

## KARAKTERISASI MOLEKULER TANAMAN SAMBUNG NYAWA (*Gynura procumbens* [Lour.] Merr) BERDASARKAN 18S rRNA

Oktavia Dewi Christiningrum<sup>1</sup>, Anto Budiharjo<sup>2</sup>, Endang Kusdiyantini<sup>3</sup>  
email : [christi.oktavia@yahoo.com](mailto:christi.oktavia@yahoo.com)

Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro  
Jl. Prof. Sudarto, SH Tembalang Telp. / Fax. (024) 7474698 Semarang – 50275

### *Abstrak*

Sambung Nyawa (*Gynura procumbens*) merupakan tanaman obat tradisional yang digunakan masyarakat awam sebagai obat antihiperqlikemik, antihyperlipidemik dan agen kemoprevensi. Informasi lengkap tentang tanaman tersebut perlu dilakukan termasuk analisis DNA, sehingga dapat menjadi pelengkap atau alternatif untuk mengidentifikasi organisme secara morfologi. Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi secara molekuler dan mengetahui hubungan kekerabatan antara *G. procumbens* dengan organisme lain menggunakan gen ribosomal 18S rRNA. Metode yang digunakan adalah PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk menentukan urutan 18S rRNA pada fragmen *G. procumbens*. Sekuen DNA dianalisis menggunakan program BLAST pada portal NCBI (National Center for Biotechnology Information) dan konstruksi pohon filogenetik diuji menggunakan *Bootstrap method* 1000x. Hasil penelitian menunjukkan karakter fragmen 18S rRNA *Gynura procumbens*, yaitu berukuran 1600 bp, termasuk karakter sinapomorfik dalam famili Asteraceae.

**Kata Kunci :** *Gynura procumbens*, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), 18S rRNA, *Bootstrap method*

### *Abstract*

Sambung Nyawa (*Gynura procumbens*) is a traditional medicinal plant used by people as an antihyperglycemic drug, antihyperlipidemic and chemoprevention agents. Comprehensive information on this plant needs to be done, including DNA analysis, so it can complement morphological character of an organisms. This study aimed to molecularly characterize and determine the relationship between *G. procumbens* with other organisms using ribosomal 18S rRNA gene. PCR (*Polymerase Chain Reaction*) was used to amplify the 18S rRNA gene fragments *G. procumbens*. DNA sequences were analyzed using the BLAST program at the NCBI portal and construction of phylogenetic trees were tested using *Bootstrap method* 1000x. The results showed the 18S rRNA sequence of *Gynura procumbens* fragments was 1600 bp, and *G. procumbens* belonged in the family of Asteraceae.

**Key words :** *Gynura procumbens*, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), 18S rRNA, *Bootstrap method*

## PENDAHULUAN

Tanaman obat didefinisikan sebagai jenis tanaman yang sebagian, seluruh tanaman dan eksudat tanaman tersebut digunakan sebagai obat. Departemen Kesehatan RI mendefinisikan tanaman obat sebagai tanaman atau bagian tanaman yang diekstraksi dan ekstrak tanaman tersebut digunakan sebagai obat. Tanaman obat tradisional telah banyak digunakan sebagai sumber utama obat di berbagai industri farmasi (Jothimanivannan *et al.*, 2010). Salah satu spesies tumbuhan yang dapat digunakan oleh masyarakat awam sebagai obat antihiperlipidemik, anti hiperlipidemik dan agen kemoprevensi yaitu *Gynura procumbens* atau yang lebih dikenal dengan tanaman Sambung Nyawa. Tanaman ini berasal dari famili Asteraceae, termasuk semak yang merupakan terna menahun dengan tinggi sekitar 20-60 cm, jika di memarkan akan menimbulkan bau aromatik. Penelitian mengenai karakterisasi morfologi tanaman Sambung Nyawa sudah banyak dilakukan, namun untuk karakterisasi secara molekuler belum banyak dilakukan. Gen 18S rRNA merupakan salah satu contoh dari beberapa teknik molekuler yang memiliki daerah *conserved* (tidak berubah dari satu organisme ke organisme lain) yang digunakan untuk, menentukan hubungan kekerabatan suatu organisme dengan organisme yang lain

melalui pohon filogenetik. Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi dan mengetahui hubungan kekerabatan antara *G. procumbens* dengan organisme lain menggunakan gen ribosomal 18S rRNA.

## METODOLOGI

Penelitian ini dilaksanakan di UPT Laboratorium Terpadu UNDIP dan Laboratorium Genetika Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro pada Oktober 2015.

### 1. Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun muda tanaman Sambung Nyawa yang diambil dari kebun koleksi tanaman obat PT. Industri Jamu dan Farmasi Sido Muncul, Tbk, Ungaran, Semarang. Daun muda diambil pada saat tanaman berumur 4 bulan.

### 2. Analisis Molekuler

#### a. Ekstraksi

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan metode Doyle and Doyle 1990. 2-Mercaptoetanol (2ME) harus ditambahkan segar ke bufer CTAB, misal akan mengekstrak 4 sampel, karena diperlukan 1 ml bufer CTAB per sampel, maka siapkan 5 ml bufer

CTAB (dilebihkan 1 ml, karena akan ada yang menempel di luar pipet tetes). Lalu ditambahkan 0,2% 2ME (0,2% berarti 0,2 ml atau 200  $\mu$ l dalam 100 ml, maka jika dalam 5 ml, ditambahkan 10  $\mu$ l 2ME). Pre-inkubasi 65<sup>0</sup>C. Sampel daun tanaman Sambung Nyawa digerus dengan berat 0,3 gram. Ditambahkan 1 ml bufer ekstraksi yang telah di pre-inkubasi dalam suhu 65<sup>0</sup>C, lalu diinkubasi dalam suhu 65<sup>0</sup>C selama 30 menit (selama 10 menit dilakukan penggojokkan). Sampel ekstrak daun tanaman Sambung Nyawa di sentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit, maka terdapat supernatan. Supernatan yang dihasilkan dipindahkan ke dalam tabung baru. Ditambahkan same volume kloroform : isoamilalkohol (CIA) 24:1 (maksudnya, jika diperoleh supernatant 500  $\mu$ l, maka tambahkan CIA 500  $\mu$ l), kemudian vortex. Di sentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Lapisan atas diambil dengan hati-hati, jangan sampai lapisan bawah terambil dan ditambahkan same volume isopropanol dingin. Selanjutnya di inkubasi dengan suhu -20<sup>0</sup>C selama 1-2 jam. Disentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm selama 5

menit. Supernatan dibuang, cuci pellet dengan 70% etanol (EtOH) lalu disentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm selama 5 menit. Dikering-anginkan dan ditambahkan dengan 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O steril/TE.

#### **b. Pengukuran Konsentrasi DNA**

Pengukuran konsentrasi DNA menggunakan nanodrop spektrofotometer. Pengukuran diawali dengan membersihkan bagian alas tempat meletakkan sampel (pedestal) menggunakan ddH<sub>2</sub>O, kemudian dilakukan pengukuran blanko sebanyak 1  $\mu$ l, kemudian klik *measurement* pada *software* PC. Setelah pengukuran blanko dilakukan pengukuran sampel DNA sebanyak 1  $\mu$ l, kemudian klik *measurement* pada *software* PC. Sebelum mesin dimatikan, *pedestal* dibersihkan kembali menggunakan ddH<sub>2</sub>O.

#### **c. PCR**

Amplifikasi daerah target 18S rRNA dilakukan menggunakan primer universal 18S rRNA. Primer tersebut yaitu primer Cur *forward* 18S (5'-CAA CCT GGT TGA TCC TGC CAG T-3') 22 bp dan primer Cur *reverse* (5'-CTG ATC CTT CTG

CAG GTT CAC CTA C-3') 25 bp (Cao *et al*, 2010). Amplifikasi dilakukan sebanyak 32 siklus, yaitu predenaturasi 94°C (3 menit), denaturasi 94°C (1 menit), annealing 52°C (1 menit), extention 72 °C (2,5 menit) dan post extention 72 °C (10 menit).

#### d. Sequencing

Hasil amplifikasi DNA *G. procumbens* dijadikan sampel dalam reaksi sekuensing dengan menggunakan jasa perusahaan Biologi Molekuler. Tahapan ini berguna untuk memperoleh data urutan nukleotida daerah target dari sampel *G. procumbens*.

#### e. Analisis Filogenetik

Urutan sekuens yang telah diperoleh dianalisis menggunakan *alignment* (penyejajaran) yang terdapat dalam *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada portal NCBI. Selanjutnya, pohon filogenetik dibuat menggunakan *software* MEGA 6.0. Pohon filogenetik dikonstruksi dengan *Test Neighborjoining tree* dan diuji dengan *Bootstrap method*.

Penelitian mengenai DNA tanaman Sambung Nyawa dimulai dengan isolasi menggunakan metode Doyle and Doyle 1990. Metode Doyle & Doyle merupakan protokol isolasi DNA yang paling umum digunakan karena konsentrasi DNA yang diperoleh relatif lebih banyak. Keuntungan lain dari metode ini adalah tidak membutuhkan waktu isolasi yang lama serta tahapan metode yang relatif lebih mudah dan cepat.

Hasil konsentrasi dan tingkat kemurnian DNA berdasarkan pengukuran absorbansi dengan menggunakan nanodrop dapat dilihat pada (Tabel 1).

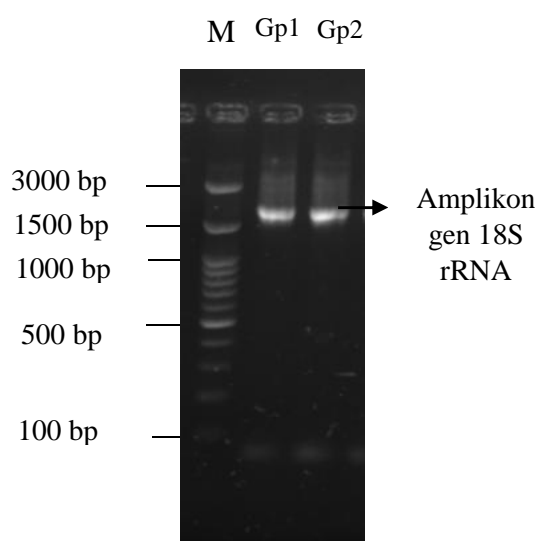
**Tabel 1.** Hasil Pengecekan Kualitas dan Kuantitas DNA Sambung Nyawa menggunakan Nanodrop Spektrofotometer

Kode Sampel	Kemurnian DNA	Konsentrasi DNA
Gp	1,86	29,9

Hasil pengukuran kualitas dan kuantitas DNA *G. procumbens* menunjukkan nilai kemurnian DNA 1,86 dan konsentrasi DNA yang diperoleh adalah 29,9 ng/ µl. Berdasarkan hasil data tersebut, rasio  $A_{260} / A_{280}$  pada sampel Gp menunjukkan tingkat kemurnian DNA yang baik, yaitu 1,8. Berdasarkan pernyataan Sambrook *et al.* (1989), DNA dikatakan murni apabila mempunyai angka  $A_{260} / A_{280}$  dalam kisaran 1,8-2,0.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

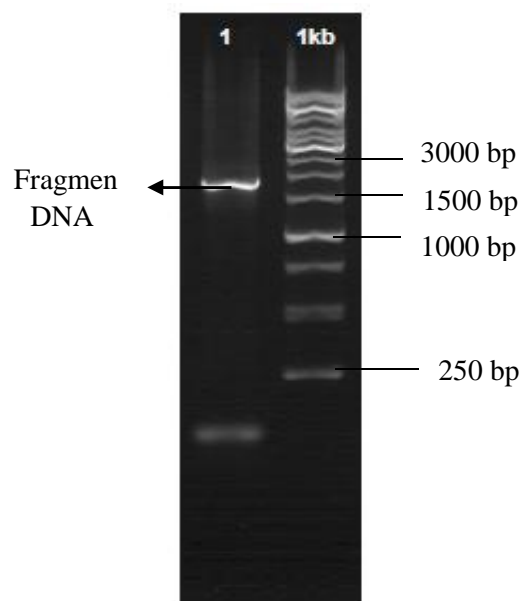
Hasil pengukuran kualitas dan kuantitas DNA *G. procumbens* selanjutnya digunakan dalam proses amplifikasi DNA dengan menggunakan urutan gen 18S rRNA. Hasil amplifikasi dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dipisahkan dengan elektroforesis gel agarosa dan secara langsung divisualisasikan setelah pewarnaan dengan EtBr (Etidium Bromida) (Gambar 1).



Gambar 4.1 Hasil Elektroforesis Amplikon Gen 18S rRNA *G. procumbens* dengan Suhu *Annealing* 52<sup>0</sup>C. (M) Marker 100 bp Ladder, (Gp1) *G. procumbens* ulangan 1, (Gp2) *G. procumbens* ulangan 2

Amplifikasi PCR DNA Sambung Nyawa menggunakan suhu *annealing* 52<sup>0</sup>C dengan primer *Cur Forward* dan *Cur Reverse* memberikan hasil yang baik dengan ditunjukkan adanya pita DNA pada gel agarosa. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa produk amplikon berada pada ukuran 1600 bp sesuai dengan target primer spesifik

yaitu 1668 bp. Amplifikasi PCR dalam penelitian ini berhasil dilakukan karena menggunakan primer yang cocok dan suhu *annealing* yang sesuai dengan *template* DNA, sehingga produk hasil amplifikasi dapat dilanjutkan ke tahap sekuensing.



Gambar 4.2 Hasil Purifikasi Produk Amplifikasi oleh 1<sup>st</sup> BASE

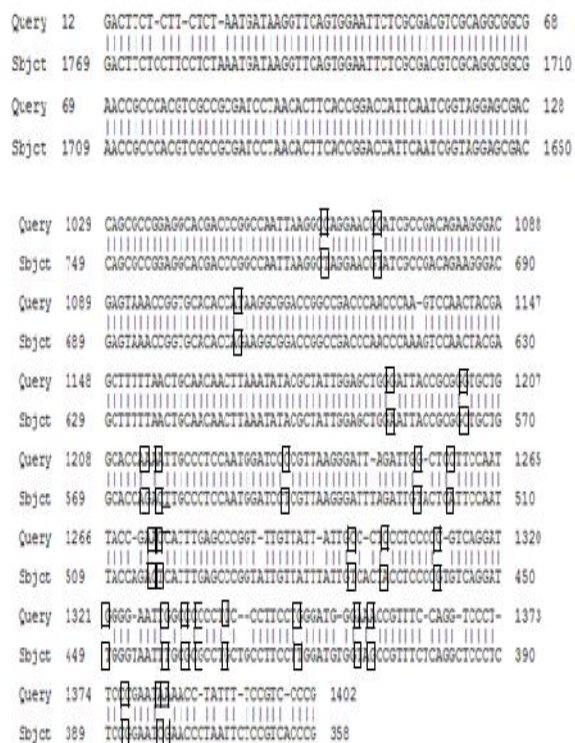
Hasil elektroforesis gel agarosa 0,8% menunjukkan bahwa pita produk amplifikasi yang akan disekuensing berada pada ukuran 1.600 bp. Data yang diperoleh kemudian digunakan pada program BLAST (*Basic Local Aignment Search Tool*). Hasil blast dengan menggunakan data dari NCBI terlihat pada (Tabel 4.2) mempunyai identitas kemiripan berkisar 96% sampai 97%. Berdasarkan penelitian Muzuni *et al*, (2014), hal ini menunjukkan bahwa belum

tersedianya urutan fragmen gen 18S rRNA *Gynura procumbens* di genbank.

**Tabel 4.2** Hasil BLAST NCBI *Gynura procumbens*

Nama Galur	E-Value	Coverage
<i>Heterotheca villosa</i> voucher Kellar 1379	0	97%
<i>H.stenophylla</i> voucher Steele 1350	0	97%

Tabel 4.2 menunjukkan bahwa *G. procumbens* memiliki hubungan evolusi dan kemiripan paling dekat dengan *Heterotheca villosa* voucher Kellar 1379. Nilai E-value yang dihasilkan bernilai 0 yang berarti sampel identik dengan spesies pembandingan. Nilai E-value merupakan nilai dugaan yang memberikan ukuran statistik yang signifikan terhadap kedua sekuen. Semakin tinggi nilai E-value maka semakin rendah homologi antar sekuen, sedangkan semakin rendah nilai E-value maka semakin identik (E-value bernilai (0) homologi antar sekuen. Hasil blast 18S rRNA *G. procumbens* ditunjukkan pada Gambar 4.5.



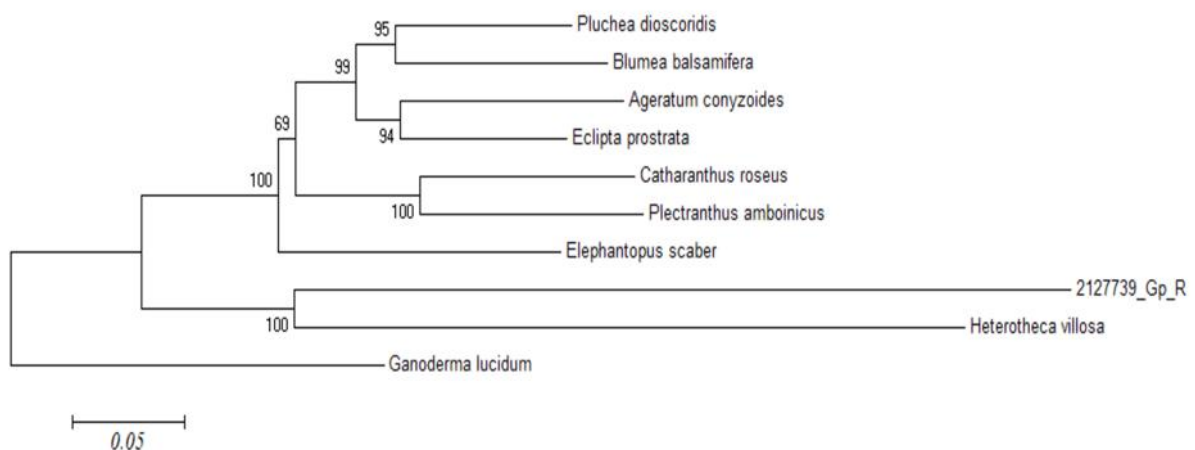
Gambar 4.5 Hasil Blast 18S rRNA *G. procumbens*

Keterangan : tanda | : homologi (kesamaan)  
□ : variasi nukleotida  
--- : daerah gap

Berdasarkan hasil blast pada Gambar 4.5 sekuen yang diperoleh menunjukkan nilai homologi sebesar 97 % pada gen ribosomal 18S rRNA *G. procumbens* dengan *Heterotheca villosa* (data GenBank). Nilai homologi tersebut kurang dari 99 %, hal ini menunjukkan bahwa spesies tersebut adalah spesies yang berbeda dari *G. procumbens*. Data hasil alignment pada Gambar 4.5 menunjukkan bahwa terdapat variasi nukleotida yang cukup banyak pada gen

ribosomal 18S rRNA *G. procumbens* dengan *Heterotheca villosa* (data GenBank). Hal ini dikarenakan *G. procumbens* bukan bagian dari *Heterotheca villosa*, sehingga ditemukan perbedaan nukleotida yang cukup banyak. Variasi nukleotida terjadi karena adanya mutasi transisi pada basa purin atau basa pirimidin. Hasil blast terhadap sekuen 18S rRNA *G. procumbens* pada Gambar 4.5 terlihat adanya daerah *gap* sebesar 1 %. Daerah *gap* merupakan daerah kosong yang ditandai dengan garis putus-putus pada pensejajaran karena adanya mutasi delesi atau insersi.

*villosa*, tetapi hubungan antara karakter morfologi dengan karakter molekuler pada gen ribosomal 18S rRNA menunjukkan hasil yang tidak sama. Karakter morfologi pada *G. procumbens* menunjukkan bahwa *G. procumbens* memiliki karakter yang sama dengan sesama genus *Gynura*, tetapi hasil blast menunjukkan bahwa *G. procumbens* adalah *Heterotheca villosa*. Perbedaan antara karakter morfologi dengan karakter molekuler dapat disebabkan karena faktor adaptasi lingkungan yang secara terus-menerus. Menurut Mayr (1970), suatu populasi yang memiliki tingkat kedekatan hubungan kekerabatan yang tinggi mempunyai banyak persamaan morfologi, genetik dan dipengaruhi oleh keadaan lingkungan.



Gambar 4.6 Pohon filogeni hubungan kekerabatan antara *Gynura procumbens* dengan spesies pembandingan berdasarkan urutan gen 18S rRNA hasil penelitian

Berdasarkan data tersebut menunjukkan bahwa fragmen gen 18S rRNA menunjukkan bahwa *Gp* memiliki hubungan dapat digunakan untuk membedakan *G. kekerabatan paling dekat dengan *Heterotheca procumbens* dengan spesies pembandingan*

lainnya. Fragmen yang digunakan sebagai acuan pembeda adalah fragmen gen 18S rRNA yang dibatasi oleh primer *Cur forward* dan *Cur reverse*.

### Simpulan

Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa gen 18S rRNA dapat digunakan untuk mengkarakterisasi secara molekuler *Gynura procumbens*. Hasil analisa filogenetik menunjukkan *Gynura procumbens* berkerabat dekat dengan *Heterotheca villosa* dengan nilai *bootstrap* 100.

### DAFTAR PUSTAKA

- Alatar, AA, Mahmoud, M.A, Al-Sohaibani, S.A and Abd-Elsalam, K.A. 2012. Simple And Rapid Protocol For The Isolation Of PCR-Amplifiable DNA From Medicinal Plants. *Genetics and Molecular Research* 11 (1): 348-354.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology* Vol. 3, John Wiley and Sons, NY.
- Azrai, M. 2005. Pemanfaatan Markah Molekuler dalam Proses Seleksi Pemuliaan Tanaman. *Jurnal AgroBiogen* 1:26-37.
- Bettelheim, F.A dan Landesberg, J.1984. *Laboratoey Experiments for General, Organic and Biochemistry 4<sup>th</sup> Edition*. New Jersey : John Wiley and Sons Inc.
- Branquinho et al., 2012. Use of Real-Time PCR to Evaluate Two DNA Extraction Methods from Food. Brazil : *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, 32 (1): 112-118
- Cao, H., Sasaki, Y., Fushimi, H., and Komatsu, K. 2010. Authentication of *Curcuma* Species (Zingiberaceae) Based On Nuclear 18S rDNA and Plastid *trnK* Sequences. *Acta Pharm Sin.* 45 (7) : 926-933.
- Dainy, NC. 2006. Produksi dan Kandungan Flavonoid Daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens* [Lour]. Merr) pada Berbagai Tingkat Naungan dan Umur Pemangkasan. *Skripsi*. Fakultas Pertanian. IPB. Bogor.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990. *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. *Focus*. 12: 13-15.
- Fatchiyah. 2015. *Prinsip Dasar Bioinformatika*. Universitas Brawijaya Press. Malang.
- Hartati, D., Rimbawanto, A., Taryono, Sulistyaningsih, E., dan Widyatmoko, AYPBC. (2007). Pendugaan Keragaman Genetik Di Dalam dan Antar Provenan Pulau (*Alstonia scholaris* (L.) R. Br) Menggunakan Penanda RAPD. *Jurnal Pemuliaan Tanaman* Vol 1 (2) : 1-9.
- Hidayat. A. 2000. *Keamanan Pangan*. Bogor: Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan.
- Jenie, R I dan Meiyanto Edy. 2007. Ko-kemoterapi Ekstrak Etanolik Daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens* [Lour.] Merr.) dan Doxorubicin pada Sel Kanker Payudara. *Majalah Farmasi Indonesia*. 18 (2): 81-87
- Jothimanivannan, C., R.S. Kumar and N. Subramanian. 2010. Anti-



- inflammatory and analgesic activities of ethanol extract of aerial part of *Justicia gendarussa* Burn. *Int. J. Pharmacol.*, 6: 278-283.
- Lathifah Q A, 2008. Uji Efektifitas Ekstrak Kasar Senyawa Antibakteri Pada Buah Belimbing Wuluh (*Everrhoa bilimbi* L.) Dengan Variasi Pelarut. *Skripsi*, tidak dipublikasikan. Malang: Fakultas Sains Dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Malang.
- Lee, H.J., B. Lee, J. Chung, S. Wiryowidagdo, W. Chun, S. Kim, S.Kim and M. Choe. 2007. Inhibitory effects of an aqueous extract of *Gynura procumbens* on human mesangial cell proliferation. *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, 11: 145-148.
- Li, W.L., B.R. Ren, M. Zhuo, Y. Hu and C.G. Lu *et al.* 2009. The anti-hyperglycemic effect of plant in genus *Gynura* Cass. *Am. J. Chin. Med.*, 37: 961-966.
- Li, X., G.S. Wheeler, J. Ding. 2012. A Leaf-rolling Weevil Benefits from General Saprophytic Fungi in Polysaccharide Degradation. *Arthropod-Plant Interactions*. 6 (3) : 417-424.
- Mahmood, A.A., A.A. Mariod, F. Al-Bayaty and S.I. Abdel-Wahab. 2010. Anti-ulcerogenic activity of *Gynura procumbens* leaf extract against experimentally-induced gastric lesions in rats. *J. Med, Plants Res.*, 4: 685-691.
- Meiyanto, E., Septisetyani, E.P. 2005. Efek Antiproliferatif dan Apoptosis Fraksi Etanolik Ekstrak Etanolik Daun *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. terhadap Sel HeLa Arthocarpus. Vol 5. No 2. Hal 74-80.
- Miftakhunnafisah, W. 2010. Pengenalan NCBI untuk Analisis DNA, Protein dan Senyawa Kimia. Universitas Brawijaya. Malang.
- Moritz, C. and D.M. Hillis. 1996. Molecular systematics: Context and controversies. *In* Hillis, D.M., C. Moritz, B.K. Mable. (Eds.). *Molecular Systematics*, 2nd edition, Sinauer Associate, Sunderland, MA, USA. p. 1-13.
- Mulyatni, A. S., Priyatmojo, A., Purwantara, A. 2011. Sekuen *Internal Transcribed Spacer* (ITS) DNA ribosomal *Oncobasidium theobromae* dan jamur sekerabat pembanding. *Menara Perkebunan*. 7 (1) : 1-5
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., dan Rodwell, V.W. 2003. *Biokimia Harper*. Edisi 25. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC. Halaman 270.
- Naima, G. C.P., Luis, F.C.M, Francois, L., Philippe, L.and Luis, G.B.H. 2007. Production of Biologically Active CXC Chemokines by *Lactobacillus lactis* : Evaluation of its Potential as a Novel Mucosal Vaccine Adjuvant. *Vaccine*. 26 (46), 5778-5783.
- Pharmawati, M. 2009. Optimalisasi Ekstrak DNA dan PCR-RAPD pada *Grevillea* spp. (Proteacea). *Jurnal Biologi*. 8 (1) : 12-16.
- Poerba, Y.S, dan Martanti, D. 2008. *Keragaman Genetik berdasarkan Marka Random Amplified Polymorphic DNA pada Amorphophallus muelleri Blume di Jawa*. Bogor. Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI).
- Puangpronpitag, D., S. Chaichanadee, W. Naowaratwattana, C. Sittiwet, K.Thammasam, A. Luerang and N.

- Kaewseejan. 2010. Evaluation of nutritional value and antioxidative properties of the medicinal plant *Gynura procumbens* extract Asian *J. Plant Sci.*, 9: 146-151.
- Putra, G. P. D., Adiartayasa, W., Sritamin, M. 2013. Aplikasi Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) terhadap Variasi Gejala Penyakit *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) pada Beberapa Jenis Tanaman Jeruk. *Jurnal Agroteknologi Tropikal*. 2 (2) : 2301-6515.
- Riyantini, I., Mulyani, Y., dan Agung, M.U.K. 2014. Hubungan Filogenetik Molekuler Beberapa Jenis Mangrove di Pulau Panjarangan, Ujung Kulon, Provinsi Banten. *Jurnal Akuatika* Vol 5(1) : 63-70.
- Rosidah , M. Yam, A. Sadikun and M. Asmawi. 2008. Antioxidant potential of *Gynura procumbens*. *Pharm. Biol.*, 46: 616-625.
- Rosidah , M. Yam, A. Sadikun and M. Asmawi. 2009. Toxicology evaluation of standardized methanol extract of *Gynura procumbens*. *J. Ethnopharmacol.*, 123: 244-249.
- Sahoo, P., Jena. S., Mohanty, S., and Bandhu, A. Molecular Phylogenetic Relationships Among Four Species of The Mangrove Tree Genus *Bruguiera* (Rhizophoraceae), as Revealed by Chromosome and RAPD markers. *Rev Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744)* Vol. 55 (2): 437-448.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, dan T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning*. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Lab. CSH, New York.
- Santosa, E., dan Wirnas, D. 2009. Teknik Perbanyakn Cepat Sumberdaya Genetik Iles-Iles untuk Mendukung Percepatan Komersialisasi secara Berkelanjutan. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. 14 (2) : 91-96.
- Simarmata, R., S. Lekatompessy & H. Sukiman. 2007. Isolasi Mikroba Endofitik dari Tanaman Obat Sambung Nyawa (*Gynura Procumbens*) dan Analisis Potensinya Sebagai Antimikroba. *Berk. Penel. Hayati*, 13 : p.85-90.
- Sugiyanto, Sudarto, B., dan Meiyanto, E. 1993. Efek Penghambatan Karsinogenesis Benzo(a)piren oleh Preparat Tradisional Tanaman *Gynura* sp. dan Identifikasi Awal Senyawa yang Berkhasiat. *Laporan Penelitian P4M DitJen DikTi*. Fak. Farmasi UGM. Yogyakarta.
- Sugiyanto, Sudarto, B., Meiyanto, E., Nugroho, A.E., dan Jenie, U.A. 2003. Aktivitas Antikarsinogenik Senyawa yang Berasal dari Tumbuhan. *Majalah Farmasi Indonesia*. 14 (4): 216-225.
- Suharmiati. (2003). Pengujian Bioaktivitas Anti Diabetes Mellitus Tumbuhan Obat. *Cermin Dunia Kedokteran*. No. 140. Surabaya : Departemen Kesehatan RI. Halaman 10
- Suharmiati, dan Maryati, H. 2006. *Khasiat dan Manfaat Daun Dewa dan Sambung Nyawa 2<sup>nd</sup>*. Agromedia Pustaka. Jakarta. 1-12.
- Surzycki, S. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Susanto, Agus Hery. 2012. *Bahan Ajar Biologi Molekuler*. Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto.

- Suwanto, A. 2011. *Keanekaragaman Hayati Mikroorganisme*. Jurusan Biologi FMIPA IPB, Bogor.
- Syafaruddin dan T.J. Santoso. 2011. Optimasi Teknik dan Purifikasi DNA yang Efisien dan Efektif pada Kemiri Sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco) Airy Shaw). *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*. 17 (1) : 11-17.
- Varma, A., H. Padh, and N. Shrivastava. 2007. Plant Genomic DNA Isolation : an art or a science – *Biotechnol. J.* 2 : 386-392.
- Viljoen G J, Louis HN and John RC. 2005. *Molecular Diagnostic PCR Hand Book*. Springer: IAEA-FAO (Fiat-Panis).
- Winarto, W.P. 2003. *Sambiloto : Budidaya dan Pemanfaatan untuk Obat*. 1<sup>st</sup> ed. Jakarta : Penebar Swadaya. P. 1-12.
- Winarto, W.P., dan Tim Karyasari. 2004. *Sambung Nyawa : Budidaya dan Pemanfaatan untuk Obat*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Yuwono, T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. ANDI OFFSET. Yogyakarta.
- Yuwono, T. 2009. *Biologi Molekuler*. Jakarta : Penerbit Erlangga Jakarta.
- Yuzammi. 2000. A Taxonomic Revision of Terrestrial and Aquatic Araceae in Java. Unpublished Thesis.
- Zulfahmi. 2013. Penanda DNA untuk Analisis Genetik Tanaman. *Jurnal Agroteknologi* Vol 3(2) : 41-52.