

Keanekaragaman Genetik Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) berdasarkan Marka *Inter-Simple Sequence Repeats* (ISSR)

Dyah Subositi¹ dan Rohmat Mujahid¹

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Balitbangkes, Kemenkes RI
Jl. Lawu, Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah-Indonesia
Email: dyah.subositi@gmail.com

Abstract

Field milk thistle (*Sonchus arvensis* L.) belongs to family Asteraceae and known as one of important medicinal plants that is used as diuretics and antihypertensive. This plant species is widely distributed throughout Indonesia. Genetic diversity of field milk thistle is one of important information as a database for further research, especially in medicinal plant standardization. The objective of this study was to analyse genetic diversity of field milk thistle based on ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) molecular markers. Thirteen samples were collected from 8 different locations. Amplification process was performed using 5 ISSR primers. Similarity matrix was calculated using Dice coefficient. Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Mean (UPGMA) cluster analysis was performed to develop a dendrogram. The result indicates that there was a genetic variation among field milk thistle accessions, which was divided into 3 clusters with similarity index of 75.16%. Purwokerto and B2P2TOOT (4) accessions were the most closely similar ones with similarity index of 90.90%. ISSR markers may serve as an effective and efficient tool to analyze the genetic diversity among field milk thistle accessions.

Key Words : genetic characterization, field milk thistle (*Sonchus arvensis* L.), ISSR

Abstrak

Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) merupakan tanaman anggota familia Asteraceae yang banyak dimanfaatkan sebagai tumbuhan obat untuk menurunkan tekanan darah tinggi dan peluruh air seni. Tempuyung mudah dan banyak dijumpai di berbagai tempat di Indonesia. Keanekaragaman genetik tempuyung merupakan informasi dasar dalam rangka mendukung standarisasi tumbuhan obat. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan karakterisasi genetik tempuyung menggunakan penanda molekuler ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Tiga belas aksesi tempuyung yang dikoleksi dari 8 lokasi digunakan sebagai sampel dan diamplifikasi DNANYa menggunakan 5 primer ISSR. Indeks similaritas dihitung berdasarkan indeks similaritas Dice. Analisis kluster menggunakan metode *Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Mean* (UPGMA) dilakukan untuk mengonstruksi dendrogram. Hasil penelitian menunjukkan adanya variasi genetik antar aksesi tempuyung yang terbagi menjadi 3 kluster pada indeks similaritas 75,16%. Aksesi Purwokerto dan B2P2TOOT (4) mempunyai hubungan kemiripan yang terdekat pada indeks similaritas 90,90%. Penanda molekuler ISSR dapat digunakan dalam karakterisasi genetik antara aksesi tempuyung.

Kata kunci: karakterisasi genetik, tempuyung (*Sonchus arvensis* L.), ISSR

Pendahuluan

Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) merupakan tumbuhan anggota familia Asteraceae yang terdistribusi luas di Indonesia, meliputi Sumatera, Jawa, Bali, Sulawesi, dan Papua. Tumbuhan ini mampu tumbuh pada tempat dengan ketinggian 50-2.400 m dpl dan banyak dijumpai di sekitar persawahan, tepi jalan, dan tebing. Tempuyung merupakan tumbuhan terna semusim, tinggi dapat mencapai 1,5 m dengan batang persegi berwarna hijau-keputihan. Daun tunggal, letak daun pangkal berkumpul dalam suatu roset akar, bentuk sudip-bulat memanjang, tepi rata-bergerigi halus atau berbagi menyirip, pangkal runcing, panjang 6-38 cm, lebar 1-8 cm. Daun ujung di bagian ujung tanpa tangkai (duduk), memeluk batang, bentuk tombak, ujung runcing, pangkal bertelinga. Perbungaan berupa bunga majemuk bongkol (cawan), warna kuning (Backer & van den Brink, 1965).

Tempuyung secara empiris telah digunakan untuk mengatasi sakit asma, batuk, beberapa keluhan sakit pada dada, menenangkan syaraf, sebagai anti radang, antioksidan, diuretik, dan penurun tekanan darah tinggi (Khan, 2012; Xiang & Yu, 2010). Tempuyung juga dilaporkan mempunyai fungsi sebagai insektisida. Kandungan kimia dalam tempuyung antara lain flavonol, glikosida flavonol, monoasil galaktosilgliserol, seskuiterpen lakton, dan asam kuintat (Xiang & Yu, 2010).

Selama ini belum ada informasi mengenai keanekaragaman genetik. Informasi tersebut sangat penting sebagai salah satu informasi yang digunakan untuk standarisasi obat. Keanekaragaman genetik pada suatu spesies dapat terjadi karena adanya perbedaan lokasi atau tempat tumbuhnya sehingga perlu dilakukan penelitian (Svitlana *et al.*, 2018). Informasi tentang keanekaragaman genetik pada suatu spesies dapat menggambarkan daya adaptasi, seleksi genotipe dan untuk merakit varietas baru,

sidik jari genetik, serta pengelolaan plasma nutfah. Keaneekaragaman tersebut dapat diketahui dengan menggunakan berbagai karakter. Karakter morfologi merupakan karakter yang banyak digunakan sebagai dasar dalam identifikasi dan analisis keaneekaragaman. Karakter morfologi mudah diamati, namun membutuhkan waktu pengamatan yang lama, bagian tumbuhan harus diperoleh secara lengkap dan membutuhkan ketelitian dan kemampuan dalam mencandra saat di lapangan serta mudah terpengaruh oleh kondisi lingkungan (Fu *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2011).

Karakterisasi berdasarkan karakter morfologi perlu diperkuat menggunakan karakter lain seperti penanda molekuler. Hal tersebut disebabkan karena adanya plastisitas dalam satu spesies yang menyebabkan adanya variasi baik karakter kualitatif maupun kuantitatif, proses tersebut terjadi untuk merespon dan beradaptasi terhadap perubahan kondisi lingkungan (Noorani *et al.*, 2013). Sejumlah penanda molekuler telah banyak digunakan dalam rangka karakterisasi dan identifikasi varietas pada tumbuhan (Abdelmigid, 2012). Penanda molekuler yang umum digunakan antara lain Isozim, *Random Amplified Microsatellite Polymorphism* (RAMP), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), Mikrosatelit atau *Simple Sequence Repeats* (SSRs) dan *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSRs) (Panahi dan Neghab, 2013). Kelemahan dari penanda molekuler tersebut antara lain *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) membutuhkan teknik yang kompleks, *random amplification of polymorphic DNA* (RAPD) mempunyai reproduksibilitas rendah, sedangkan *amplified fragment length polymorphisms* (AFLPs) membutuhkan informasi sekuens untuk desain primer yang digunakan (Miah *et al.*, 2013).

Inter simple sequence repeats (ISSR) merupakan salah satu penanda molekuler yang telah banyak digunakan dalam penelitian

keaneekaragaman genetik antar aksesori meupun kultivar pada beberapa spesies. ISSR mempunyai kelebihan dibandingkan dengan penanda molekuler dominan lainnya yaitu menghasilkan polimorfisme fragmen DNA lebih tinggi, terpercaya, keterulangan (*reproducibility*) lebih tinggi dibandingkan penanda molekuler RAPD, *annealing temperature* primer tinggi dan desain primer berdasarkan area mikrosatelit (Almeida-Pereira, 2017; Li dan Ge, 2001). ISSR berbeda dengan penanda molekuler SSR karena merupakan penanda molekuler dominan dan tidak membutuhkan informasi awal sekuens untuk desain sekuens primer (Sousa *et al.*, 2015) Informasi keaneekaragaman genetik tempuyung (*S. arvensis*) berdasarkan ISSR belum banyak didokumentasikan terutama di Indonesia. Data keaneekaragaman genetik tersebut merupakan salah satu faktor untuk memilih aksesori dengan variasi genetik tinggi dalam rangka menghasilkan aksesori unggul untuk standarisasi tanaman obat. Tujuan penelitian ini adalah karakterisasi genetik aksesori tempuyung berdasarkan penanda molekuler ISSR untuk mendukung standarisasi tanaman obat.

Metode Penelitian

Koleksi sampel

Koleksi Tempuyung diperoleh 52 aksesori berasal dari Jawa Timur, Jawa Tengah, Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Barat, Nusa Tenggara Barat, dan Sumatera Barat. Sampel tersebut kemudian diamati berdasarkan pola spektrum FTIR (*Fourier transformed infrared spectrophotometer*), dilanjutkan dengan analisis berdasarkan metode PCA (*Principal Component Analysis*). Aksesori yang memperlihatkan perbedaan profil FTIR dan lokasi tumbuh dipilih sebagai sampel keaneekaragaman genetik (Tabel 1). Sampel yang diambil untuk analisis keaneekaragaman genetik berupa daun muda.

Tabel 1. Daftar Aksesori Tempuyung yang Digunakan untuk Karakterisasi Genetik

No	Nama Aksesori	Asal	Keterangan
1	Turen-2	Turen, Malang	Liar
2	Turen-3	Turen, Malang	Liar
3	Purwokerto	Purwokerto	Liar
4	Kalisoro	Tawangmangu, Karanganyar	Liar
5	Patuk	Gunung Kidul	Liar
6	Materia Medika	Materia Medika, Malang	Budidaya
7	Mataram	Mataram	Liar
8	Citereup	Citereup, Bandung	Liar
9	B2P2TO-OT (1)	Tawangmangu, Karanganyar	Budidaya
10	B2P2TO-OT (2)	Tawangmangu, Karanganyar	Budidaya
11	B2P2TO-OT (3)	Tawangmangu, Karanganyar	Budidaya
12	B2P2TO-OT (4)	Tawangmangu, Karanganyar	Budidaya
13	B2P2TO-OT (campuran untuk QC)	Tawangmangu, Karanganyar	Budidaya

Isolasi DNA genom

Isolasi DNA genom dilakukan menggunakan kit isolasi DNA (*Sigma GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit*). Elektroforesis dilakukan untuk mengetahui kualitas DNA genom hasil isolasi secara kualitatif. Metode spektrofotometri untuk menentukan kemurnian dan konsentrasi DNA. DNA genom tempuyung diencerkan 1.000X diukur pada absorbansi panjang gelombang 260 nm dan 280 nm ($\lambda_{260/280}$) untuk mengetahui kemurnian DNA. Perhitungan konsentrasi DNA genom menggunakan nilai hasil absorbansi λ_{260} nm.

Amplifikasi penanda ISSR

Amplifikasi penanda ISSR dilakukan menggunakan 5 primer ISSR (Tabel 2). Sebanyak 2 μ l *template* (30 ng), 1 μ l primer, 12,6 μ l PCR Mix (*Promega, Go Tag Green*), kemudian ditambah *distillated water* sampai volume 25 μ l. Campuran tersebut dimasukkan dalam *Thermalcycler* (BioRad C1000) dengan program sebagai berikut: pra denaturasi 95°C selama 3 menit, dilanjutkan dengan 39x siklus yang terdiri atas tahap denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* 50-51°C (ditentukan jenis primer) selama 1 menit, dan elongasi 72°C selama 2 menit, kemudian dilanjutkan dengan *final extention* 72°C selama 8 menit dan diakhiri dengan *holding temperature* pada suhu 4°C.

Hasil amplifikasi dilanjutkan proses elektroforesis pada gel agarosa 1,8% yang telah diberi *SYBR safe green*. Proses elektroforesis dilakukan pada tegangan 70-80 volt selama 100 menit. Visualisasi hasil elektroforesis dilakukan menggunakan sinar UV pada alat *Gel Documentation System* (BioRad XR+).

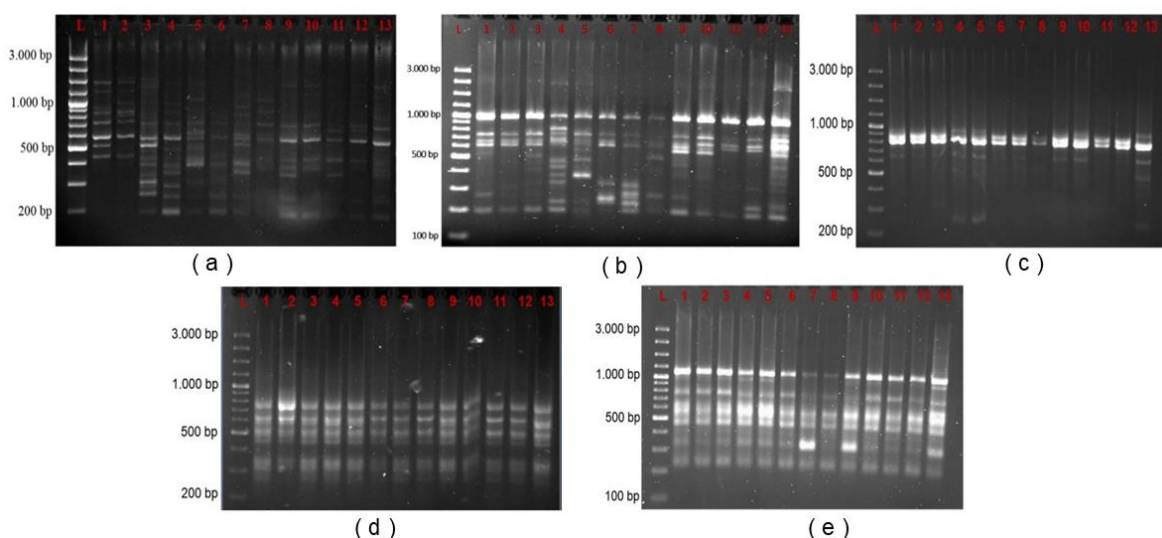
Analisis Data

Data berupa fragmen DNA tiap aksesori tempuyung pada setiap primer ISSR dikonversi menjadi data biner. Skor 1 diberikan pada aksesori yang menunjukkan adanya fragmen DNA, sedangkan bila tidak terdapat fragmen diberikan skor 0. Perhitungan indeks similaritas dilakukan menggunakan rumus indeks similaritas Dice. Selanjutnya, selanjutnya disusun analisis kelompok (*cluster analysis*) untuk konstruksi dendrogram menggunakan metode *Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Mean* (UPGMA). Data tersebut diolah menggunakan program komputer (*software*) NTSYS ver 2.02.

Hasil dan Pembahasan

Kelima primer ISSR yang digunakan dalam penelitian ini dapat mengamplifikasi 13 aksesori tempuyung dan menghasilkan total fragmen DNA sebanyak 60 fragmen dengan jumlah fragmen tiap primer >7 fragmen (Tabel 2).

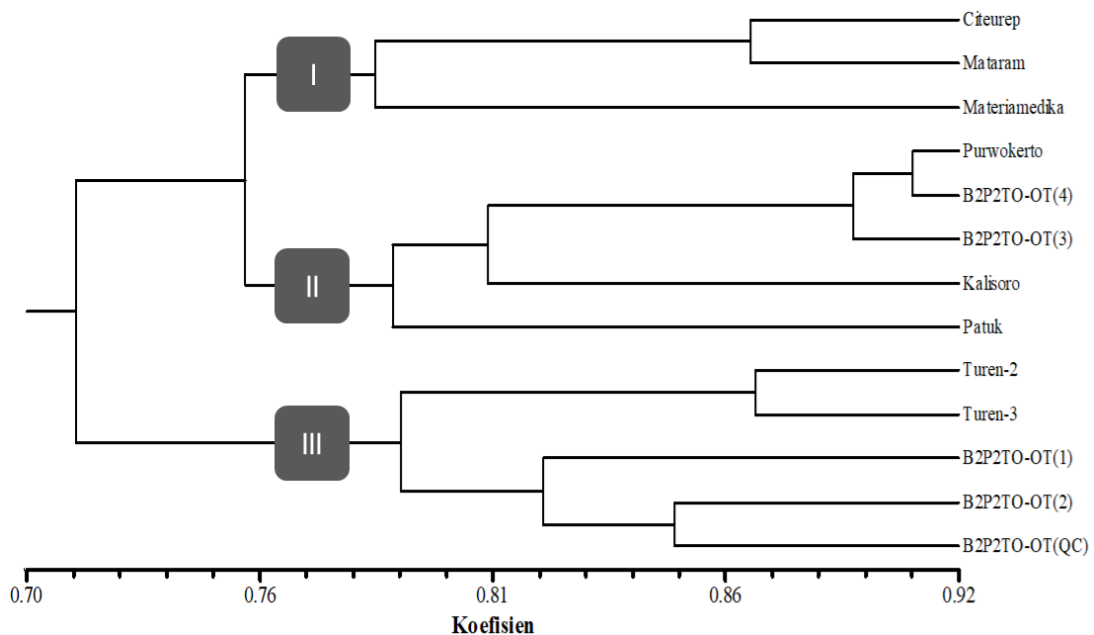
Berdasarkan Gambar 2 dapat diketahui fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan primer (GACA)4 pada 13 aksesori tempuyung menghasilkan 20 fragmen berukuran 193-1779 bp, primer (CA)6AG menghasilkan 17 fragmen berukuran 191-2589 bp, primer (CT)8G menghasilkan 8 fragmen berukuran 244-984 bp. Selain itu, amplifikasi menggunakan primer (ACC)6G pada 13 aksesori tempuyung menghasilkan 7 fragmen berukuran 277-805 bp dan primer (TG)8A menghasilkan 8 fragmen berukuran 215-1196 bp (Gambar 2).



Gambar 2. Fragmen DNA Tempuyung hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ISSR a. (GACA)4; b. (CA)6AG, c. (CT)8G, d. (ACC)6G, e. (TG)8A: L-1: Ladder 100 bp, 1: aksesori Citereup, 2: aksesori Mataram, 3: aksesori Materia Medika Malang, 4: aksesori Turen 2, 5: aksesori Turen 3, 6: aksesori Purwokerto, 7: aksesori Kalisoro, 8: aksesori Patuk, 9-12: aksesori B2P2TO-OT, 13: aksesori B2P2TO-OT campuran.

Tabel 2. Total fragmen DNA hasil amplifikasi menggunakan 5 primer ISSR dan persentase fragmen polimorfik pada 13 aksesi tempuyung.

No	Sekuen Primer (5'-3')	Ukuran Fragmen (bp)	Total Fragmen Teramplifikasi	Persentase Polimorfik (%)
1	(CT)8G	240-980	8	87,5
2	(ACC)6G	270-800	7	14,3
3	(GACA)4	190-1770	20	95
4	(CA)6AG	195-2590	17	82,4
5	(TG)8A	210-1200	8	25
Total			60	
Rata-rata				71,6



Gambar 3. Dendrogram 13 aksesi tempuyung berdasarkan penanda molekuler ISSR

Polimorfisme tertinggi dihasilkan pada amplifikasi menggunakan primer (GACA)4, yaitu 95%, sedangkan polimorfisme terendah 14,3% diperoleh pada amplifikasi menggunakan primer (ACC)6G. Polimorfisme rata-rata adalah 71,6%. Motif primer ISSR, jumlah pengulangan nukleotida dan basa pada jangkar primer berpengaruh terhadap jumlah fragmen dan tingkat polimorfisme yang dihasilkan (Abatel and Tesfaye, 2017; Prasanth *et al.*, 2015). Pemilihan primer ISSR yang tepat juga akan menghasilkan fragmen DNA polimorfik yang lebih tinggi, reproduktibilitas tinggi dan lebih informatif, terutama dalam analisis keanekaragaman genetik (Denduangboripant *et al.*, 2010).

Hasil analisis menggunakan penanda molekuler ISSR menunjukkan adanya keanekaragaman genetik di antara 13 aksesi tempuyung pada indeks kemiripan 75,16%-90,90% (Gambar 3). Dendrogram tersebut membagi 13 aksesi tempuyung menjadi 3 kluster utama. Kluster I beranggotakan aksesi Citeurep, aksesi Mataram dan aksesi Materiamedika Malang; Kluster II beranggotakan aksesi

Purwokerto, aksesi B2P2TO-OT 4, aksesi B2P2TO-OT 3, aksesi Kalisoro dan aksesi Patuk, sedangkan Kluster III beranggotakan aksesi Turen 2, aksesi Turen 3, aksesi B2P2TO-OT 1, aksesi B2P2TO-OT 2 dan aksesi B2P2TO-OT Campuran. Aksesi Purwokerto dan aksesi B2P2TO-OT 4 mempunyai kemiripan yang paling tinggi pada indeks kemiripan 90,90%

Selain menggunakan penanda ISSR, analisis keanekaragaman genetik pada aksesi tempuyung menggunakan penanda molekuler RAPD dan SRAP juga telah dilaporkan. Penanda molekuler SRAP mampu mengelompokkan beberapa aksesi menjadi satu kluster berdasarkan lokasi asal sampel atau tempat tumbuh yang sama (Subositi dan Mujahid, 2013a). Sementara itu, empat aksesi tempuyung yang berasal dari Tawangmangu menunjukkan tidak adanya keanekaragaman genetik berdasarkan 5 primer RAPD yang digunakan (Subositi dan Mujahid, 2013b). Menurut Shafie *et al.* (2011) tingkat kemiripan yang tinggi berkorelasi dengan kondisi tempat tumbuh yang sama atau mirip. Tiga aksesi B2P2TO-OT

menjadi satu klaster diduga karena berasal dari tetua yang sama, dibudidayakan dalam jangka waktu lama dan tumbuh pada kondisi lingkungan yang sama. Al-Rawashdeh (2011) menyatakan bahwa kemiripan atau kesamaan aksesi diduga karena adanya tetua yang sama. Variasi genetik tersebut diduga disebabkan oleh adanya perbedaan budidaya dan tetua aksesi tempuyung. Gupta *et al.* (2017) melaporkan bahwa aksesi *Acmella paniculata* (Asteraceae) yang berasal dari ketinggian yang sama mengelompok menjadi satu klaster berdasarkan penanda molekuler ISSR.

Kesamaan lokasi tumbuh bukan menjadi faktor utama dalam pengelompokan aksesi. Penelitian lain tentang keanekaragaman genetik yaitu pada tanaman teh menunjukkan bahwa pengelompokan 40 varietas teh umumnya tidak berdasarkan asal wilayah. Hal tersebut diduga disebabkan oleh adanya variasi diskontinu hibridisasi jangka panjang, penyerbukan silang, dan efek lingkungan (Liu *et al.*, 2012). Aksesi tempuyung yang diteliti mempunyai keanekaragaman genetik sedang. Suatu spesies dengan keanekaragaman genetik yang tinggi diduga dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain sejarah atau asal-usul spesies, ekogeografi, ketinggian, curah hujan, temperatur, dan isolasi genetik (Kumar and de Britto, 2012). Genus *Sonchus* merupakan kelompok spesies kompleks yang menunjukkan variasi yang tinggi, terutama pada karakter morfologi (Elkamali *et al.*, 2011). Cara perbanyakan dan pemencaran suatu spesies merupakan salah satu faktor yang berpengaruh terhadap tingkat keanekaragaman genetik. Spesies yang bereproduksi secara generatif umumnya mempunyai keanekaragaman

genetik yang tinggi. Rahimmalek (2012) melaporkan dua spesies dari familia Asteraceae, yaitu *Achillea tenuifolia* yang perbanyakannya secara generatif biji ternyata menunjukkan keanekaragaman yang tinggi dibandingkan dengan *Achillea millefolium* yang perbanyakannya secara vegetatif menggunakan rimpang. Perbedaan keanekaragaman genetik ini dianalisis berdasarkan penanda molekuler ISSR.

Informasi keanekaragaman genetik tempuyung (*S. arvensis*) berdasarkan ISSR di Indonesia tersebut merupakan data pertama yang dipublikasikan. Informasi keanekaragaman genetik tempuyung merupakan salah satu data untuk mendukung standarisasi tanaman tersebut sebagai bahan baku jamu serta penelitian lebih lanjut mengenai pengembangan aksesinya. Penanda molekuler ISSR dapat digunakan untuk identifikasi secara molekuler pada tempuyung.

Simpulan

Tempuyung yang dikoleksi dari 8 lokasi mempunyai keanekaragaman genetik sedang sebesar 75,16 - 90,90%. Faktor yang diduga berpengaruh adalah lokasi asal dan cara pemencaran tempuyung. Informasi keanekaragaman genetik dapat digunakan sebagai data awal dalam rangka standarisasi tanaman obat.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini merupakan salah satu bagian penelitian yang dibiayai oleh DIPA Tahun 2012 Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tumbuhan Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT), Badan Litbang Kesehatan.

Daftar Referensi

- Abatel, T. & Tesfaye, K., 2017. Genetic Diversity in Quarin clover (*T. quartianum*) accessions of Ethiopia Using ISSR Markers. *Advances in Life Science and Technology*, 55: 23-33.
- Abdelmigid, H.M., 2012. Efficiency of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Inter-simple Sequence Repeats (ISSR) Markers for Genotype Fingerprinting and Genetic Diversity Studies in Canola (*Brassica napus*). *African Journal of Biotechnology* 11(24): 6.409-6.419.
- Almeida-Pereira, C.S., Silva, A.V.C., Alves, R.P., Feitosa-Alcantara, R.B., Arrigoni-Blank, M.F., Alvares-Carvalho, S.V., Costa, T.S., White, L.A.S., Pinto, V.S., Sampaio, T.S. & Blank, A.F., 2017. Genetic Diversity of Native Populations of *Croton tetradenius* Baill Using ISSR Markers. *Genetic Moleculer Research*, 16(2): 1-12.
- Al-Rawashdeh, I.M., 2011. Genetic Variability in a Medicinal Plant *Artemisia judaica* Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *International Journal of Agriculture & Ecology*, 13:279-282.
- Backer, C.A. & van den Brink, R.C.B., 1968. *Flora of Java (spermatophytes only)* Volume 2, Walters Nordoff, NY Groningen, The Netherlands.
- Denduangboripant, J., Setaphan, S., Suwanprasat, W. & Panha, S., 2010. Determination of Local Tobacco Cultivars Using ISSR Molecular Marker. *Chiang Mai Journal of Science*, Vol. 37(2): 293-303.
- Elkamali, H.H., El-Kheir M.S.M., Habeballa R.S., Hamaza, N.B., Abdalla, I.E., Ahmedani E.I., Mohammed, A.A.S., Abuzaid, B.A.A., Mohammed, M.B. & Ahmed, T.Y., 2011. Genetic Relationships of Two *Sonchus* Species Collected from Two Locations in Khartoum State Using RAPD Markers.

- Current Research Journal of Biological Sciences*, 3(2): 95-99.
- Fu, X.P., Ning, G.G., Gao, L.P. & Bao, M.Z., 2008. Genetic Diversity of *Dianthus* Accessions as Assessed Using Two Molecular Marker Systems (SRAPs and ISSRs) and Morphological Traits. *Scientia Horticulturae* 117: 263– 270.
- Gupta, D.D., Hui, P.K. & Tag, H., 2017. Molecular Characterization of *Acmella paniculata* (Asteraceae) from Arunachal Himalayan Region through RAPD and ISSR Markers. *Journal of Basic and Applied Plant Sciences*, 1(1): 1-7.
- Khan R.A. 2012 Evaluation of Flavonoids and Diverse Antioxidant Activities of *Sonchus arvensis*. *Chemistry Central Journal*, 6 (126) : 1-7.
- Kumar, P.B.J.R. & de Britto, A.J., 2012. Population Genetic Differentiation of *Heliotropium indicum* as Revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Analysis. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*: 2(1): 248-253.
- Li, A. & Ge, S., 2001. Genetic Variation and Clonal Diversity of *Psammochloa villosa* (Poaceae) Detected by ISSR Markers. *Annals of Botany*, 87: 585-590.
- Liu, B., Sun, X., Wang, Y., Li, Y., Cheng, H., Xiong, C. & Wang, P., 2012. Genetic Diversity and Molecular Discrimination of Wild Tea Plants from Yunnan Province based on Inter-simple Sequence Repeats (ISSR) Markers. *African Journal of Biotechnology* 11 (53):11566-11574.
- Mansyah, E., Sobir, Santosa, E. & Poerwanto, R., 2010. Assesment of Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Technique in Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) Grown in Different Sumatra region. *Journal of Horticulture and Forestry*, Vol. 2(6):127-134
- Meng, L., Yang, H.X., Mao, P.C., Gao, H.W., & Sun, F.D., 2011. Genetic Diversity Analysis of *Arrhenatherum elatius* germplasm with Inter-simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. *African Journal of Biotechnology* 10(44): 8729-8736.
- Miah G., Rafii, M.Y., Ismail, M.R., Puteh, A.B., Rahim, H.A., Islam, K.N., & Latif, M.A., 2013. A Review of Microsatellite Markers and Their Applications in Rice Breeding Programs to Improve Blast Disease Resistance. *International Journal of Molecular Science*, 14(11): 22499-2252.
- Noorani, A., Mondini, L., Rey, N.A., Crino P. 2013. Morphological Diversity Assessment In Wild and Cultivated Cardoons. *Acta Horticulturae*, 983 : 47-54.
- Panahi, B., & Neghab M.G., 2013. Genetic Characterization of Irania Safflower (*Carthamus tinctorius*) Using Inter Simple Squence Repeats (ISSR) Markers. *Physiol Mol Biol Plants*, 19(2):239-243.
- Prasanth, N., Yugander, A. & Bhavanil, N.L., 2015. DNA Isolation and PCR Amplification of Turmeric Varieties from Telangana Stat. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(5): 485-490.
- Rahimmalek, M., 2012. Genetic Relationships Among *Achillea tenuifolia* Accessions Using Molecular and Morphological Markers. *Plant Omics Journal*, 5(2): 128-135
- Shafie, SB., Hasan, S.M.Z., Zain, A.M. & Shah, R.M., 2011. RAPD and ISSR Markers for Comparative Analysis of Genetic Diversity in Wormwood Capillary (*Artemisia capillaris*) from Negeri Sembilan, Malaysia. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(18): 4426-4437.
- Sousa, A.G.R, Souza, M.M., Melo, C.A.F & Sodre, G.A. 2015. ISSR Markers in Wild Species of Passiflora L. (Passifloraceae) as a Tool for Taxon Selection in Ornamental Breeding. *Genetics and Molecular Research* 14 (4): 18534-18545.
- Subositi, D. & Mujahid, R., 2013a. Karakterisasi Genetik Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) Berdasarkan Penanda Molekuler Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP). *Jurnal Biologi Indonesia* 9(2): 2013.
- Subositi, D. & Mujahid, R., 2013b. Genetic Diversity of Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) Using Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD). *International Seminar Proceedings: Forests & Medicinal Plants for Better Human Welfare*
- Svitlana, Z., Oksana, F., Igor, O., Rahmans, I.U., Khan, W. & Ali, K., 2018. Palyno morphological Study of the Genus *Sonchus* L. (Asteraceae) Species of the Flora of Ukraine. *International Journal of Biosciences*, 12 (4): 134-144.
- Xiang, Z.X.I.A., & Yu, L.J., 2010. Steroids and Phenols from *Sonchus arvensis*. *Chin Journal of Natural Medicines* 8(4): 267-269.