekinase dan variannya:



Gambar 11. Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR UBC-866: 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

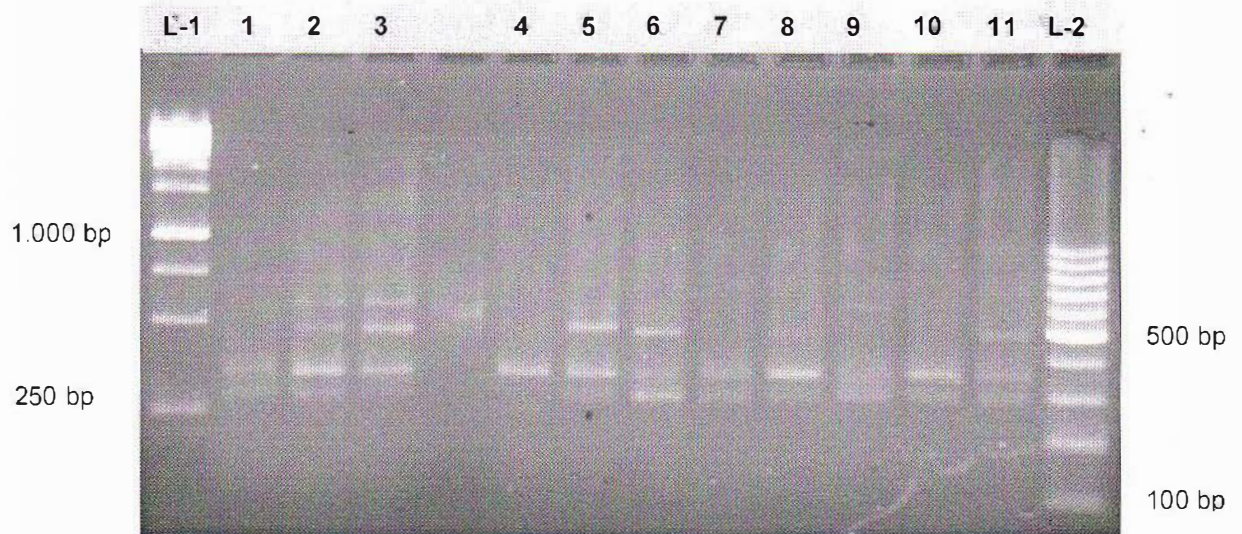
Berdasarkan Gambar 11 dapat diketahui fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan primer UBC-866 pada 11 aksesi ekinase menghasilkan 10 fragmen berukuran 387-1350 bp. Terdapat 2 fragmen DNA spesifik yang dimiliki oleh dua

aksesi ekinase yaitu fragmen berukuran 700 bp pada aksesori BH2 dan 533 bp pada aksesori BH2-Ve. Fragmen DNA tersebut dapat dijadikan acuan untuk identifikasi aksesori ekinase bila diamplifikasi menggunakan primer UBC-866.



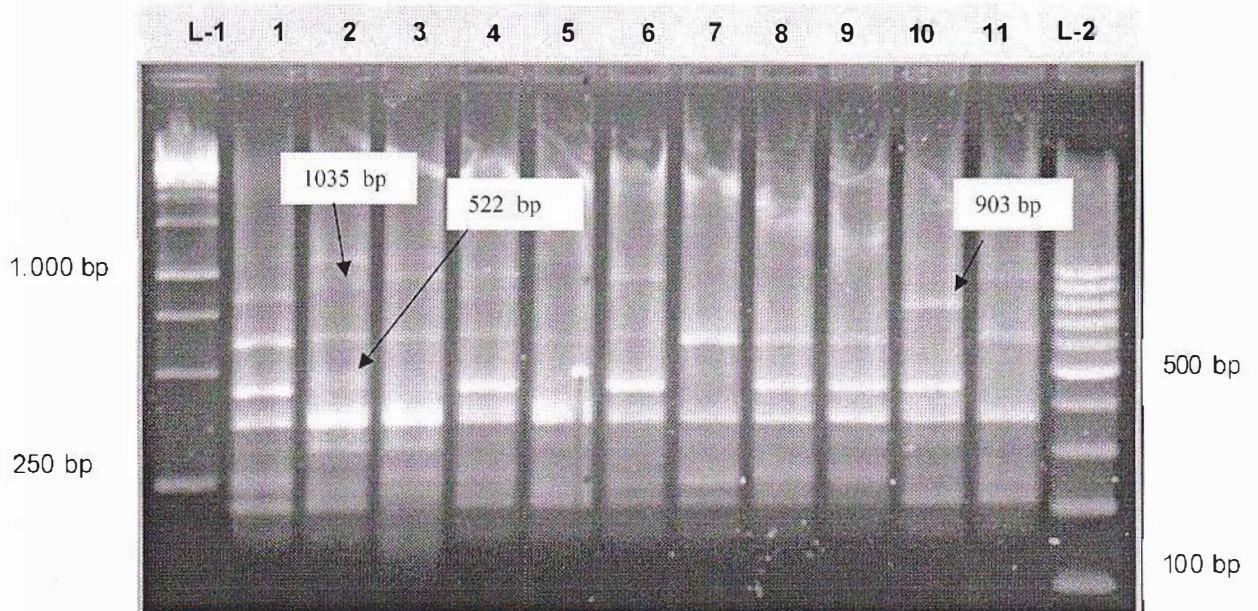
Gambar 12. Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR UBC-834: L-1:Ladder1 kb, 1: aksesori F1-BH2, 2: aksesori F1-BHU3, 3: aksesori F1-BHU5, 4-9: aksesori F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, 10-11: aksesori F1-BHU3-Va dan Vb, L-2: Ladder 100 bp

Berdasarkan Gambar 12 dapat diketahui fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan primer UBC-834 pada 11 aksesori ekinase menghasilkan 11 fragmen berukuran 281 bp-1743 bp.



Gambar 13. Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR UBC-872: L-1:Ladder 1 kb, 1: aksessi F1-BH2, 2: aksessi F1-BHU3, 3: aksessi F1-BHU5, 4-9: aksessi F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, 10-11: aksessi F1-BHU3-Va dan Vb, L-2: Ladder 100 bp

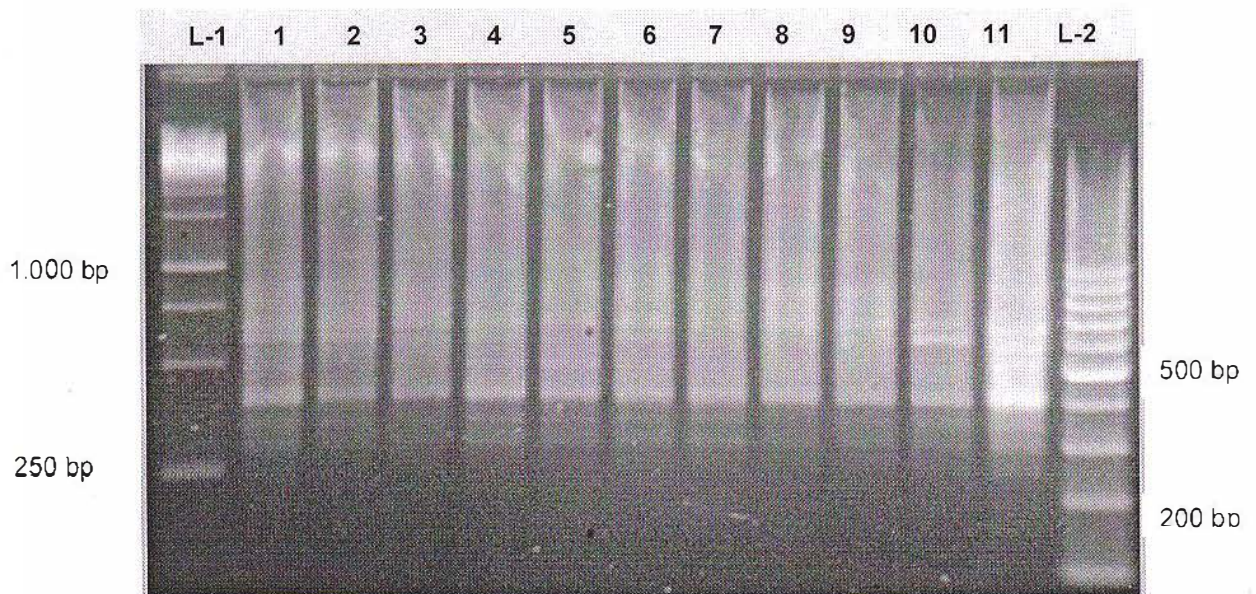
Berdasarkan Gambar 13 dapat diketahui fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan primer UBC-872 pada 11 aksessi ekinase menghasilkan 4 fragmen berukuran 288-607 bp.



Gambar 14. Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR UBC-807: L-1:Ladder 1 kb, 1: aksessi F1-BH2, 2: aksessi F1-BHU3, 3:

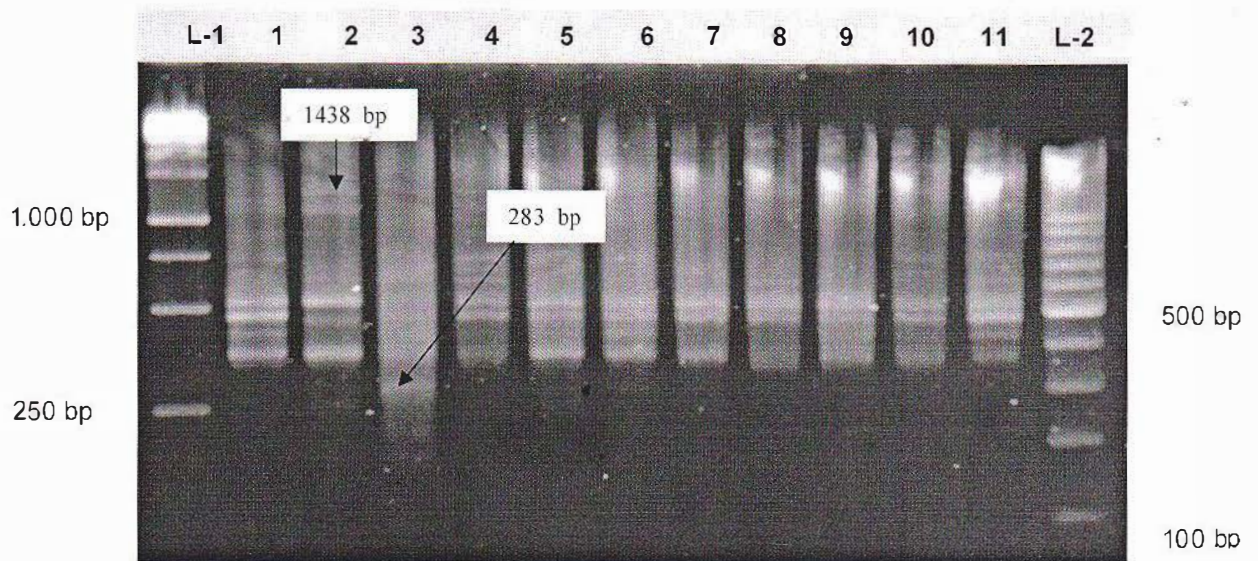
aksesi F1-BHU5, 4-9: aksesii F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, 10-11: aksesii F1-BHU3-Va dan Vb, L-2: Ladder 100 bp

Berdasarkan Gambar 14 dapat diketahui fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan primer UBC-807 pada 11 aksesii ekinase menghasilkan 13 fragmen berukuran 192-1242 bp. Terdapat 3 fragmen DNA spesifik yang dimiliki oleh dua aksesii ekinase yaitu fragmen berukuran 1035 bp dan 522 bp pada aksesii BHU3 dan 903 bp pada aksesii BHU3-Va. Fragmen DNA tersebut dapat dijadikan acuan untuk identifikasi aksesii ekinase bila diamplifikasi menggunakan primer UBC-807.



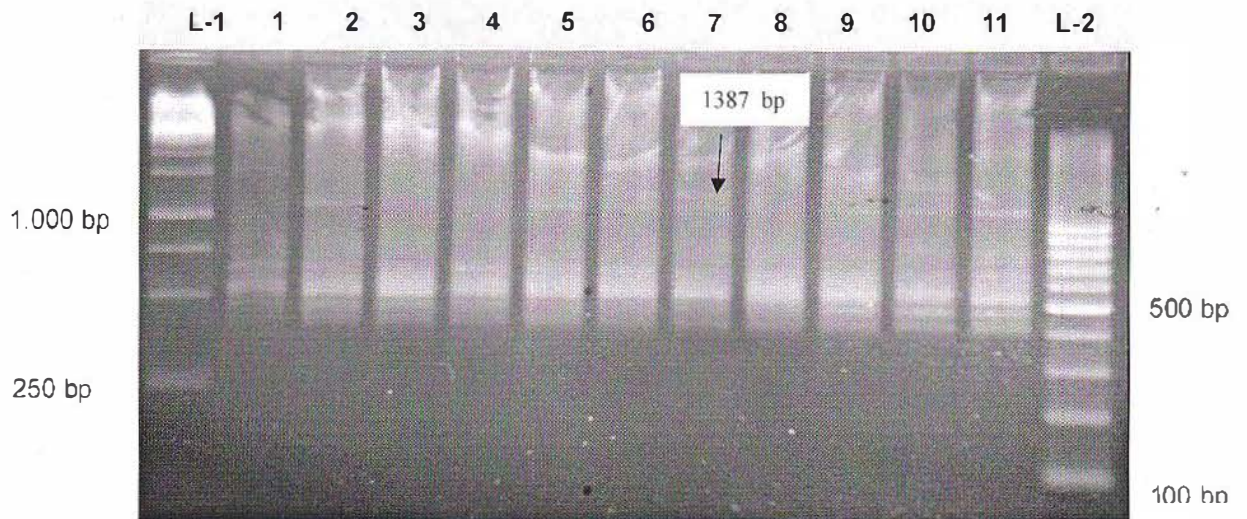
Gambar 15. Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR UBC-825: L-1:Ladder1 kb, 1: aksesii F1-BH2, 2: aksesii F1-BHU3, 3: aksesii F1-BHU5, 4-9: aksesii F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, 10-11: aksesii F1-BHU3-Va dan Vb, L-2: Ladder 100 bp

Berdasarkan Gambar 15 dapat diketahui fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan primer UBC-825 pada 11 aksesii ekinase menghasilkan 8 fragmen berukuran 301-932 bp.



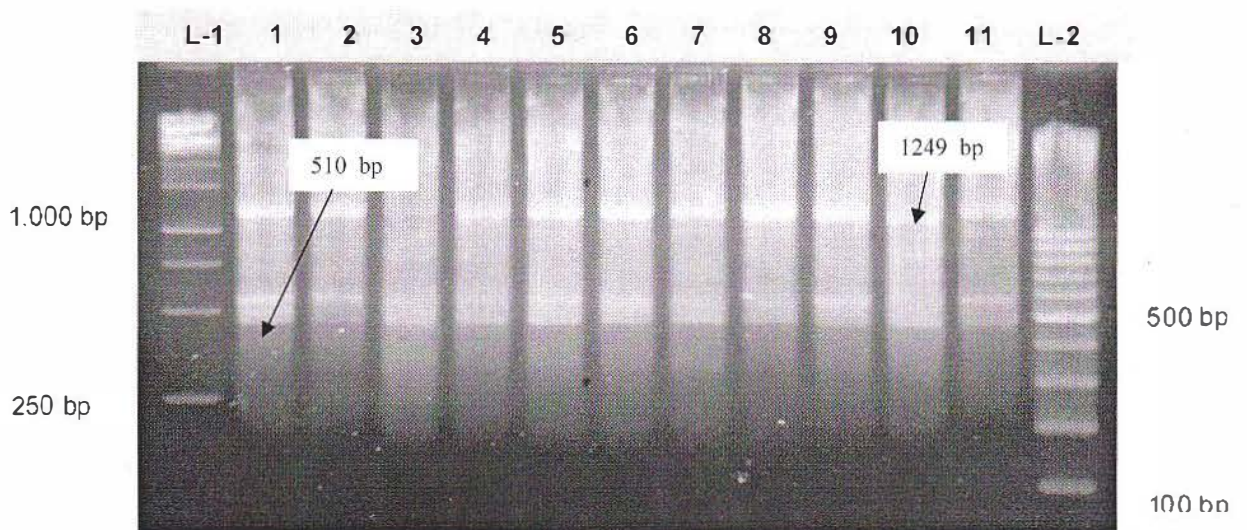
Gambar 16. Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR UBC-812: L-1:Ladder1 kb, 1: aksesii F1-BH2, 2: aksesii F1-BHU3, 3: aksesii F1-BHU5, 4-9: aksesii F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, 10-11: aksesii F1-BHU3-Va dan Vb, L-2: Ladder 100 bp

Berdasarkan Gambar 16 dapat diketahui fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan primer UBC-812 pada 11 aksesii ekinase menghasilkan 11 fragmen berukuran 283-1438 bp. Terdapat 2 fragmen DNA spesifik yang dimiliki oleh dua aksesii ekinase yaitu fragmen berukuran 1438 bp pada aksesii BHU3 dan 283 bp pada aksesii BHU5. Fragmen DNA tersebut dapat dijadikan acuan untuk identifikasi aksesii ekinase bila diamplifikasi menggunakan primer UBC-812.



Gambar 17. Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR A830241: L-1:Ladder1 kb, 1: aksesi F1-BH2, 2: aksesi F1-BHU3, 3: aksesi F1-BHU5, 4-9: aksesi F1-BI12-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, 10-11: aksesi F1-BHU3-Va dan Vb, L-2: Ladder 100 bp

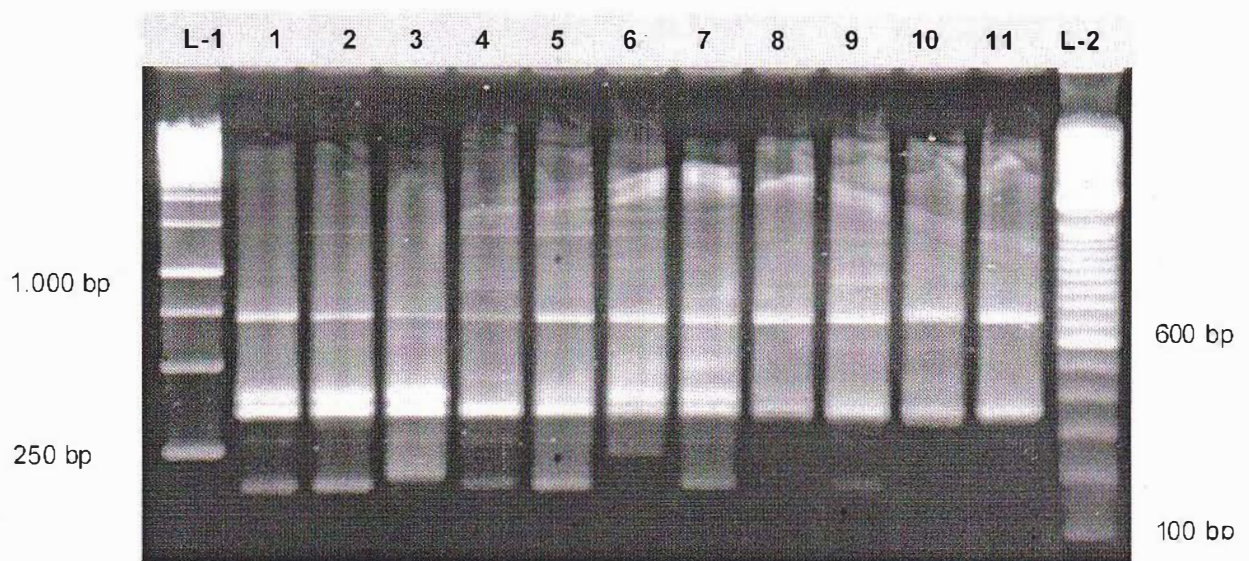
Berdasarkan Gambar 17 dapat diketahui fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan primer A830241 pada 11 aksesi ckinase menghasilkan 9 fragmen berukuran 439-1512 bp. Terdapat 1 fragmen DNA spesifik yang dimiliki oleh aksesi BH2-Vd yaitu fragmen DNA berukuran 1387 bp. Fragmen DNA tersebut dapat dijadikan acuan untuk identifikasi aksesi ekinase bila diamplifikasi menggunakan primer A830241.



Gambar 18. Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR (CAG)5: L-1:Ladder1 kb, 1: aksesi F1-BH2, 2: aksesi F1-BHU3, 3:

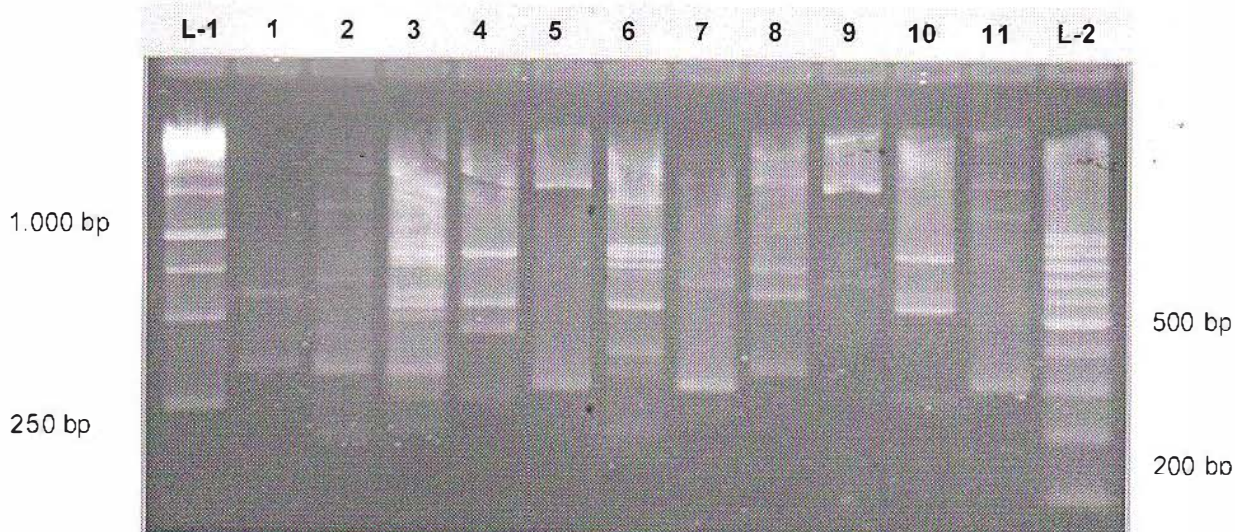
aksesi F1-BHU5, 4-9: aksesii F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, 10-11: aksesii F1-BHU3-Va dan Vb, L-2: Ladder 100 bp

Berdasarkan Gambar 18 dapat diketahui fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan primer (CAG)5 pada 11 aksesii ekinase menghasilkan 8 fragmen berukuran 467-1285 bp. Terdapat 2 fragmen DNA spesifik yang dimiliki oleh dua aksesii ekinase yaitu fragmen berukuran 510 bp pada aksesii BH2 dan 1249 bp pada aksesii BHU3-Va. Fragmen DNA tersebut dapat dijadikan acuan untuk identifikasi aksesii ekinase bila diamplifikasi menggunakan primer (CAG)5.



Gambar 19. Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR 17898B: L-1:Ladder1 kb, 1: aksesii F1-BH2, 2: aksesii F1-BHU3, 3: aksesii F1-BHU5, 4-9: aksesii F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, 10-11: aksesii F1-BHU3-Va dan Vb, L-2: Ladder 100 bp

Berdasarkan Gambar 19 dapat diketahui fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan primer 17898B pada 11 aksesii ekinase menghasilkan 16 fragmen berukuran 170-1903 bp. Terdapat 7 fragmen DNA spesifik yang dimiliki oleh lima aksesii ekinase yaitu fragmen berukuran 1903 bp pada aksesii BH2-Vb, 507 bp pada aksesii BH2-Vd, 439 pada aksesii BH2-Va, 415 pada aksesii BHU3-Va, sedangkan 3 fragmen spesifik dimiliki oleh aksesii BHU5 yaitu 638bp, 262 bp dan 196 bp. Fragmen DNA tersebut dapat dijadikan acuan untuk identifikasi aksesii ekinase bila diamplifikasi menggunakan primer 17898B.



Gambar 20. Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR 814: L-1:Ladder1 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

Berdasarkan Gambar 20 dapat diketahui fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan primer 814 pada 11 aksesi ekinase menghasilkan 18 fragmen berukuran 230-1753 bp. Terdapat 3 fragmen DNA spesifik yang hanya dimiliki oleh aksesi ekinase BH2-Vc yaitu fragmen berukuran 1540 bp, 878 bp dan 439 bp. Fragmen DNA tersebut dapat dijadikan acuan untuk identifikasi aksesi ekinase bila diamplifikasi menggunakan primer 814.

Hasil penelitian ini menunjukkan semua primer ISSR dapat mengamplifikasi dan menghasilkan fragmen DNA dengan jumlah  $\geq 4$  fragmen DNA tiap primer. Jumlah total fragmen DNA yang teramplifikasi dan prosentase fragmen DNA polimorfik dapat dilihat pada tabel berikut ini:

Tabel 3. Total fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan 10 primer ISSR dan prosentase fragmen polimorfik pada 11 aksesi ekinase

No	Nama Primer	Sekuen	Total fragmen teramplifikasi	Fragmen Monomorfik	Prosentase Polimorfik (%)
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	
Rata-rata			10,8	2	81,48

Tabel 3 menunjukkan bahwa 10 primer ISSR yang digunakan dapat mengamplifikasi DNA dan menghasilkan fragmen polimorfik. Polimorfisme tertinggi dihasilkan amplifikasi menggunakan primer UBC-814 yaitu 100%, polimorfisme rata-rata yaitu 81,48%.

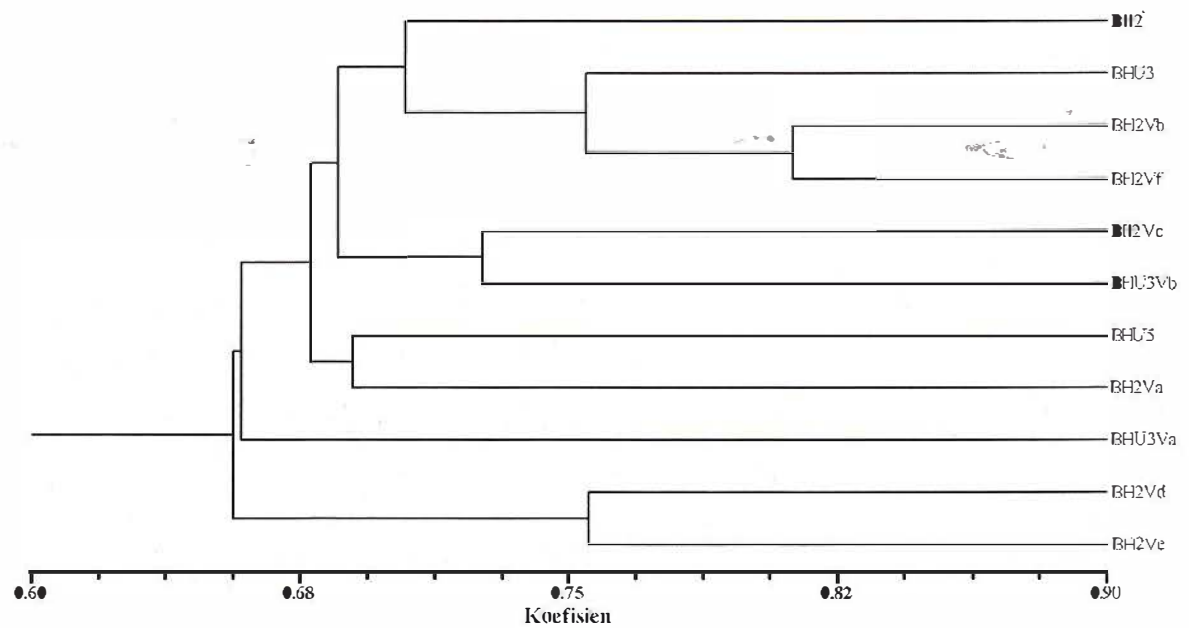
Menurut Mansyah *et al.* (2010) jumlah fragmen DNA polimorfik yang dihasilkan tergantung pada spesies (sampel) dan primer ISSR yang digunakan. Pemilihan primer ISSR yang tepat juga akan menghasilkan fragmen DNA polimorfik yang lebih tinggi, reproduktibilitas tinggi dan lebih informatif terutama dalam analisis keragaman genetik (Denduangboripant *et al.*, 2010).

Primer ISSR yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan primer dinukleotida dengan pengulangan (CA), (CT), (AC), (AG) dan (GA), sedangkan primer tri-nukleotida yang digunakan menggunakan pengulangan (CAG) dan (CTC) dan primer tetra-nukleotida dengan pengulangan (GATA) dan (ACTG).

Primer dengan motif pengulangan dinukleotida lebih banyak menghasilkan fragmen DNA polimorfik daripada amplifikasi dengan menggunakan motif pengulangan trinukleotida. Reddy *et al.* (2002) menyatakan bahwa secara umum

primer dengan pengulangan nukleotida (AG), (GA), (CT), (TC), (AC) dan (CA) menunjukkan polimorfisme yang lebih tinggi dibandingkan dengan primer dengan motif pengulangan di-, tri-, tetra- nukleotida lainnya. Pengulangan nukleotida (AT) adalah yang terbanyak pada tumbuhan tetapi primer berdasarkan pengulangan tersebut akan *self-anneal* dan tidak dapat mengamplifikasi. Pengulangan nukleotida tri- dan tetra-nukleotida lebih sedikit ditemukan di genom tumbuhan dibandingkan dengan pengulangan di-nukleotida (Kumar *et al.*, 2008).

Fragmen-fragmen DNA yang dihasilkan kemudian dianalisis berdasarkan ada atau tidaknya fragmen DNA yang muncul pada tiap aksesori. Jika terdapat fragmen DNA maka diberi skor 1 sedangkan jika tidak ada fragmen DNA diberi skor 0. Skor tersebut digunakan untuk menghitung koefisien asosiasi atau indeks similaritas antar aksesori ekinase. Koefisien similaritas yang digunakan adalah koefisien Dice. Berdasarkan nilai koefisien asosiasi tersebut, maka dapat dibuat dendrogram melalui analisis kluster dengan menggunakan metode UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Mean*). Hubungan kemiripan antar 11 aksesori ekinase berdasarkan penanda molekular ISSR dapat diketahui dari dendrogram berikut ini:

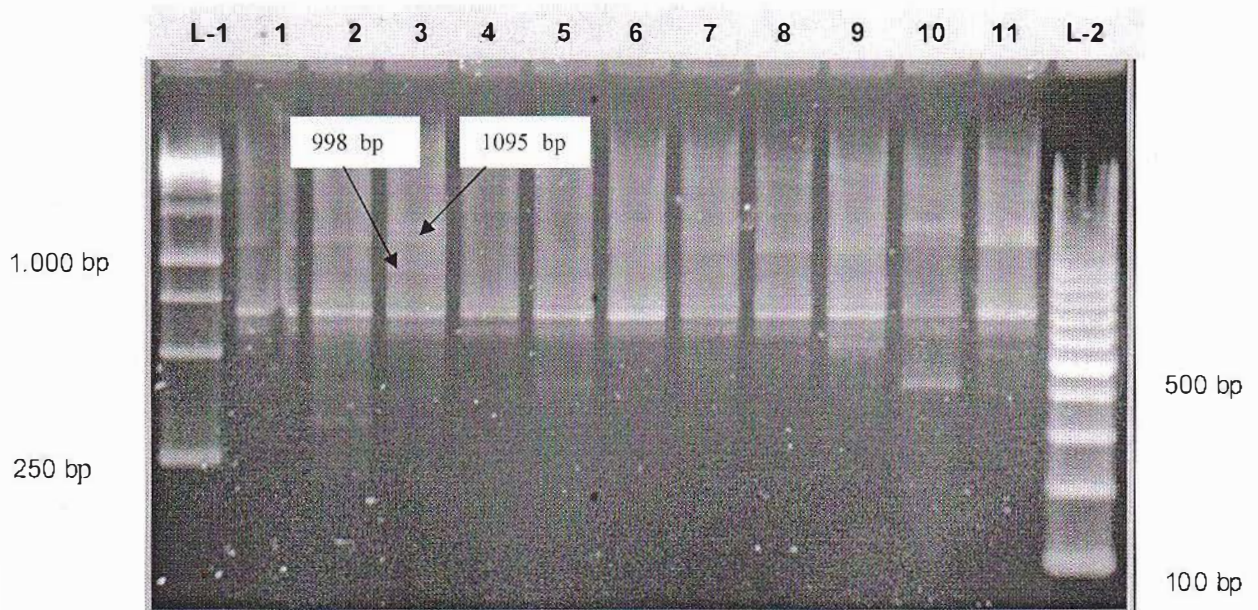


Gambar 21. Dendrogram 11 aksesi *Echinacea purpurea* (ekinase) berdasarkan penanda molekular ISSR

Dari dendrogram (Gambar 21) 11 aksesi ekinase terbagi menjadi 5 klaster pada koefisien similaritas 68,96 %. Klaster I terdiri dari aksesi BH2, BHU3, BH2-Vb dan BH2-Vf. Klaster II terdiri dari aksesi BH2-Vc dan BHU3-Vb, klaster III terdiri dari aksesi BHU5 dan BH2-Va, klaster IV hanya beranggotakan BHU3-Va, sedangkan klaster V terdiri dari aksesi BH2-Vd dan BH2-Ve. Kemiripan tertinggi yaitu antara BH2-Vb dan BH2-Vf sebesar 81,25%.

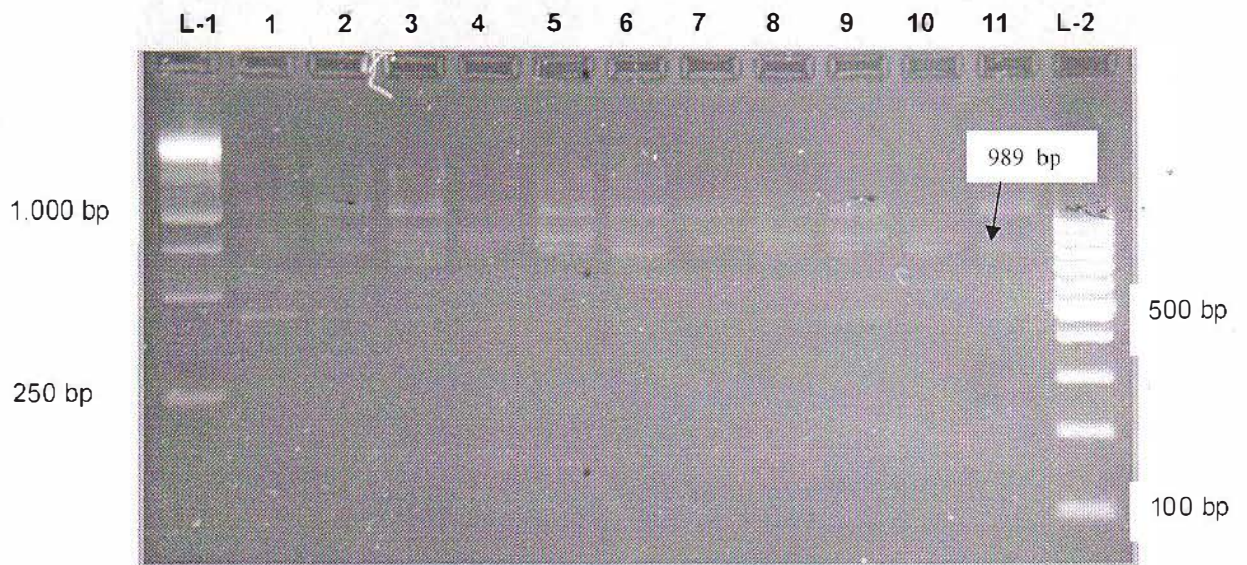
Nilai koefisien asosiasi tersebut menunjukkan antar aksesi ekinase mempunyai kemiripan atau kedekatan dengan pendekatan karakter molekular ISSR. Kemiripan genetik dapat digunakan untuk mengukur hubungan kemiripan pada sampel. Apabila suatu kelompok tumbuhan atau OTU mempunyai kemiripan antara 85% - 100% dimungkinkan masih dapat dikelompokkan sebagai satu spesies yang sama, kemiripan sebesar 65% digunakan untuk mengelompokkan pada tingkat genus. Akan tetapi pada akhirnya interpretasi dari dendrogram tergantung pada pengetahuan taksonom pada OTU yang diteliti (Chaveerach *et al.*, 2008).

Selain menggunakan penanda molecular ISSR untuk melihat keanekaragaman dan kemurnian keturunan F1 aksesii ekinase juga menggunakan penanda molecular RAPD. Berikut hasil amplifikasi DNA aksesii ekinase menggunakan 10 primer RAPD:



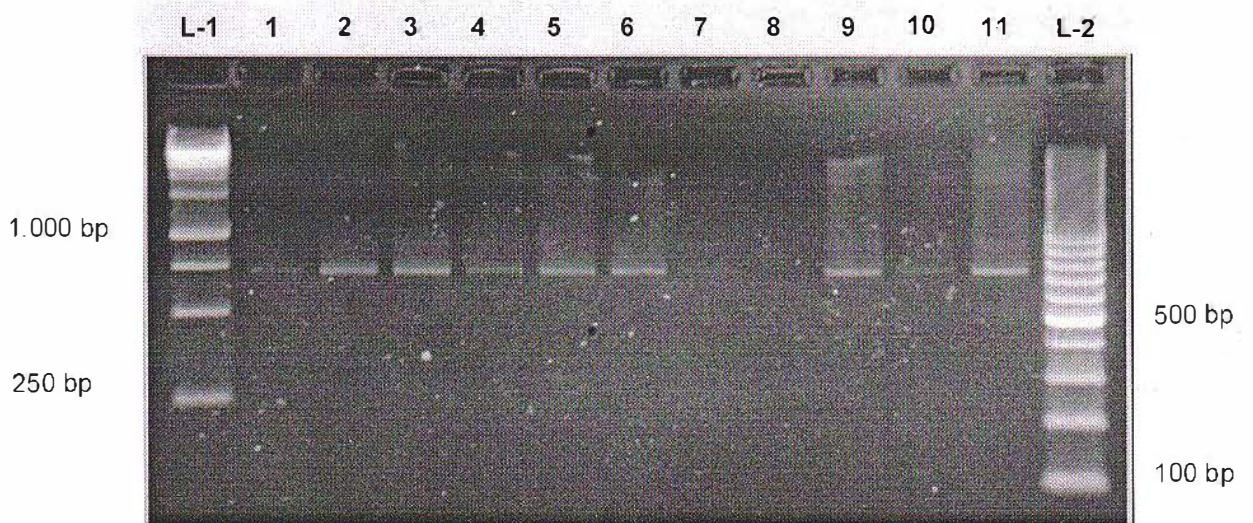
Gambar 22. Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer RAPD OPA-10: **L-1**:Ladder1 kb, **1**: aksesii F1-BH2, **2**: aksesii F1-BHU3, **3**: aksesii F1-BHU5, **4-9**: aksesii F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, **10-11**: aksesii F1-BHU3-Va dan Vb, **L-2**: Ladder 100 bp

Berdasarkan Gambar 22 dapat diketahui fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan primer OPA-10 pada 11 aksesii ekinase menghasilkan 10 fragmen berukuran 327-1320 bp. Terdapat 2 fragmen DNA spesifik yang hanya dimiliki oleh aksesii BHU5 yaitu fragmen DNA berukuran 998 bp dan 1095 bp. Fragmen DNA tersebut dapat dijadikan acuan untuk identifikasi aksesii ekinase bila diamplifikasi menggunakan primer OPA-10.



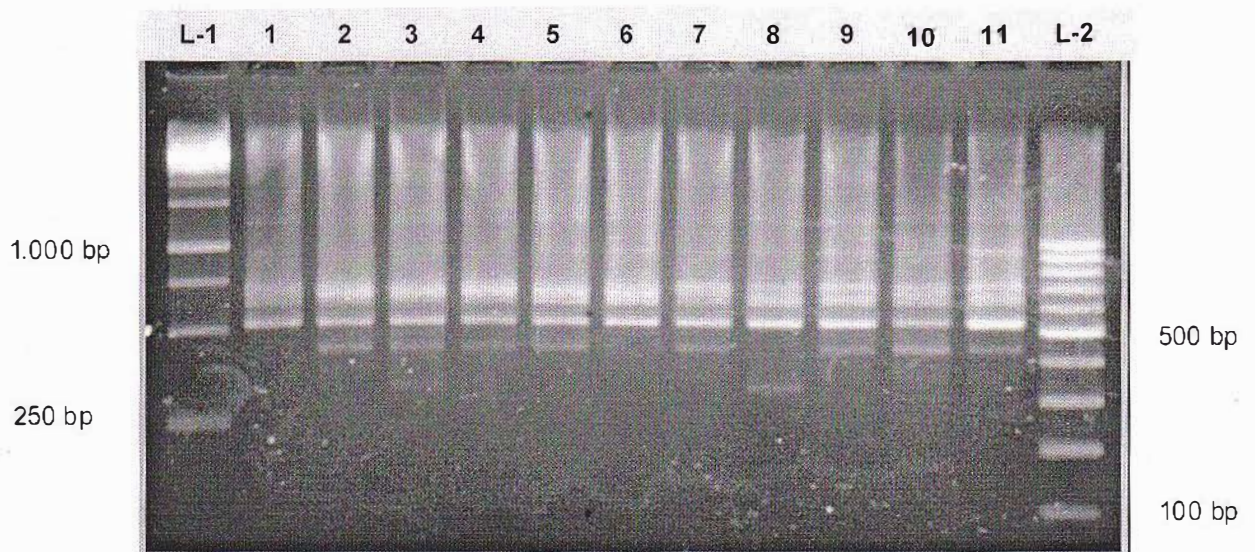
Gambar 23. Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer RAPD OPA-16: L-1:Ladder1 kb, 1: aksesi F1-BH2, 2: aksesi F1-BHU3, 3: aksesi F1-BHU5, 4-9: aksesi F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, 10-11: aksesi F1-BHU3-Va dan Vb, L-2: Ladder 100 bp

Berdasarkan Gambar 23 dapat diketahui fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan primer OPA-16 pada 11 aksesi ekinase menghasilkan 6 fragmen berukuran 518-1499 bp. Terdapat 1 fragmen DNA spesifik yang tidak dimiliki oleh aksesi BHU3-Vb yaitu fragmen DNA berukuran 989 bp. Fragmen DNA tersebut dapat dijadikan acuan untuk identifikasi aksesi ekinase bila diamplifikasi menggunakan primer OPA-16.



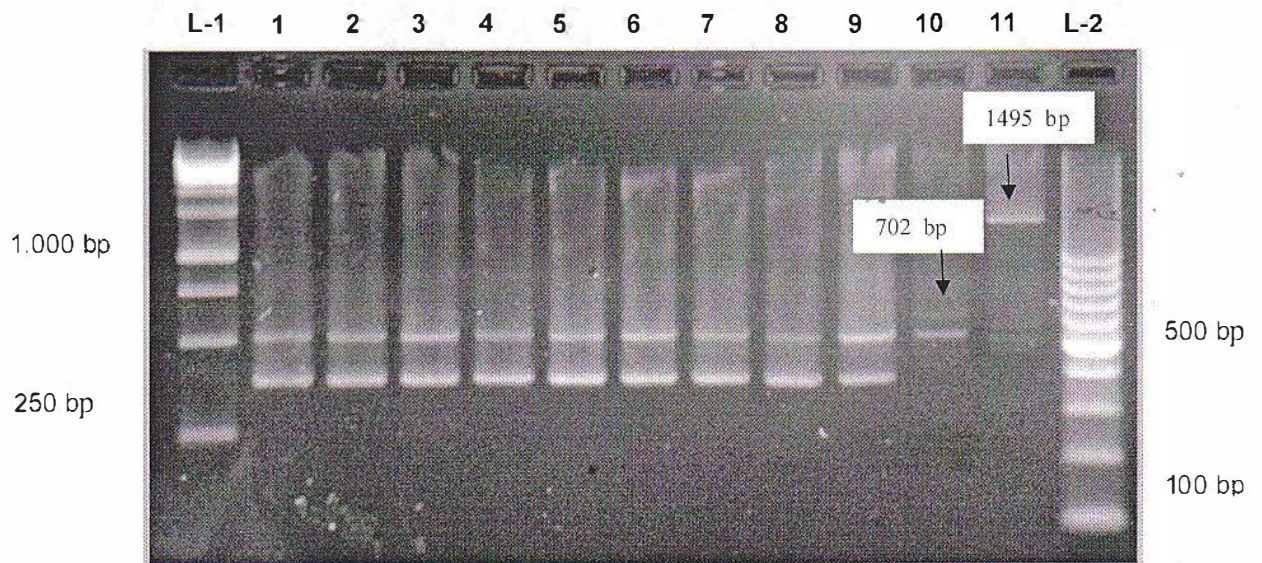
Gambar 24. Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer RAPD OPA-17: **L-1**:Ladder1 kb, **1**: aksesi F1-BH2, **2**: aksesi F1-BHU3, **3**: aksesi F1-BHU5, **4-9**: aksesi F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, **10-11**: aksesi F1-BHU3-Va dan Vb, **L-2**: Ladder 100 bp

Berdasarkan Gambar 24 dapat diketahui fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan primer OPA-17 pada 11 aksesi ekinase hanya menghasilkan 1 fragmen DNA 805 bp.



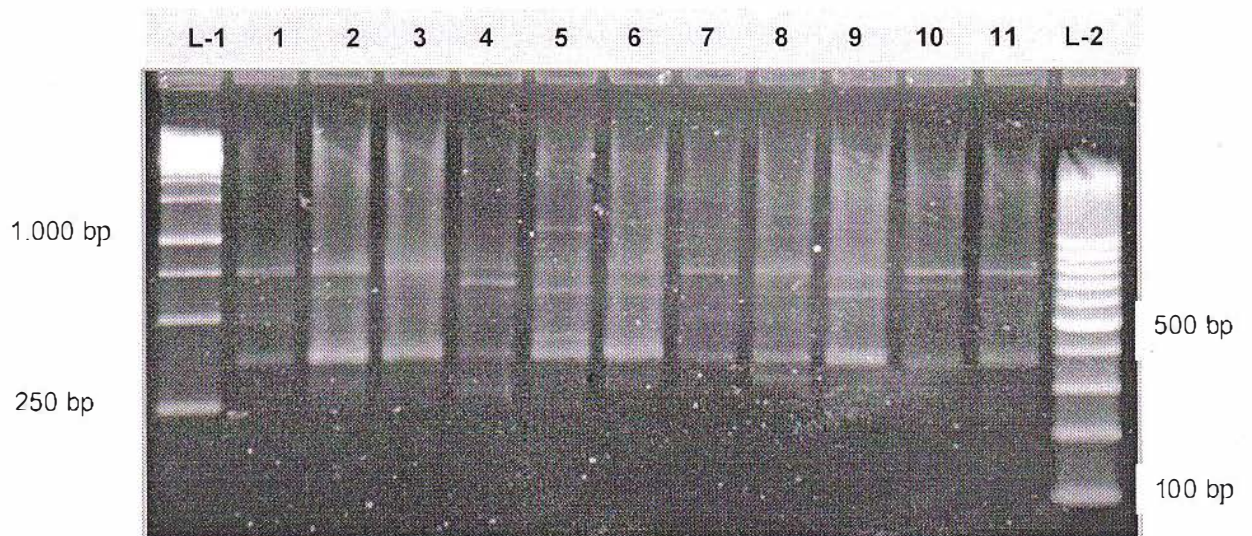
Gambar 25. Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer RAPD OPA-18: **L-1**:Ladder1 kb, **1**: aksesi F1-BH2, **2**: aksesi F1-BHU3, **3**: aksesi F1-BHU5, **4-9**: aksesi F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, **10-11**: aksesi F1-BHU3-Va dan Vb, **L-2**: Ladder 100 bp

Berdasarkan Gambar 25 dapat diketahui fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan primer OPA-18 pada 11 aksesi ekinase menghasilkan 10 fragmen berukuran 269-1405 bp. Terdapat 2 fragmen DNA spesifik yang dimiliki oleh aksesi BHU3-Va yaitu fragmen DNA berukuran 1143 bp dan 298 bp. Fragmen DNA tersebut dapat dijadikan acuan untuk identifikasi aksesi ekinase bila diamplifikasi menggunakan primer OPA-18.



Gambar 26. Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer RAPD OPA-19: **L-1**:Ladder1 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

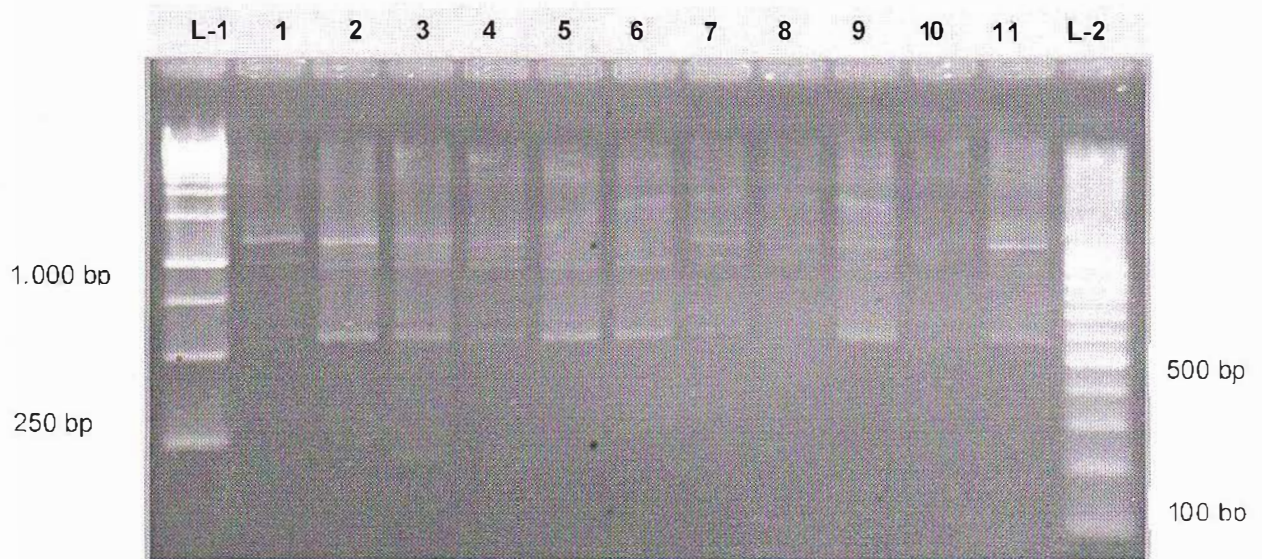
Berdasarkan Gambar 26 dapat diketahui fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan primer OPA-19 pada 11 aksesi ekinase menghasilkan 4 fragmen berukuran 383-1495 bp. Terdapat 2 fragmen DNA spesifik yang dimiliki aksesi BHU3-Vb yaitu fragmen DNA berukuran 1495 bp dan fragmen DNA berukuran 702 bp pada aksesi BHU3-Va. Fragmen DNA tersebut dapat dijadikan acuan untuk identifikasi aksesi ekinase bila diamplifikasi menggunakan primer OPA-19.



Gambar 27. Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer RAPD OPB-4: **L-1**:Ladder1 kb, **1**: aksesi F1-BH2, **2**: aksesi F1-BHU3, **3**:

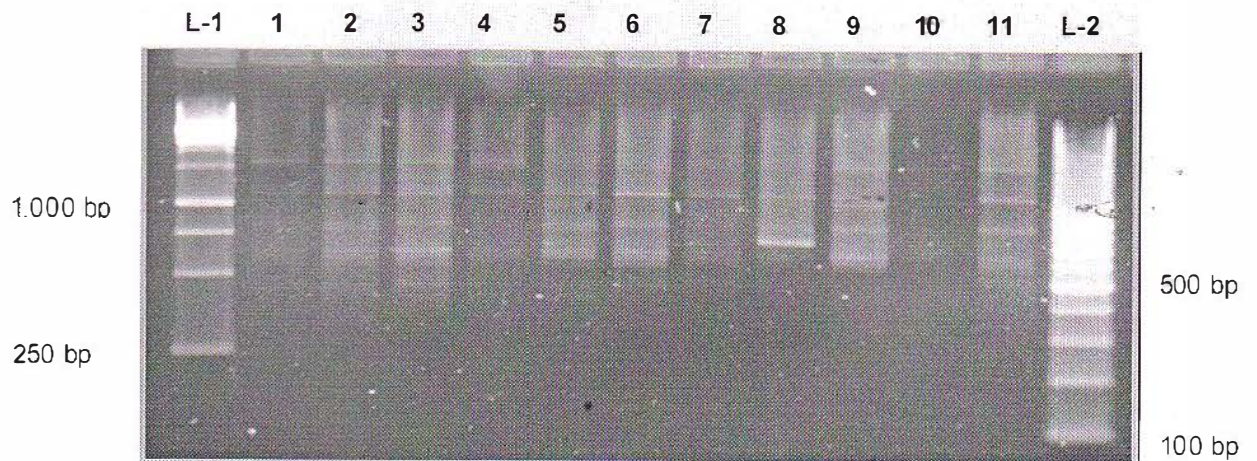
aksesi F1-BHU5, **4-9**: aksesii F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, **10-11**: aksesii F1-BHU3-Va dan Vb, **L-2**: Ladder 100 bp

Berdasarkan Gambar 27 dapat diketahui fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan primer OPB-4 pada 11 aksesii ekinase menghasilkan 7 fragmen berukuran 273-1046 bp. Terdapat 2 fragmen DNA spesifik yang dimiliki aksesii BH2-Vb yaitu fragmen DNA berukuran 455 bp dan fragmen DNA berukuran 314 bp pada aksesii BH2-Ve. Fragmen DNA tersebut dapat dijadikan acuan untuk identifikasi aksesii ekinase bila di amplifikasi menggunakan primer OPB-4.



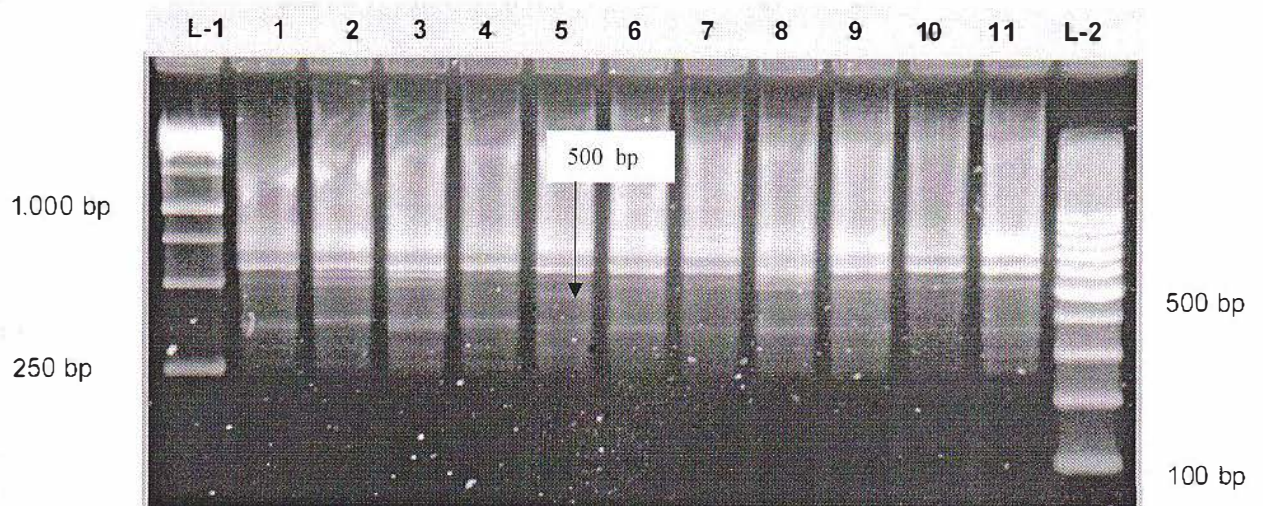
Gambar 28. Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer RAPD OPE-5: **L-1**: Ladder 1 kb, **1**: aksesii F1-BH2, **2**: aksesii F1-BHU3, **3**: aksesii F1-BHU5, **4-9**: aksesii F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, **10-11**: aksesii F1-BHU3-Va dan Vb, **L-2**: Ladder 100 bp

Berdasarkan Gambar 28 dapat diketahui fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan primer OPE-5 pada 11 aksesii ekinase menghasilkan 6 fragmen berukuran 596-1973 bp. Terdapat 1 fragmen DNA spesifik yang dimiliki aksesii BH2 yaitu fragmen DNA berukuran 1973 bp. Fragmen DNA tersebut dapat dijadikan acuan untuk identifikasi aksesii ekinase bila di amplifikasi menggunakan primer OPE-5.



Gambar 29. Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer RAPD OPE-6: L-1:Ladder1 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

Berdasarkan Gambar 29 dapat diketahui fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan primer OPE-6 pada 11 aksesi ekinase menghasilkan 9 fragmen berukuran 543-1707 bp. Terdapat 1 fragmen DNA spesifik yang dimiliki aksesi BHU3 yaitu fragmen DNA berukuran 543 bp. Fragmen DNA tersebut dapat dijadikan acuan untuk identifikasi aksesi ekinase bila diamplifikasi menggunakan primer OPE-6.



Gambar 30. Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan primer RAPD OPH-13: L-1:Ladder1 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

Berdasarkan Gambar 30 dapat diketahui fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan primer OPH-13 pada 11 aksesi ekinase menghasilkan 11 fragmen berukuran 253-902 bp. Terdapat 1 fragmen DNA spesifik yang dimiliki aksesi BH2-Vb yaitu fragmen DNA berukuran 500 bp. Fragmen DNA tersebut dapat dijadikan acuan untuk identifikasi aksesi ekinase bila diamplifikasi menggunakan primer OPH-13.

Primer RAPD OPA-6 tidak dapat mengamplifikasi DNA semua aksesi ekinase, hal tersebut kemungkinan disebabkan karena DNA ekinase tidak mempunyai urutan basa/ sekuen dalam primer tersebut sehingga primer tidak bisa menempel. Jumlah total fragmen DNA yang teramplifikasi dan prosentase fragmen DNA polimorfik dapat dilihat pada tabel berikut ini:

Tabel 4. Total fragmen DNA hasil amplifikasi dengan menggunakan 10 primer RAPD dan prosentase fragmen polimorfik pada 11 aksesi ekinase

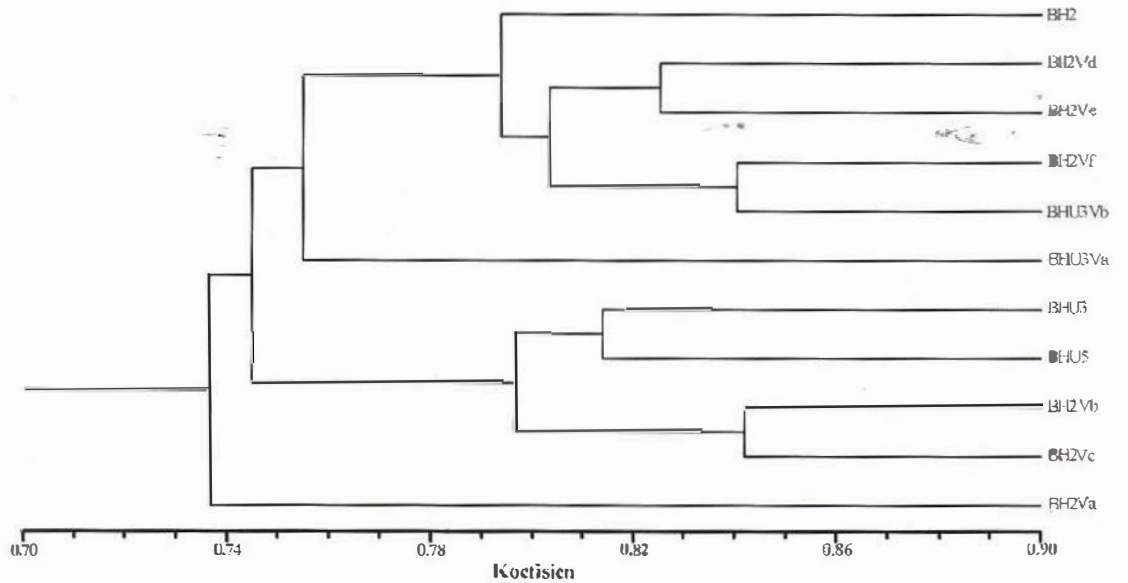
No	Nama Primer	Sekuens	Total Fragmen teramplifikasi	Fragmen Monomorfik	Prosentase Polimorfisme (%)
1	OPA-6	GGTCCCTGAC	0	0	0
2	OPA-10	GTGATCGCAG	10	2	80
3	OPA-16	AGCCAGCGAA	6	1	83,33
4	OPA-17	GACCGCTTGT	1	1	0
5	OPA-18	AGGTGACCGT	10	3	70
6	OPA-19	CAAACGTCGG	4	1	75
7	OPB-4	GGACTGGAGT	7	2	71,43
8	OPE-5	TCAGGGAGGT	6	2	66,67
9	OPE-6	AAGACCCCTC	9	2	77,78
10	OPH-13	GACGCCACAC	11	2	81,82
<b>Jumlah</b>			64	16	
<b>Rata-rata</b>			6,4	1,6	75

Tabel 4 menunjukkan bahwa 10 primer RAPD yang digunakan tidak semua dapat mengamplifikasi DNA, primer OPA-6 tidak dapat mengamplifikasi, sedangkan primer OPA-17 menghasilkan fragmen tunggal dan bersifat

monomorfik. Polimorfisme tertinggi dihasilkan amplifikasi menggunakan primer OPA-16 yaitu 83,33 %, polimorfisme rata-rata yaitu 75%.

Primer ISSR menghasilkan lebih banyak polimorfisme (81,48) dibandingkan dengan amplifikasi RAPD (75%). Primer ISSR umumnya mempunyai panjang 16 – 18 pasangan basa dan *annealing temperature* lebih tinggi dibandingkan RAPD sehingga menghasilkan lebih banyak pita atau fragmen yang reliabel dan reproduisibel (Mohsen dan Ali, 2008; Wahyuni *et al.*, 2004). ISSR merupakan penanda molekular yang menunjukkan sifat dominan tetapi menunjukkan variabilitas yang tinggi sehingga ISSR sangat cocok untuk menyelidiki variasi genetik di antara individu yang berkerabat sangat dekat dan klasifikasi kultivar tanaman budidaya (Dje *et al.*, 2006).

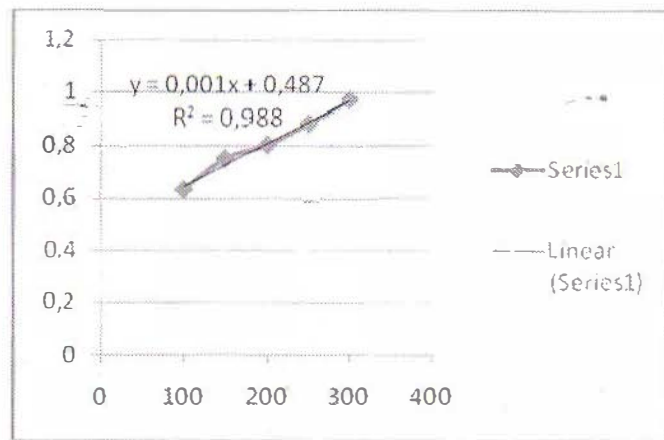
Fragmen-fragmen DNA yang dihasilkan kemudian dianalisis berdasarkan ada atau tidaknya fragmen DNA yang muncul pada tiap aksesori. Jika terdapat fragmen DNA maka diberi skor 1 sedangkan jika tidak ada fragmen DNA diberi skor 0. Skor tersebut digunakan untuk menghitung koefisien asosiasi atau indeks similaritas antar aksesori ekinase. Koefisien similaritas yang digunakan adalah koefisien Dice. Berdasarkan nilai koefisien asosiasi tersebut, maka dapat dibuat dendrogram melalui analisis kluster dengan menggunakan metode UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Mean*). Hubungan kemiripan antar 11 aksesori ekinase berdasarkan penanda molekular RAPD dapat diketahui dari dendrogram berikut ini:



Gambar 31. Dendrogram 11 aksesi *Echinacea purpurea* (ekinase) berdasarkan penanda molekular RAPD

Dari dendrogram (Gambar 31) 11 aksesi ekinase terbagi menjadi 4 kluster pada koefisien similaritas 75,49 %. Kluster I terdiri dari aksesi BH2, BH2-Vd, BH2-Ve, BH2-Vf dan BHU3-Vb. Kluster II hanya beranggotakan aksesi BHU3-Va, kluster III terdiri dari aksesi BHU3, BHU5, BH2-Vb dan BH2-Vc, kluster IV hanya beranggotakan BH2-Va. Kemiripan tertinggi yaitu antara BH2-Vb dan BH2-Vc sebesar 84,21%.

Selain karakter morfologi dan molekular, kadar fenol total juga dihitung untuk masing-masing aksesi, berikut kurva standar penetapan kadar fenol total:



Gambar 32. Kurva stándar penetapan kadar fenol total

### 3. PEMBIBITAN *IN VITRO*

Ekinase merupakan tanaman yang bersifat heterozigot, kandungan kimia kemungkinan berbeda untuk tiap individu, selain itu juga kualitasnya juga berbeda (Dahanayake *et al.*, 2010). Teknik pembibitan secara *in vitro* pada tanaman ekinase diperlukan untuk keseragaman dan kualitas genotip yang dihasilkan. Eksplan yang digunakan biasanya dari daun ataupun tangkai daun (Dahanayake *et al.*, 2010).

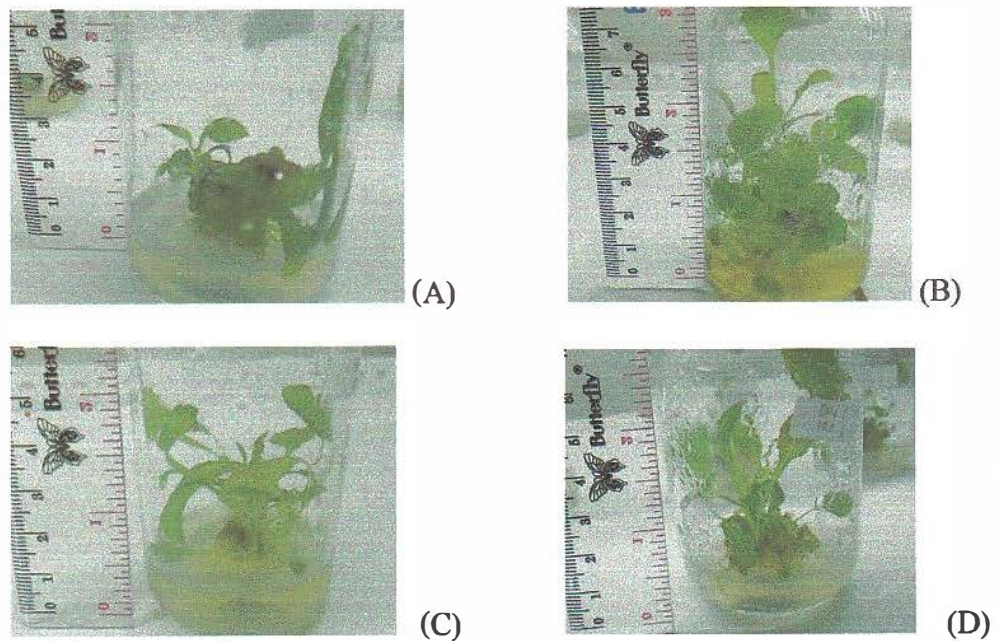
Pembibitan *in vitro* aksesi ekinase menggunakan 4 macam Zat pengatur tumbuh (ZPT) yaitu NAA, BAP, IBA dan Giberelin dengan konsentrasi 2,4,dan 6 ppm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa NAA dan BAP memberikan hasil pertumbuhan yang optimum pada konsentrasi 2 ppm, sedangkan IBA dan Giberelin menunjukkan hasil yang optimum dalam penumbuhan ekinase pada konsentrasi 6 ppm. Berikut hasil rerata jumlah daun dan akar ekinase pada ZPT yang berbeda:

Tabel 5. Rerata Jumlah daun dan akar ekinase menggunakan ZPT berbeda dan konsentrasi yang optimum

No	Zat Pengatur Tumbuh	Konsentrasi	Jumlah daun	jumlah akar (cm)
1	NAA	2 ppm	30	11,3
2	BAP	2 ppm	21	-
3	IBA	6 ppm	25	3,3

4	Giberelin	6 ppm	33,5	1
---	-----------	-------	------	---

Morfologi atau penampakan bibit hasil pembibitan *in vitro* menunjukkan hasil yang berbeda dengan berbagai jenis ZPT. Tinggi bibit yang maksimal diperoleh dengan menggunakan zat pengatur tumbuh BAP dan Giberelin. Warna daun bibit umumnya berwarna hijau muda kecuali ekinase yang ditumbuhkan menggunakan ZPT giberelin yang berwarna hijau tua (Gambar 30).



Gambar 33. Bibit ekinase usia 2 bulan hasil pembibitan *In Vitro* dengan berbagai konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) yang optimum; (A) BAP 2 ppm, (B) NAA 2 ppm, (C) Giberelin 6 ppm, (D) IBA 6 ppm

Menurut Choffe *et al.* (2000), IBA dengan konsentrasi 2,5-20 ppm merupakan konsentrasi efektif dalam pembentukan akar baik dari hipokotil maupun kotiledon eksplan. Konsentrasi BAP yang optimal dalam pembentukan tunas ekinase sebesar 2,5 ppm.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### A. KESIMPULAN

1. Keturunan pertama F1 dari tiga aksesi ekinase pilihan menunjukkan adanya keseragaman yang rendah dan masih menunjukkan beberapa variasi yang mencolok
2. Aksesi BH2 menunjukkan varian sebanyak 6 aksesi dan varian aksesi BHU3 sebanyak 2 aksesi yang berbeda secara morfologi maupun molekular dengan indukannya
3. Ekinase dapat dikembangkan dengan pembibitan melalui pembibitan in vitro dengan menggunakan eksplan daun
4. Zat pengatur tumbuhan yang optimum dalam pembibitan in vitro ekinase yaitu NAA dan BAP konsentrasi 2 ppm, IBA dan Giberelin konsentrasi 6 ppm

### B. SARAN

1. Aksesi ekinase perlu dimurnikan lagi untuk mendapatkan tanaman standar yang seragam
2. Bibit ekinase hasil pembibitan in vitro perlu diaklimatisasi dan ditanam secara bertahap untuk dapat sampai ke lahan dan dicck keseragaman antar bibit

## UCAPAN TERIMAKASIH

Alhamdulillahirobbil'alamin, segala puji hanya bagi Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan Laporan Akhir Penelitian ini dengan lancar. Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Indah Yuning Prapti, SKM, M. Kes., selaku Kepala Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT) yang telah mengizinkan penulis menggunakan sarana dan prasarana penelitian di Laboratorium Terpadu serta memberikan ijin pembiayaan penelitian melalui DIPA B2P2TO-OT tahun 2011
2. Ketua PPI B2P2TO-OT, Ir. Yuli Widiyastuti, MP yang telah memberikan arahan dan masukan mulai dari perencanaan, pelaksanaan dan pelaporan penelitian
3. Segenap anggota peneliti dan pembantu penelitian dalam penelitian ini yang telah melaksanakan kewajibannya sehingga penelitian dapat terlaksana dengan lancar
4. Pihak-pihak lain yang telah banyak membantu dan tidak dapat disebutkan satu persatu oleh penulis

## DAFTAR PUSTAKA

- Allard, R.W. 1992. *Pemuliaan Tanaman* jilid I. Terjemahan oleh Manna, Bina Aksara. Jakarta
- Ambarwati, A.D. 1987. *Induksi Kalus dan Differensiasi pada Kultur Jaringan Gnetum gnemon L.* Fakultas Biologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Aslamyah, S. 2002. Peranan Hormon Tumbuh Dalam Memacu Pertumbuhan Algae, Makalah Falsafah Sains. Program Pasca Sarjana/S3. IPB. Bogor.
- Badriah. D.N., N.T.Mathius, T.Sutater, 1998. Tanggap Dua Kultivar Gladiol Terhadap Zat pengatur tumbuh pada perbanyakan in Vitro. *J. Hort.* 8 (2):1048-1059
- Banga, D., Ardelean, M., Duda, M. and Varban, D. 2007. *Phenotypical Variability of Several Important Characters at Seven Echinacea purpurea Cultivars Tested In Collection Field of USAVM CLUJ NAPOCA*
- Choffe, K.L., S.J. Murch and P.K. Saxena, 2000a, Regeneration of *Echinacea purpurea* : induction of root organogenesis from hypocotyl and cotyledon explants, *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* , 62: 227–234.
- Dahanayake, N., Chen, X.L., Zhao, F.C., Yang, Y.S. and Wu, H. *An Efficient In Vitro Propagation System For Purple Cone-Flower (Echinacea purpurea L.)*. *Tropical Agricultural research & Extension* 13(2):2010
- Dje, Y., Tahi, G.C., Zoro, B.I.A., Malice, M., Baudin, J.P. and Bertin, P. 2006. *Optimization of ISSR Marker for African Edible-Seeded Cucurbitaceae Species Genetic Diversity Analysis*. *African Journal of Biotechnology* 5(2): 83-87
- Douglas, J., 1993. *Echinacea-the purple coneflowers*, Ruakura Sgricultural Research center
- Fitriani, A. 2003. Kandungan Ajmalisin pada Kultur Kalus *Catharanthus roseus* (L.) G. Don Setelah Dielisitasi Homogenat Jamur *Pythium aphanidermatum* Edson Fitzp. Makalah Pengantar Falsafah Sains (PPS702). Program Pasca Sarjana / S3. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Hasan, S.M.Z., Shafie, M., Shafie, B. and R.M., Shah. 2009. *Analysis of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) of Artemisia capillaries (Wormwood capillary) in East Coast of Peninsular Malaysia*. *World Applied Sciences Journa* 6(7): 976 – 986
- Hasnaoui, N., Messaound, M., Chibani, J. and M., Trifi. 2010. *Molecular Polymorphisms in Tunisian Pomegranate (Punica granatum L.) as Revealed by RAPD Fingerprints*. *Diversity* 2:107 – 114
- Hobbs, C., 1994. *Echinacea the Immune Herbs*, Botanica Press. Capitola, CA
- Jones, S.B. and Luchsinger, A.E. 1986. *Plant Systematics*. Second Edition. McGraw Hill Book Company. New York.
- Lee, T.T., Huang, C.C., Shieh, X.H., Chen, C.L., Chen, L.J. and Yu, B. 2010. *Flavonoid, Phenol and Polysaccharide Contents of Echinacea purpurea L.*

- And Its Immunostimulant Capacity In Vitro. *International Journal of Environmental Science and Development* 1(1):5-9
- Moore, T.C..1979. *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones*. Springer Verlag, New York. Heiderlberg, Berlin.
- Muthusamy, S., Kanagarajan, S. and Ponnusamy, S. 2008. *Efficiency of RAPD and ISSR Markers System in Genetic Variation of Rice Bean (Vigna umbellata) Landraces*. *Electronic Journal of Biotechnology* 11(3): 1-10
- oliveira, E.C., Junior, A.T.A., Goncalves, L.S.A., Pena, G.F., Junior, S.P.F., Ribeiro, R.M. and Pereira, M.G. 2010. *Optimizing the efficiency of the touchdown technique for detecting inter-simple sequence repeat markers in corn (Zea mays)*. *Genetics and Molecular Research* 9(2): 835-842
- Ozkaya, M.T., Cakir, E., Gokbayrak, Z., Ercan, H. and Taskin N. 2006. *Morphological and molecular characterization of Derik Halhali olive (Olea europaea L.) accessions grown in Derik-Mardin province of Turkey*. *Scientia Horticulturae* 108: 205-209
- Raharjo, M., 2000. *Echinacea Tanaman Obat Introduksi Potensial*. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri*
- Raharjo, M., Sudiarto, A. Dhalimi, Rosita-SDM, I. Darwati Hernani, Kosasih, S.N. Syamsiah, 2000., *Tingkat produktivitas dan mutu simplisia tanaman introduksi Echinacea purpurea pada beberapa umur panen*. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri*
- Reddy, M.P., Sarla, N. and Siddiq, E.A. 2002. *Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding*. *Euphytica* 128:9-17
- Setiyoko, B. 1995. *Kultur Meristem Tanaman Pisang (Musa paradisiaca L.) Kultivar Ambon untuk Memperoleh Tanaman yang Bebas Cucurbit Mosaic Virus*. Laporan Skripsi Fakultas Biologi UGM. Yogyakarta.
- Varban, D.I., Duda, M.M., Varban, R., Muntean, S. and Muntean, L. 2010. *The study of Several Genotypes of Echinacea purpurea (L.) Moench*. *Research Journal of Agricultural Science* 42(1): 319-325
- Vaze, A., Nerkar, G., Pagariya, M., Devarumath, R.M. and Prasad, T. 2010. *Isolation and PCR Amplification of Genomic DNA From Dry Leaf Samples of Sugarcane*. *International Journal of Pharma and Bio Science* VI(2)2010
- Wahyuni, S., Xu, D.H., Bermawie, N., Tsunematsu, H. and Ban, T. 2004. *Skrining ISSR Primer Studi Pendahuluan Kekerabatan Antar Jahe Merah, Jahe Emprit dan Jahe Besar*. *Buletin TRO* 15(1): 33-41
- Xiao-ying, L., Xue-ying, Z. and Yue-sheng, Y. 2007. *Genetic diversity of Camellia changii Ye (Theaceae) Using ISSR Markers*. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* 15(2): 93-100
- Zhao, K., Zhou, M. and Chen, L. 2007. *Genetic Diversity and Discrimination of Chimonanthus praecox (L.) Link Germplasm Using ISSR and RAPD Markers*. *HortScience* 42 (5): 1144-1148



(A)



(B)



(C)



(D)



(E)



(F)



(G)



(H)

Lampiran 1. Bentuk reseptakel masing-masing varian aksesi (A. BH2-Va, B. BH2-Vb, C. BH2-Vc, D. BH2-Vd, E. BH2-Ve, F. BH2-Vf, G. BHU3-Va, H. BHU3-Vb)

Lampiran 2. Data berat basah masing-masing aksesi

no	Kode Aksesi	Berat Basah (gr)			
		Akar	Batang	Daun	Bunga
1	BH2 D	45	187	97	53
2	BH2 VA	48	203	75	136
3	BH2 VB	31	52	80	51
4	BH2 VC	40	385	264	250
5	BH2 VD	28	128	109	98
6	BH2 VE	25	175	77	92
7	BH2 VF	79	364	246	307
8	BHU3 D	90	350	260	334
9	BHU3 VA	125	374	202	279
10	BHU3 VB	59	296	201	146
11	BHU5 G	114	379	165	250

## LEMBAR PENGESAHAN

Penelitian dengan judul "Kajian Karakteristik Aksesi dan Pengembangan Teknis Pembibitan Secara *In Vitro Echinacea purpurea L.*", dinyatakan telah selesai dan telah dibahas Panitia Pembina Ilmiah Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Badan Litbang Kesehatan.

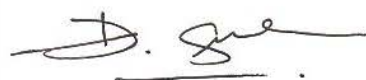
Tawangmangu, Januari 2012

Menyetujui  
Ketua PPI



Ir. Yuli Widiyastuti, M.P  
NIP.197607171993032002

Ketua Pelaksana



Dyah Subositi, M.Sc.  
NIP. 198308152006042003

Mengetahui  
Kepala B2P2TO-OT Tawangmangu



Indah Yuning Prapti, SKM., MKes.  
NIP: 19550810197712 2 001