

# KONSERVASI TANAMAN PEGAGAN (*Centella asiatica* L. Urban.) MELALUI TEKNIK IN-VITRO

**Marina Silalahi**

marina\_biouki@yahoo.com  
Dosen FKIP Biologi UKI Jakarta

## **Abstract**

Medicinal plants have been used for centuries Indonesian nation solve a variety of health problems. One type of medicinal plants that have long been used both for traditional and modern medicine is gotu kola (*Centella asiatica* (L.)). Grip is a material that is used to create your  $\pm$  59 species of herbs, with levels of 15-25%. Gotu kola plant part used: roots, stems and leaves are used as a raw material for medicine need for supply of *C. asiatica* alone reached 12,700 tonnes dry weight per year need is increasing from year to year, leading to the presence in nature and in danger of diminishing. Pegagan of 1993 are included in the list IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources), a category of vulnerable species approaching, so it is vital for conservation. Conservation efforts can be done in situ and ex-situ. Conservation in situ and ex-situ in the field often have problems because habitat destruction and overexploitation. efficient alternative for the ex situ conservation is through the technique of in-vitro. Culture is the technique of in-vitro cultivation of cells, tissues, and organs that have been separated from their natural environment and grown in an artificial medium under conditions appropriate sterile. Application of in vitro storage of *C. asiatica* through storage in a state of growth (short-term), minimal growth storage (short and medium term) and storage by freezing (long-term).

**Keyword:** Medicinal plant, *Centella asiatica*, conservation, species

## **PENDAHULUAN**

### **Latar Belakang**

Tumbuhan obat telah berabad-abad digunakan bangsa Indonesia memecahkan berbagai masalah kesehatan. Badan Kesehatan Dunia, 80% penduduk dunia masih menggantungkan dirinya pada pengobatan menggunakan obat yang berasal dari tumbuhan, bahkan 25% dari obat modern yang beredar di dunia berasal dari bahan aktif yang diisolasi dan dikembangkan berasal dari tumbuhan (Tripathi and Tripathi, 2003). Tumbuhan obat adalah tumbuhan yang mengandung zat yang dapat digunakan untuk pengobatan atau menjadi prekursor obat sintesis (Sofowora 1982).

Pemanfaatan tumbuhan sebagai obat tradisional lebih berhubungan dengan tingginya keanekaragaman tumbuhan yang dimiliki Indonesia. Indonesia memiliki sekitar 30.000-40.000 spesies tumbuhan (Kartawinata 2010). Berbagai laporan ilmiah jumlah spesies tumbuhan obat di Indonesia antara lain: sebanyak 1040 (Heyne 1927); 3689 (Kazahara 1986); 9.606 (Koorders 1991); dan 3.000 (Schumacher 1996).

Salah satu jenis tanaman obat yang telah

lama dimanfaatkan baik untuk pengobatan tradisional maupun modern adalah tanaman pegagan (*Centella asiatica* (L.)). Pegagan merupakan bahan yang digunakan untuk membuat  $\pm$  59 jenis jamu (Santa & Prajoga 1992), dengan kadar 15-25%. Keseluruhan bagian tanaman pegagan akar, batang dan daun digunakan sebagai bahan baku obat.

Pemanfaatan keseluruhan bagian tanaman berimplikasi dengan keberadaan tumbuhan tersebut di alam. IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) tahun 1993 menempatkan *C. asiatica* sebagai spesies yang mendekati kategori rentan, dan pada tahun 1998 sebagai spesies yang terancam punah (Paramageetham dkk. 2004), sehingga penting dilakukan konservasi.

Konservasi adalah segala upaya pemanfaatan, penelitian dan pelestarian secara berkesinambungan. Salah satu strategi dalam konservasi adalah melindungi individu yang tersisa dengan menempatkan dalam suatu lingkungan yang dapat dipantau secara berkelanjutan. Strategi tersebut dapat dilakukan dengan konservasi atau pelestarian *ex-situ* (diluar

wilayah alami atau habitatnya) melalui teknik in-vitro.

### Metode Penulisan

Tulisan ini berdasarkan studi literatur dari berbagai naskah ilmiah.

### PEGAGAN (*Centella asiatica* (L.) Urban

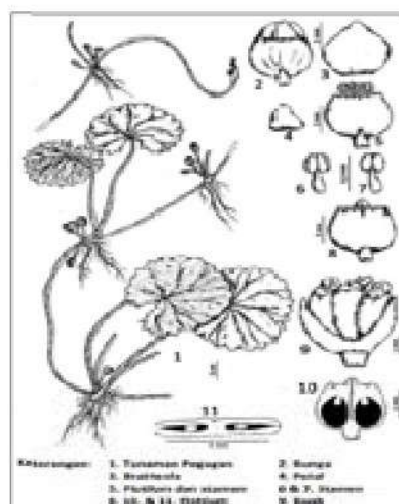
*Centella* merupakan salah satu genus dari famili *Umbeliferae*. Famili *Umbeliferae* diperkirakan memiliki 250-440 genus dan 3.300-3.700 spesies. Genus *Centella* diperkirakan memiliki sekitar 40 species (de Padua, 1999) hingga 50 spesies (James & Dubery 2009) dengan pusat penyebaran di Afrika Selatan. Satu species dari *Centella* yang tersebar luas di Asia Tenggara baik di daerah tropis dan sub-tropis adalah *Centella asiatica* sinonim *Hydrocotyle asiatica* (de Padua 1999).

Pegagan merupakan herba yang pada umumnya hidup secara liar di tempat terbuka seperti padang rumput, kebun, tepi jalan, dan tepi parit (Backer & van den Brink 1965). Tanaman ini memiliki daunnya seperti ginjal atau seperti kaki kuda sehingga tanaman ini sering juga disebut daun kaki kuda (gambar 1). Tanaman diperbanyak dengan menggunakan stolon, nodus ada yang memiliki ruas panjang dan pendek; daun berbentuk obicular atau daun reniform dan bunga sesil (Zheng *et al*, 2007). Bentuk morfologi tanaman *C. asiatica* dapat berbeda jauh tergantung pada situasi lingkungan (Adamsom 1950).

*C. asiatica*, juga dikenal sebagai Gotu kola atau Indian pennywort. Tanaman ini tersebar di India, Sri Lanka, Madagascar, Africa, Australia, China, Indonesia, Malaysia, Australia and Africa Selatan dan Tengah (de Padua *et al* 1999). Tiga subspecies pegagan yaitu pegagan salad, pegagan kerinting atau nyonya dan pegagan biasa atau pegagan ubi. Subspecies yang dicadangkan untuk tujuan komersial adalah pegagan ubi (Kiong 2004).

Kiong (2004) bahwa ada tiga varietas dari tanaman pegagan yang berhubungan dengan asal geografinya dan berhubungan dengan morfologi daun dan komposisi kimianya yaitu *C. asiatica* Var. *Typica* dengan rambut tipis, dengan daun berbentuk seperti ginjal dengan tepi daun bergelombang ditemukan di Asia Selatan dan Madagaskar, (2) *C. asiatica* var. *abyssinica*

dengan tepi daun bergelombang dan rambut di daun cukup terdapat di daerah didaerah tropika dan Afrika Tengah (3) *C. asiatica* var. *Floridana* dengan bentuk daun lebih panjangnya lebih dibandingkan dengan luasnya ditemukan di amerika (mulai dari amerika selatan hingga Argentina) dan juga ditemukan di oceania tropik. Setiap variatas memiliki senyawa kimia yang berbeda.



Gambar 1. Tanaman Pegagan (*C. asiatica* L. Urban)

### MANFAAT TUMBUHAN DAN KANDUNGAN METABOLIT SEKUNDER

#### *C. asiatica*

Tanaman *C. asiatica* telah digunakan sejak zaman prasejarah untuk tujuan pengobatan dan berbagai kosmetik (James & Dubery 2009). Di Indonesia *C. asiatica* telah lama digunakan pada etnis Dayak (Dharmono 2007 ) dan Sunda (Rahayu *et al* 2004) sebagai obat tradisional. Selain digunakan sebagai obat, pegagan juga digunakan sebagai salad, sayur/lalaban, dan juga sebagai minuman segar (Rahayu 2004 & Hashim *et al* 2011). Pemanfaatan tumbuhan sebagai obat berhubungan dengan senyawa kimia atau metabolit sekunder yang dikandung.

Senyawa kimia yang terdapat pada tumbuhan sering disebut nature product. Senyawa tersebut dapat digolongkan menjadi metabolit primer dan sekunder. Metobil primer merupakan hasil dari proses metabolisme primer dan sekunder disebut dengan metabolit sekunder. Metabolit sekunder digunakan oleh tumbuhan sebagai fitohormon, pigmen fotosintesis, pigmen aksesoris, dan alelopati (Hanson *et al*

2003). Senyawa metabolit sekunder banyak dimanfaatkan sebagai sebagai obat, zat warna, antimikroorganisme, pestisida, dan aroma (Lenny 2006).

Secara tradisional di daerah Jawa Barat *C. asiatica* digunakan sebagai salah satu bahan pembuatan jamu yang digunakan selesai melahirkan (Indarto dan Siagian 1992); sebagai obat luka terpotong, memperlancar peredaran darah dan kesemutan (Rahayu *et al* 2002), dan obat sakit perut (Hidayat dan Fitjrianto 2002). Dalam bidang pengobatan modern *C. asiatica* digunakan sebagai penutup luka (Bonte *et al*, 1994), asma, ulser, lepra, lupus (Brinkhaus, *et al* 2000), meningkatkan memori otak (Rao *et al* 2005), sebagai anti depressi (Chen *et al* 2003) dan antikanker (Babu *et al* 1995).

Manfaat *C. asiatica* berhubungan dengan senyawa bioaktif atau metabolit sekunder yang dimiliki. Berdasarkan penelitian fitokimia diketahui pegagan mengandung senyawa metabolit sekunder dari golongan alkaloid, fenol, dan terpenoid (James & Dubery 2009). Terpenoid merupakan kandungan senyawa metabolit sekunder utama pada pegagan, yang telah diketahui sebagai obat (Kiong 2004 dan Mangas *et al* 2008).

Kandungan metabolit sekunder pada *C. asiatica* dipengaruhi berbagai faktor diantaranya asal (Bermawie 2007); naungan (Kurniawati 2005); latitude dan altitude (Zhang *et al* 2009); ekotipe (Das Anathabandhu dan Mallik (1991). Organ *C. asiatica* memiliki kadar metabolit sekunder bervariasi. Zainol *et al* (2008) asiaticoside, madecasoside dan asam asiatik kadarnya lebih tinggi daun dibandingkan petiole dan akar. Das Anathabandhu dan Mallik (1991), Perbedaan kandungan asiatikosida pada *C. asiatica* berhubungan dengan variasi genom.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *C. asiatica* memiliki variasi kandungan metabolit sekunder. Bermawie (2007) menyatakan bahwa perbedaan sifat morfologi seperti warna, ukuran, stolon dan daun mempengaruhi kandungan asiatikosida. Hal lain ditemukan oleh Mathur *et al* (2000) bahwa kandungan triterpenoid yang tinggi dapat diperoleh pada *C. asiatica* yang mendapat cahaya penuh.

*Centella asiatica* mengakumulasi sejumlah metabolit sekunder dari golongan senyawa triterpenoid pentasiklik saponin (James & Dubery

2009). Senyawa kimia yang tergolong terpenoids antara lain asiatikosida, centelosida, madekasida, brahmasida, brahminosida, trunkunisida, scelfelosida, centelosa, asiatik dan asam madekasida (Inamar *et al* 1996 & Bonfill *et al* 2006; James & Dubery 2009). Asiatikosida, madekasosida, asam asiatik, dan asam madekasid merupakan triterpenoid banyak diketahui dan dimanfaatkan dari pegagan (Martin 2004; Arekar & Barve 2005; James dkk. 2008).

Senyawa asiatikosida yang terdapat pada tanaman *C. asiatica*, berkhasiat meningkatkan daya ingat khususnya pada anak-anak yang mengalami keterbelakangan mental, dan dapat menyembuhkan penyakit Alzheimer (Kim *et al*, 2004). Selain hal tersebut asiatikosida, bersama-sama dengan asam asiatik, dan asam madekasik merupakan antioksidan yang kuat serta dapat meregenerasi tingkat jaringan dengan mensintesis kolagen (Krishnan *et al*. 2008). Asiatikosida, madekasosida, dan asam madekasik merupakan senyawa aktif dalam pengobatan penyakit lepra (Martin 2004).

Pada system saraf pusat derivat asiaticoside menghambat atau mereduksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> menginduksi kematian sel menurunkan konsentrasi radikal bebas, mencegah efek beta-amyloid neurotoxicity. Asiatikosida diperkirakan dapat digunakan sebagai obat Alzheimer karena senyawa tersebut sangat potensial melindungi sel-sel melawan -amiloid yang menginduksi kematian sel-sel (Babu *et al* 1995). Khasiat yang dimiliki oleh *C. asiatica* berhubungan dengan kandungan triterpen. Terpenoid utama yang terdapat pada *C. asiatica* asiatikosida, madekasosida, asam asiatik, dan asam madekasid Kiong (2004) dan Mangas *et al* (2008). Asiatikosida dan madekasosida merupakan triterpenoid glikosida, sedangkan asam asiatik dan asam madekasid merupakan aglikon, yaitu terpenoid tanpa gugus gula.

## **KONSERVASI TANAMAN *Centelala asiatica* (L.) Urban**

Kebutuhan akan pasokan *C. asiatica* sendiri mencapai 12.700 ton berat kering per tahun. Kebutuhan tersebut semakin meningkat dari tahun ke tahun, hingga menyebabkan keberadaan di alam semakin berkurang dan terancam. Hal tersebut berhubungan dengan terjadi degradasi generasi lahan yang cepat seiring dengan erosi plasma nutfah (Bermawie

& Kristina 2003). Tingginya permintaan tanaman pegagan sebagai bahan baku jamu mengakibatkan status keberadaan pegagan di alam sangat mengkhawatirkan. Tahun 1993 pegagan termasuk dalam daftar IUCN (*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*), sebagai spesies yang mendekati kategori rentan, dan pada tahun 1998 sebagai spesies yang terancam punah (Paramageetham dkk. 2004), sehingga penting dilakukan konservasi.

Indrawan et al (2007) menyatakan bahwa jika jumlah suatu species yang berada dalam keadaan genting dan jumlahnya terus-menerus menyusut dapat dilakukan upaya konservasi. Salah satu cara yang dapat digunakan dengan melindungi individu yang tersisa dengan menempatkan dalam suatu lingkungan yang dapat dipantau secara berkelanjutan. Strategi tersebut dapat dilakukan dengan konservasi atau pelestarian *in situ* (di dalam habitatnya) dan *ex-situ* (diluar wilayah alami atau habitatnya).

Upaya konservasi secara *in situ* dan *ex-situ* sering mengalami kendala karena kerusakan habitat dan eksploitasi yang berlebihan (Megia et al 2008). Kendala konservasi *ex-situ* antara lain; tumbuhan memiliki persyaratan tumbuh yang spesifik sehingga sulit ditumbuhkan diluar habitat, cekaman biotik (hama dan penyakit) dan cekaman abiotik serta biaya dan tenaga yang besar (Megia et al 2008). Konservasi *ex-situ* dapat dilakukan secara konvensional maupun dengan bantuan teknologi. Salah satu bentuk konservasi tanaman pegagan dengan bantuan teknologi dapat dilakukan kultur *in-vitro*.

Kultur *in-vitro* merupakan teknik penanaman sel, jaringan, dan organ yang telah dipisahkan dari lingkungan alaminya dan ditumbuhkan pada medium buatan yang sesuai dalam kondisi steril (Staba 1980; Dodds & Roberts 1982). Teknik perbanyakan tanaman dengan secara *in-vitro* dapat menggunakan bagian tanaman seperti daun, mata tunas sebagai sumber eksplan.

Penerapan penyimpanan *in-vitro* ada beberapa cara di antaranya adalah penyimpanan dalam keadaan tumbuh (jangka pendek), penyimpanan pertumbuhan minimal (jangka pendek dan menengah) dan penyimpanan dengan pembekuan (jangka panjang) (Bermawie & Kristina 2003; Megia et al 2008). Penyimpanan dalam keadaan tumbuh

adalah cara pemeliharaan dengan melakukan pemindahan tanaman (subkultur) secara rutin pada media yang sama agar biakan tetap hidup. Untuk menghindari terjadinya mutasi dan menjaga viabilitas tanaman maka zat pengatur tumbuh yang digunakan diusahakan seminimal mungkin (Irawati, 1990).

Melalui teknik *in-vitro* pertumbuhan minimal, bahan tanaman dapat disimpan dalam waktu hingga 20 tahun (Megia et al 2008). Konservasi *in vitro* sebagai kolektif aktif dapat diterapkan dengan menggunakan pertumbuhan minimal untuk penyimpanan jangka menengah (Leunutfah 2004). Teknik pertumbuhan minimal dilakukan untuk memperpanjang masa simpan kultur tanpa tindakan subkultur (pemindahan ke media segar) secara berulang ulang.

Penyimpanan pertumbuhan minimal adalah dengan menekan pertumbuhan biakan dengan menurunkan proses pembelahan sel dan proses metabolisme yang hampir mendekati nol (Bermawie dan Kristina 2003). Beberapa hal yang dilakukan dalam teknik pertumbuhan minimal antara lain : penurunan temperatur lingkungan (Hu & Wang 1983); penggunaan regulator osmotik (Wither, 1985 & Migea et al 2008); Pengenceran media (Desbrusnais et al 1992); penggunaan zat penghambat tumbuh (Whither 1985). Untuk menekan pertumbuhan tersebut dilakukan manipulasi suhu, pemberian zat penghambat tumbuh (Paclobutrazol, CCC, Ancymidol), retardan (ABA), pemberian stabilisator osmotik seperti manitol dan sorbitol serta pemiskinan media, terutama unsur makronya dari  $\frac{1}{2}$  sampai  $\frac{1}{10}$  nya (Mariska, et al., 1993). Penyimpanan dengan teknik pembekuan atau jangka panjang dengan cara ini proses metabolisme dari sel, jaringan maupun organ yang disimpan sehingga tidak ada proses pertumbuhan (Bhojwani dan Razdan, 1983).

Beberapa peneliti telah menerapkan teknik *in-vitro* untuk tujuan konservasi; Bermawie dan Kristina (2003); Syahid dan Kristina (2007) dan Megia et al (2008). Teknik *in-vitro* memiliki beberapa kelebihan diantaranya penghematan area, tenaga, biaya, waktu dan kemudahan dalam pertukaran plasma nutfah (Mariska et al 1996). Penelitian kultur *in-vitro* pegagan bertujuan untuk mikropropagasi, studi genetika, produksi metabolit sekunder dan konservasi. Regenerasi melalui mikropropagasi secara *in-*

*in vitro* dapat dilakukan dengan morfogenesis langsung dan tidak langsung. Morfogenesis langsung telah dilakukan oleh Banerjee dkk (1999) dan Mohapatra dkk. (2008) dengan eksplan yang berasal dari daun serta Tiwari dkk (2000) dan Raghu dkk (2007) dengan eksplan potongan nodus.

Medium yang umum digunakan pada kultur *in vitro* pegagan adalah medium MS dan B5. Medium MS digunakan secara luas untuk tujuan mikropropagasi baik morfogenesis langsung (Raghu dkk. 2007; Mohapatra dkk. 2008), maupun morfogenesis tidak langsung (Aziz dkk. 2006), dan produksi metabolit sekunder (Kiong dkk. 2005). Pemilihan medium yang tepat dapat menentukan keberhasilan pertumbuhan dan perkembangan suatu kultur. Hal ini juga dipengaruhi oleh penambahan zat pengatur tumbuh. Auksin dan sitokinin merupakan zat pengatur tumbuh yang digunakan secara luas untuk kultur. Salah satu jenis auksin dan sitokinin yang digunakan dalam penelitian pegagan untuk induksi akar adalah NAA (*Naphthaleneacetic acid*) dan kinetin (*6-furfurylaminopurine*).

Menurut Staba (1980), Mathius dkk (2004), dan James dkk (2008) keuntungan teknik kultur *in vitro* dalam produksi metabolit sekunder dibandingkan dengan cara konvensional, antara

lain dapat menghasilkan senyawa kimia dalam waktu relatif singkat. produksi senyawa kimia tersebut dapat ditingkatkan, dengan pengaturan zat pengatur tumbuh serta penggunaan elisitor dan prekursor.

## **PENUTUP**

Tingginya permintaan tanaman pegagan sebagai bahan baku jamu mengakibatkan status keberadaan pegagan di alam sangat mengkhawatirkan. Tahun 1993 pegagan termasuk dalam daftar IUCN (*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*). Sebagai spesies yang mendekati kategori rentan, dan pada tahun 1998 dinyatakan sebagai spesies yang terancam punah (Paramageetham dkk. 2004), sehingga penting dilakukan konservasi. Salah satu bentuk konservasi *ex-situ* yaitu melalui kultur *in-vitro*. Kultur *in-vitro* merupakan teknik penanaman sel, jaringan dan organ dipisahkan dari lingkungan alamnya dan ditumbuhkan pada medium buatan yang sesuai dalam kondisi steril. Penerapan penyimpanan *in-vitro* ada beberapa cara di antaranya penyimpanan dalam keadaan tumbuh (jangka pendek), penyimpanan pertumbuhan minimal (jangka pendek dan menengah) dan penyimpanan dengan pembekuan (jangka panjang).

## **DAFTAR PUSTAKA**

- Adamson, R.S. 1950. On some species of *Centella*. II. S. Afr. J. Bot. 15: 93-95.
- Babu, T.D., Kuttan, & G., Padikkala, J. 2005. Cytotoxic and anti-tumor properties of ceratin taxa of *Arekar*, A.R. & S.S. Barve. *In vitro* regeneration of *Centella asiatica*, Linn. *Journal of Cell and Tissue Research* 5(2): 435-438
- Aziz, Z.A., Davey, M.R., Lowe K.C. & Power. J.B. 2006. Isolation and culture of protoplasts from the medicinal plant *Centella asiatica*. *Revista Brasileira Plant Medicina*. 8
- Babu, T.D., Kuttan, G. & Padikkala, J. 1995. Cytotoxic and anti-tumor properties of ceratin taxa of *Umbeliferae* with special reference to *Centella asiatica* (L.) Urban. *J. Ethnopharmacol.* 48: 53-57.
- Backer, C.A. & Bakhuizen van den Brink R.C. Jr. 1965. *Flora of Java: Spermatophytes only* volume II. *Therijksherbarium*, Leyden: iv + 641 hlm.
- Banerjee, S., Zehra M. & Kumar, S. 1999. *In vitro* multiplication of *Centella asiatica*, a medical herb from leaf explant. *Current science* 76: 147-148
- Bermawie N. & Kristina. N.N. 2003. *Penyimpanan In Vitro Tanaman Obat Potensial Perkembangan Teknologi tropika* . 15 (1); 1-10
- Bhojwani, S. S. & Razdan, M.K. 1983. *Plant tissue culture*. Elsevier. Amsterdam. New York. 502 p.
- Bonte, F., Dumas, M., Chaudagne, C. & Meybeck, A. 1994. Influence of asiatic acid, madecassic acid and asiaticoside on human collagen I synthesis. *Planta Med.* 60, 133-135.
- Brinkhaus, B., Lindner, M., Schuppan, D. & Hahn, E.G. 2000. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medicinal plant *Centella asiatica*. *Phytomedicine* . 7 : 427-448.
- Bonte, F., Dumas, M., Chaudagne, C. & Meybeck, A. 1994. Influence of asiatic acid, madecassic acid and asiaticoside on human collagen I synthesis. *Planta Med.* 60, 133-135.

- Chen, Y., Han, T., Rui, Y., Yin, M., Qin, L. & Zheng, H. 2003. Effects of total triterpenes of *Centella asiatica* on the depression behavior and concentration of amino acid in forced swimming mice. *Zhong Yao Cai*, 26, 870-873.
- Das, A & Mallick. R. 1991. Correlation between genomic diversity and asiaticoside content in *Centella asiatica* (L.) Urban. *Botanical Bulletin Academia Sinica* 32: 1--8.
- Desbrunais, A.B., Noirot, M. & Charrier, A. 1992. Slow Growth in vitro Conservation of coffee (*Coffea* spp.). *Plant Cell Tissue and organ Cultures*: 31: 105-110.
- de Padua, L.S., Bunyaphatsara & Lemmens. R.H.M. J. 1999. *Palnt resources of South-East Asia* no 12(1). Backhuys Publishers, Leiden: 21-70.
- Dharmono. 2007. Kajian Etnobotani Tumbuhan Jalukap (*Centella Asiatica* L.) Di Loksado Suku Dayak Bukit Desa Haratai 1 *Bioscientiae*.4(2): 71-78.
- Dodds, J.H. & Roberts. L.W. 1982. *Experiment in plant tissue culture*. Cambridge University Press, Cambridge: xiii + 178 hlm.
- Hanson, J.R. 2003. The biosynthesis of secondary metabolites. In *Natural Products, the Secondary Metabolites*; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, : 112-121.
- Hashim, P., Sidek, H., Helan, M.H. M. & Sabery, A., Palanisamy U.D. & Ilham, M. 2011. Triterpene Composition and Bioactivities of *Centella asiatica* *Molecules* 16:1310-1322
- Heyne K. 1927. *De nuttige planten van Nederlands-Indie*. 2nd ed. Vol. 1. Departement van Landbouw, Nijverheid en Handed in Nederlands- Indie. 's-Gravenhage.
- Hidayat S & Fidriyanto. 2002. Tumbuhan Obat di Kawasan Taman Nasional Gunung Halimun dan Tantangan Konservasinya. *Prosiding symposium Nasional II Tumbuhan obat dan aromatic*. 110-115
- Hu, C.Y. & Wang. P.J. 1983. Meristem, Shoot Tip, and Bud Cultures : in D.A. Evan, W.R. Sharp, P.V. Amiroto and Y. Yamada (eds). *Handbook of Plant Cell Culture Volume I. Techniques for Propagation and Breeding*. Mc Milan Publishing. New york.
- Indarto, N.S. & Siagian, M.H. 1992. Beberapa Jenis Tumbuhan Perangsang Persalinan di Ciomas Bogor. *Prosiding Seminar Etnobotani Februari* 250-258.
- Indrawan, M., Primack, R.B. & Supriatna, J. 2007. *Biologi Konservasi (Edisi Revisi)*. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta
- Irawati. 1990. Pelestarian plasma nutfah melalui kultur jaringan. *Makalah dalam Latihan Bioteknologi Kultur Jaringan*. Balitro. 12-24 Maret. Bogor.
- James, J.T., Meyer, R. & Dubery. I.A. 2008. Characterization of two phenotypes of *Centella asiatica* in Southern Africa through the composition of four triterpenoid in callus, cell suspensions and leaves. *Plant Cell Tissue and Organ Cultures* 94: 91--99.
- Kartawinata. K. 2010. Dua abad mengungkap kekayaan flora dan ekosistem Indonesia. Dalam : Sarwono Prawirohardjo memoial lecture X. LIPI. 23 Agustus 2010. Jakarta : 1-38
- Kartha, K.K. 1985. Meristem cultures and Gerplasm Preservation: in; Kartha (Eds). *Cryopreservation of Plant Cell and Organ*. Cue Press. Florida; 116-134
- James J.T. & Dubery. I.A. 2009. Pentacyclic Triterpenoids from the Medicinal Herb, *Centella asiatica* (L.) Urban *Molecules*. 14, 3922-3941
- Kazahara S. 1986. *Medicinal herb index in Indonesia*. PT. Eisai Indonesia. Jakarta.
- Kim, O.T., Kim, M.Y., Hong, M.H., Ahn J.C. & Hwang, B. 2004. Stimulation of asiaticoside accumulation in the whole plant cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban by elicitors. *Plant Cell Report* 23: 339--344
- Kiong, A.L.P. 2004. Triterpene production in *Centella asiatica* (L.) Urban (Pegaga) callus and cell suspension cultures. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy. School of Graduate Studies, Science and Environmental Studies Faculty, Universiti Putra Malaysia
- Lenny, S. 2006. *Senyawa terpenoida dan steroida*. Karya ilmiah. Departemen Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sumatera Utara. Medan: iv + 25 hlm.
- Leunufna, S. 2004. Improvement of the in vitro maintenance and Cryopreservation of Yams (*Dioscorea* spp)' *Dissertation Martin-Luther-Universitat Halle Wittenberg*; 12
- Mangas, S., Moyano, E., Osuna, L., Cusido, R.M., Bonfill, M. & Palazón, J. 2008. Triterpenoid saponin content and the expression level of some related genes in calli of *Centella asiatica*. *Biotechnology Letter* 30: 1853--1859.
- Mariska, I. Suwarno & Damardjati. D.J. 1996. Pengembangan konservasi in vitro sebagai salah satu bentuk pelestarian plasma nutfah di dalam bank gen" *Seminar penyusunan*

- Konsep pelestarian Ex situ Plasma nuffah Pertanian Bogor tanggal 18 Desember 1996. Balitro. Bogor.
- Martin, K.P. 2004. Plant regeneration through somatic embryogenesis in medicinally important *Centella asiatica* L. In vitro Cellular Development Biology 40: 586--591
- Mathius, N.T., Refflini, N. Haris, J., Santoso & Roswiem, A.P. 2004. Kultur akar rambut *Cinchona ledgeriana* dan *C. succirubra* dalam kultur in vitro. Menara Perkebunan 72(2): 72-87
- Megia R., Darwati, I. & Tambunan, R. 2008. Konservasi in vitro tanaman obat langkah asli Indonesia Pimpinella pruatjan Moik. Secara pertumbuhan minimal dan kriopreservasi untuk protokol standar di Ban gen. Institut Pertanian Bogor. Laporan Penelitian 28 hlm
- Mohapatra, H., Barik, D.P. & Rath. S.P. 2008. In vitro regeneration of medicinal plant *Centella asiatica*. Biologia Plantarum 52 (2): 339-342.
- Paramageetham, C., Babu, G.P.B. & Rao, J.V.S. 2004. Somatic embryogenesis in *Centella asiatica* L. an important medicinal and nutraceutical plant of India. Plant Cell Tissue and Organ Culture 79: 19--24.
- Raghu, A.V., Martin, G., Priya, V., Geetha, S.P. & Balachandran, I. 2007. Low cost alternatives for micropropagation of *Centella asiatica*. Journal of Plant Sciences 2(6): 592--599.
- Rahayu M. Harada K. & Muzakkir, A. 2002. Kajian pemanfaatan Tumbuhan Obat Oleh Masyarakat Lokal sekitar Taman Nasional Gunung halimun Jawa Barat. Prosiding Simposium Nasional II Tumbuhan Obat dan Aromatik 61-72
- Rahayu, M. & Harada, K. 2004. Peran Tumbuhan dalam kehidupan Tradisional Masyarakat Lokal Taman nasional Gunung Halimun Jawa Barat Berita Biologi . 7(1):17-23
- Rao, S.B., Chetana, M., & Uma Devi, P. 2005. *Centella asiatica* treatment during postnatal period enhances learning and memory in mice. Physiol. Behav. 86: 449-457.
- Santa, I.G.F. & Prajogo, B.E.W. 1992. Studi taksonomi *Centella asiatica* (L.) Urban. Warta Tumbuhan Obat Indonesia 1(2): 46-47.
- Sofowora A. 1982. Medicinal plants and traditional medicine in Africa. Spectrum Books Ltd. Ibadan, Nigeria
- Staba, E. J. 1980. Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Inc., Florida: 285 hlm.
- Syahid S.F. & Kristina, N.N. 2008. Multiplikasi Tunas, Aklimatisasi Dan Analisis Mutu Simplisia Daun Encok (*Plumbago Zeylanica* L.) Asal Kultur In Vitro Periode Panjang. Bul. Littro. 19(2): 117 – 128
- Tiwari, K.N., Sharma, N.C., Tiwari V. & Singh, B.D.. 2000. Micropropagation of *Centella asiatica* (L.), a valuable medicinal herb. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 63: 179--185
- Tripathi, L. & Tripathi, J.N. 2003. Role of biotechnology in medicinal plant. Tropical Journal of Pharmaceutica Research. 2(2): 243-253
- Wither L.A. 1985. Cryopreservation and Storage of Germplasm. In: D.A. Dixon (Ed.) Plant Cell Cultures. IRL Press. Wasington.
- Zainol, N.A., Voo, S.C., Sarmidi, M.R. & Aziz, R.A. 2008. Profiling of *Centella asiatica* (L.) Urban extract. The Malaysian Journal of Analytical Science 12(2): 322--327.
- Zheng, C.J. & Qin, L.P. 2007. Chemical components of *Centella asiatica* and their bioactivities. Chin. J. Integr. Med. 5, 348–351