

KERAGAMAN GENETIK AKSESI EKINASE (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) HASIL SELEKSI MASSA TAHUN I MELALUI ANALISIS RAPD

Genetic Diversity of Ekinase Accessions (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) from Mass Selection year I using RAPD analysis

Dyah Subositi dan Yuli Widiyastuti

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional
Badan Litbang Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI
Jl. Raya Lawu, Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah
Email: dyah.subositi@gmail.com

Abstract

Ekinase (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) is a medicinal plant that has immunostimulatory activity. This plant has been cultivated in Tawangmangu region by the Department of Medicinal Plant and Traditional Medicine Research and Development since 2002. Based on their morphological variations, ten accessions of *E. purpurea* were found, three were selected as promising accessions namely BH2, BHU3 and BHU5. The objective of this research was to observe the genetic diversity of those accessions and 8 variants accession from mass selection at first year using RAPD analysis. Those accessions were amplified using 10 RAPD primers (OPA-6, OPA-10, OPA-16, OPA-17, OPA-18, OPA-19, OPB-4, OPE-5, OPE-6 and OPH-13). A total of 64 scorable fragments were generated from 9 of 10 RAPD primers, among which 48 fragments (75%) were polymorphic. The Dice coefficient was used to calculate the genetic similarity and UPGMA was used to generate the dendrogram. The genetic similarity index among accessions ranged from 75.49-84.21% thus indicating that low level of genetic diversity. RAPD analysis proved to be efficient for genetic diversity of ekinase accessions from mass selection year I.

Key words : Ekinase, *Echinacea purpurea*, genetic diversity, mass selection year I

Abstrak

Ekinase (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) dikenal sebagai tanaman obat yang mempunyai aktivitas imunostimulan. Ekinase pertama kali ditanam di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional pada tahun 2002. Sebanyak 10 aksesi ekinase yang berbeda secara morfologi telah dikarakterisasi dan dipilih 3 aksesi ekinase sebagai aksesi unggulan (BH2, BHU3 dan BHU5). Penelitian ini bertujuan untuk melihat keragaman genetik aksesi hasil seleksi massa tahap 1 dari 3 aksesi unggulan dan 8 varian aksesi berdasarkan analisis RAPD. Amplifikasi DNA menggunakan 10 primer RAPD (OPA-6, OPA-10, OPA-16, OPA-17, OPA-18, OPA-19, OPB-4, OPE-5, OPE-6 dan OPH-13). Sebanyak 64 fragmen DNA dihasilkan 9 dari 10 primer RAPD tersebut dan 48 fragmen di antaranya merupakan fragmen polimorfik (75%). Indeks kemiripan genetik dihitung menggunakan koefisien Dice dan konstruksi dendrogram menggunakan UPGMA. Indeks kemiripan genetik pada seluruh aksesi sebesar 75,49-84,21%, hal tersebut menunjukkan tingkat keragaman genetik yang sempit. Analisis RAPD mampu menunjukkan adanya keragaman genetik pada aksesi ekinasi hasil seleksi massa tahun I.

Kata kunci : Ekinase, *Echinacea purpurea*, keragaman genetik, seleksi massa tahun I

PENDAHULUAN

Marga *Echinacea* merupakan anggota dari suku Asteraceae dan mempunyai sembilan jenis yang berasal dari Amerika Utara. Tiga jenis dari marga ini dikenal mempunyai nilai ekonomi dan berkhasiat sebagai tumbuhan obat yaitu *Echinacea purpurea* (L.) Moench (*purple coneflower*), *E. pallida* (Nutt.) Nutt. (*pale coneflower*) dan *E. angustifolia* DC (*prairie coneflower*) (Bishnoi *et al.*, 2010). *Echinacea purpurea* atau ekinase banyak digunakan sebagai tanaman obat, hias dan bunga potong (Fateh *et al.*, 2012). Kandungan fitokimia dalam ekinase dan varietasnya antara lain golongan senyawa metabolit sekunder yang hampir sama yaitu derivat asam kafeat, alkamid, flavonoid, minyak esensial, poliasetilen yang mempunyai aktivitas medis tetapi belum diidentifikasi secara tepat hubungannya. Senyawa turunan asam kafeat dan alkamid terbukti mempunyai efek imunoregulator (Matthias *et al.*, 2008; Thygesen *et al.*, 2007). Ekinase juga mempunyai efek antioksidan (Lee *et al.*, 2009)

Ekinase pertama kali ditanam di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT) pada tahun 2002. Pada tahun 2010 telah dikarakterisasi sebanyak 10 aksesi ekinase yang berbeda secara morfologi terutama pada perbungaan, kandungan fenol total serta juga berbeda secara genetik (Subositi dan Fauzi, 2011). Tiga aksesi yaitu BH2, BHU3 dan BHU5 merupakan aksesi unggulan untuk seleksi massa/pemurnian aksesi tahap 1 pada tahun 2011. Seleksi massa tahap I pada aksesi ekinase tersebut menghasilkan sebanyak 8 varian yang terdiri atas 6 varian aksesi dari aksesi BH2 dan 2 varian aksesi dari aksesi BHU3 yang berbeda secara morfologi dengan induknya terutama pada karakter perbungaan.

Keanekaragaman genetik pada suatu jenis sangat penting digunakan untuk menggambarkan daya adaptasi, seleksi genotip untuk merakit varietas baru, sidik genetik dan manajemen plasma nutfah. Karakter morfologi merupakan karakter yang banyak digunakan sebagai langkah awal untuk identifikasi dan analisis keanekaragaman genetik, karena karakter ini mudah diamati. Karakter morfologi mempunyai keterbatasan yaitu membutuhkan waktu pengamatan yang lama dan membutuhkan ketelitian dan kemampuan dalam mempertelakan saat di lapangan serta mudah terpengaruh oleh kondisi lingkungan (Fu *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2011). Perkembangan teknik penanda molekuler memungkinkan untuk

menganalisis genom secara langsung dan akurat sehingga dapat meminimalisasi kesalahan akibat faktor lingkungan.

Berbagai macam teknik penanda molekuler juga telah banyak digunakan untuk karakterisasi dan identifikasi varietas pada tumbuhan, antara lain *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), Mikrosatelit atau *Simple Sequence Repeats* (SSRs) dan lainnya. RAPD merupakan penanda molekuler yang umum dan populer digunakan untuk analisis keragaman genetik (Abdelmigid, 2012; Amri dan Mamboya, 2012). Penanda molekuler RAPD menggunakan primer oligonukleotida pendek (umumnya 10 pasangan basa) dan mempunyai sekuen acak (Baig *et al.*, 2009).

Penanda molekuler RAPD merupakan metode efektif yang umum digunakan oleh peneliti untuk identifikasi variasi genetik dalam jenis maupun antar jenis 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, (5) Biaya lebih murah dan tidak menggunakan radioaktif (Hasan *et al.*, 2009; Hasnaoui *et al.*, 2010; Resmi dan Sreelakathakumary, 2011). Penggunaan RAPD sebagai penanda molekuler telah banyak digunakan di Indonesia untuk penelitian antara lain identifikasi aksesi jarak pagar (Susantidiana *et al.*, 2009), identifikasi varietas kentang (Runtunuwu *et al.*, 2011), keragaman genetik *Amorphophallus muelleri* (Poerba dan Martanti, 2008).

Penelitian ini bertujuan untuk melihat keragaman genetik aksesi hasil seleksi massa tahap 1 dari 3 aksesi unggulan (BH2, BHU3 dan BHU5) dan 8 varian aksesi berdasarkan penanda molekuler RAPD untuk mendukung standarisasi tumbuhan obat.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Waktu Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah tiga aksesi unggulan ekinase (BH2, BHU3 dan BHU5) dan 8 varian aksesi (BH2 Va-Vf dan BHU3 Va-Vb). Penelitian ini berlangsung selama bulan Agustus-Desember 2011.

Isolasi dan kuantifikasi DNA

Daun muda ekinase sebanyak 0,1 gram disimpan pada freezer -80°C kemudian diisolasi menggunakan protokol dan kit isolasi DNA (*Sigma GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit*). Hasil isolasi DNA genom ekinase diencerkan 1000 X dan diukur absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm ($\lambda_{260/280}$) menggunakan spektrofotometer untuk menentukan kemurnian dan konsentrasi DNA.

Amplifikasi (PCR/ Polymerase Chain Reaction)

Amplifikasi DNA aksesi ekinase dan variannya menggunakan 10 primer RAPD (Tabel 1). Sebanyak 2 μl *template* (30 ng DNA genom), 1 μl primer, 12,6 μl PCR Mix, kemudian ditambah *distilled water* sampai volume 25 μl . Campuran tersebut dimasukkan dalam *Thermocycler* (BioRad) dengan program sebagai berikut: pre-denaturasi 94°C selama 5 menit, dilanjutkan sebanyak 39x siklus yang terdiri dari tahap denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* $35-37^{\circ}\text{C}$ (tergantung primer) selama 1 menit dan elongasi 72°C selama 2 menit, kemudian dilanjutkan *extention* 72°C selama 8 menit dan pada 4°C sebagai *holding temperature*.

Elektroforesis

Produk amplifikasi dicek menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,8% yang telah diberi *SYBR safe green* pada 70-80 volt selama 100 menit. Visualisasi hasil elektroforesis menggunakan sinar UV pada alat *Gel Documentation System* (BioRad).

Analisis Data

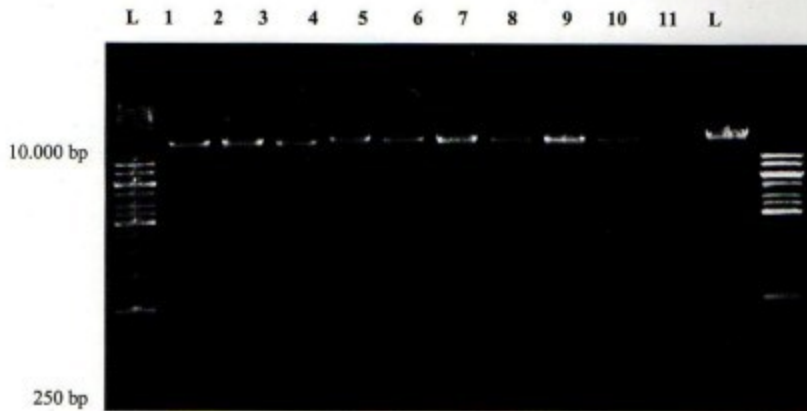
Data diperoleh dari hasil visualisasi fragmen DNA tiap aksesi ekinase pada primer RAPD

yang berbeda. Bila terdapat fragmen diberikan skor 1 dan bila tidak terdapat fragmen diberi skor 0. Indeks similaritas dihitung menggunakan rumus indeks similaritas Dice kemudian disusun analisis kelompok (*cluster analysis*) dan konstruksi dendogram dilakukan dengan menggunakan metode *Unweighted Pair Grup Method Using Arithmetic Method* (UPGMA). Analisis data tersebut menggunakan program komputer (*software*) NTSYS ver 2.02 (Rohlf, 1998).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi massa tahap I pada aksesi ekinase tersebut menghasilkan sebanyak 8 varian yang terdiri atas 6 varian aksesi dari aksesi BH2 dan 2 varian aksesi dari aksesi BHU3 yang mempunyai perbedaan mencolok secara morfologi dengan induknya terutama pada karakter perbungaan. Aksesi BHU5 tidak mempunyai varian aksesi karena anakan yang dihasilkan hampir seragam atau hanya mempunyai perbedaan karakter morfologi yang sedikit terutama karakter yang bersifat kuantitatif. Adanya varian baru tersebut kemungkinan disebabkan seleksi massa menggunakan biji/benih sehingga menghasilkan sebagian keturunan mempunyai sifat yang berbeda dengan induknya. Baum *et al.* (1999) menyatakan bahwa ekinase yang dihasilkan secara generatif memperlihatkan variabilitas genetik yang tinggi.

Isolasi DNA genom 3 aksesi ekinase dan 8 varian aksesi menghasilkan pita DNA yang bersih dengan nilai nilai 1,20-1,40 (Gambar 1). Hal tersebut menunjukkan DNA genom ekinase mempunyai kualitas yang cukup bagus dan dapat diamplifikasi menggunakan primer RAPD.



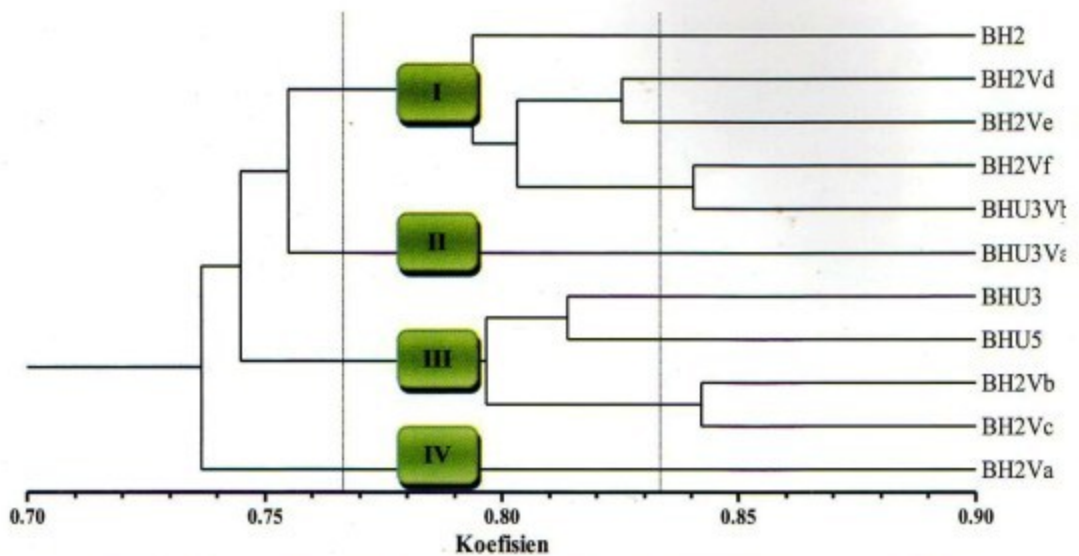
Gambar 1. DNA genom F1 aksesi ekinase menggunakan kit isolasi DNA; L:Ladder1 kb (Fermentas), Lane1: aksesi F1-BH2, 2: aksesi F1-BHU3, 3: aksesi F1-BHU5, 4-9: aksesi F1-BH2-Va, Vb, Vc, Vd, Ve dan Vf, 10-11: aksesi F1-BHU3-Va dan Vb

DNA genom tersebut kemudian diamplifikasi menggunakan penanda molekuler RAPD. Sebanyak 10 primer RAPD yang digunakan dan hanya 9 primer yang berhasil mengamplifikasi dan menghasilkan 64 fragmen DNA dan disertakan dalam analisis (Tabel 2). Amplifikasi menggunakan primer OPA-17 menghasilkan satu fragmen monomorfik dengan ukuran 800 bp (pasangan basa). Fragmen tersebut

disertakan dalam analisis karena amplifikasi menghasilkan fragmen meskipun merupakan fragmen monomorfik. Penelitian Rout (2006) tentang identifikasi dan variasi 15 klon Brotowali di India menggunakan 40 primer RAPD, 15 primer digunakan untuk analisis genetik termasuk di dalamnya primer OPB-16 yang menghasilkan 8 fragmen yang seluruhnya monomorfik.

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

No	Nama Primer	Sekuens (5'→3")	Ta Optimal (°C)	Total Fragmen teramplifikasi	Fragmen Monomorfik	Prosentase Polimorfisme (%)
1	OPA-6	GGTCCCTGAC	-	0	0	0
2	OPA-10	GTGATCGCAG	36	10	2	80
3	OPA-16	AGCCAGCGAA	37	6	1	83,33
4	OPA-17	GACCGTTGT	36	1	1	0
5	OPA-18	AGGTGACCGT	36	10	3	70
6	OPA-19	CAAACGTCGG	35	4	1	75
7	OPB-4	GGACTGGAGT	36	7	2	71,43
8	OPE-5	TCAGGGAGGT	35	6	2	66,67
9	OPE-6	AAGACCCCTC	36	9	2	77,78
10	OPH-13	GAGCCACAC	36	11	2	81,82
Jumlah				64	16	
Rata-rata				7,1		75



Gambar 3. Dendrogram 11 aksesi ekinase berdasarkan 10 penanda molekuler RAPD

Penanda molekuler RAPD mampu menunjukkan adanya keragaman genetik pada 3 aksesi ekinase dan 8 varian aksesi pada indeks kemiripan sebesar 75,49-84,21%. Hal tersebut mengindikasikan keragaman genetik yang sempit antar aksesi ekinase. Varian-varian aksesi BH2 dan BHU3 umumnya terpisah dari aksesi utamanya (induk) seperti aksesi BH2-Va, aksesi BH2-Vb dan aksesi BH2-Vc mempunyai klaster tersendiri dan terpisah dari aksesi utama BH2 (Gambar 4). Menurut Asolkar *et al.* (2011), genotip yang terpisah jauh dari klaster utama induknya dan membentuk klaster tersendiri menunjukkan adanya fenomena alami untuk menurunkan keragaman baru melalui rekombinasi genetik acak.

Adanya variasi genetik dan variasi morfologi dari hasil seleksi massa dan pemurnian tahap I pada aksesi ekinase BH2, BH3 dan BHU5 kemungkinan disebabkan sifat *self-incompatibility* pada ekinase. Biji yang dihasilkan ekinase berasal dari penyerbukan silang sehingga menghasilkan keragaman morfologi yang masih besar. Menurut Chen *et al.* (2008), ekinase merupakan tumbuhan dengan penyerbukan silang dan cenderung bersifat *self-incompatibility* sehingga keragaman morfologi dan agronomi sangat besar bahkan terkadang tidak diharapkan. Oleh karena itu, seleksi massa berkelanjutan dan program pemurnian sangat diperlukan untuk mengurangi heterogenitas pada karakter morfologi dan agronomi pada populasi ekinase yang dibudidayakan.

Pengelompokan beberapa varian yang terpisah dari induknya kemungkinan disebabkan terbatasnya jumlah primer RAPD yang digunakan untuk analisis. Penambahan jumlah dan seleksi primer memungkinkan pola pengelompokan yang berbeda dan lebih jelas pengelompokan varian aksesi dan induknya pada klaster yang sama.

Varian-varian aksesi yang berbeda secara morfologi dengan aksesi induknya (aksesi BH2, BHU3 dan BHU5), mempunyai keragaman genetik yang ditunjukkan dengan polimorfisme menggunakan RAPD. Sidik molekuler merupakan teknik yang memudahkan untuk mengkaji kemurnian dan stabilitas genotip yang merupakan langkah pertama untuk *breeding* dan atau program perbanyakan biji, serta mengurangi duplikasi koleksi plasma nutfah. Kelebihan penanda molekuler lainnya yaitu dapat menganalisis keragaman genetik, mengurangi biaya pemeliharaan plasma nutfah dan menghilangkan variasi faktor lingkungan bila dibandingkan dengan karakter morfologi (Zappacosta *et al.*, 2011).

Penanda molekuler RAPD mampu menunjukkan adanya keragaman genetik pada aksesi ekinase terpilih hasil seleksi massa tahun I yaitu aksesi BH2, BHU3 dan BHU5 yang telah menghasilkan 8 varian yang berbeda secara morfologi. Adanya varian-varian aksesi tersebut menunjukkan bahwa proses untuk seleksi massa dan pemurnian aksesi harus dilakukan secara bertahap agar diperoleh aksesi unggulan dalam rangka standarisasi tanaman obat.

KESIMPULAN

Penanda molekuler RAPD dapat digunakan untuk analisis keragaman genetik pada aksesi ekinase terpilih hasil seleksi massa tahun I yaitu aksesi BH2, BHU3 dan BHU5 yang telah menghasilkan 8 varian yang berbeda secara morfologi. Aksesi ekinase tersebut mempunyai keragaman genetik yang sempit antar aksesi dengan indeks kemiripan sebesar 75,49-84,21%.

UCAPAN TERIMAKASIH

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

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelmigid, HM. 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): 6409-6419.
- Amri, E. and F. Mamboya. 2012. Genetic diversity in *Pterocarpus angolensis* populations detected by random amplified polymorphic DNA markers. *International Journal of Plant Breeding and Genetics* 6(2): 105-114.
- Asolkar, T., AR. Desai and NP. Singh. 2011. Molecular analysis of cashew genotypes and their half-sib progeny using RAPD marker. *Journal of Agricultural Technology* 7(4):1097-1106.
- Baig, MNR., S. Grewal and S. Dhillon. 2009. Molecular characterization and genetic diversity analysis of citrus cultivars by RAPD markers. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 33: 375-384, doi:10.3906/tar-0804-27.
- Baum, BR., SE. Binns, S. Mechanda, JT. Arnason, 1999. The *Echinacea* germplasm enhancement project. in: *Proceedings of the 1999 International Echinacea Symposium*, Jun 3-5, Kansas City, MO.
- Bishnoi, UR., J.E. Willis and S.R. Mentreddy. 2010. Methods to improve seed germination of purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench). *Agriculture and Biology Journal of North America* 1(3):185-188.
- Chen, CL., SC. Zhang and JM. Sung. 2008. Biomass and caffeoyl phenols production of *Echinacea purpurea* grown in Taiwan. *Experimental Agriculture* 44(4): 497-507. doi:10.1017/S0014479708006753.
- Faleiro, FG., ACQ. Pinto, MCR. Cordeiro, SRM. Andrade, VHV. Ramos, G. Belon and JN. Dias. 2009. Genetic variability of mango cultivars developed by *Embrapa Cerrados* breeding program using RAPD markers. *Acta Horticulturae* 820: 177-182.
- Fateh E., N. Malekpourlashkariani and F. Gerami, 2012. Effects of various treatments on *Echinacea purpurea* L. seed dormancy breaking and germination. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences* 2(3):188-194.
- Fu, XP., GG. Ning, LP. Gao and MZ. Bao. 2008. Genetic diversity of *Dianthus* accessions as assessed using two molecular marker systems (SRAPs and ISSRs) and morphological traits. *Scientia Horticulturae* 117(3): 263-270.
- Hasan, SMZ., M. Shafie, B. Shafie and RM. Shah. 2009. Analysis of random amplified polymorphic DNA (RAPD) of *Artemisia capillaries* (wormwood capillary) in East Coast of Peninsular Malaysia. *World Applied Sciences Journal* 6(7): 976-986.
- Hasnaoui, N., M. Messaoud, J. Chibani and M. Trifi. 2010. Molecular polymorphisms in Tunisian pomegranate (*Punica granatum* L.) as revealed by RAPD fingerprints. *Diversity* 2(1): 107-114.
- Kusumadewi, Y., YS. Purba dan T. Partomihardjo. 2010. Keragaman genetika ramin [*Gonystylus bancanus* (Miq.) Kurz] dari Provinsi Riau berdasarkan profil random amplified polymorphic DNA. *Jurnal Biologi Indonesia* 6(2): 173-183.
- Lee, TT., CL. Chen, Z.H. Shieh, JC. Lin and B. Yu. 2009. Study on antioxidant activity of *Echinacea purpurea* L. extracts and its impact on cell viability. *African Journal of Biotechnology* 8(19): 5097-5105.
- Matthias, A., L. Banbury, KM. Bone, DN. Leach and R.P. Lehmann. 2008. *Echinacea* alkylamides modulate induced immune responses in T cells. *Fitoterapia* 79(1): 53-58.

- Meng, L., HX. Yang, PC. Mao, HW. Gao and F.D. Sun. 2011. Genetic diversity analysis of *Arrhenatherum elatius* germplasm with inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology* 10(44): 8729-8736.
- Noormohammadi Z., FS. Jesvaghani, M. Sheida, F. Farahani and O. Alishah, 2011. Inter simple sequence repeats (ISSR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses of genetic diversity in Mehr cotton cultivar and its crossing progenies. *African Journal of Biotechnology* 10(56): 11839-11847.
- Poerba, YS. dan D. Martanti. 2008. Keragaman genetik berdasarkan marka random amplified polymorphic DNA pada *Amorphophallus muelleri* Blume di Jawa. *Biodiversitas* 9(4): 245-249.
- Resmi, J. and I. Sreelathakumary. 2011. RAPD markers for genetic variability studies in ashgourd *Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn. *Journal of Agricultural Technology* 7(4): 1097-1106.
- Rohlf, FJ. 1998. *NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.00*. Exeter Software, Setauket, New York.
- Rout, ZN. 2006. Identification of *Tinospora cordifolia* (Willd.) Miers ex Hook.f. & Thomas Using RAPD Markers. *Zeitschrift fur Naturforschung Section C, Biosciences* 61(1/2): 118-122.
- Runtunuwu, DS., JEX. Rogi dan JH. Palendeng. 2011. Identifikasi varietas kentang "SuperJohn" berdasarkan penanda RAPD (*random amplified polymorphic DNA*). *Eugenia* 17(1):52-59.
- Subositi, D. and Fauzi. 2011. Morphological variation of *Echinacea purpurea* (L.) Moench accessions in Medicinal Plant and Traditional Medicine Research and Development Office. *Proceedings of The 2nd International Symposium on Temulawak*. The 40th meeting National Working Group on Indonesian Medicinal Plants. Biopharmaca Research Center.
- Susantidiana, A. Wijaya, B. Lakitan dan M. Surahman. 2009. Identifikasi beberapa aksesori jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) melalui analisis RAPD dan morfologi. *Jurnal Agronomi Indonesia* 37(2): 167- 173.
- Thygesen, L., J. Thulin, A. Mortensen, LH. Skibsted and P. Molgaard. 2007. Antioxidant activity of cichoric acid and alkamides from *Echinacea purpurea*, alone and in combination. *Food Chemistry* 101(1): 74-81.
- Zappacosta, D., M. Meier, A. Carrera, G. Pacheco, S. Cardone, JP. Silva and V. Echenique. 2011. Molecular markers to study the variability within the *Eragrostis curvula* complex. *International Journal of Experimental Botany* 80(2): 211-220.