

**UJI TINGKAT KONTAMINASI EKSPLAN
Centella asiatica (L.) Urban (Pegagan) DALAM KULTUR *IN VITRO*
MELALUI PERBANDINGAN DUA METODE STERILISASI**

Kartika Salam Juarna

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia
kartikasalam@gmail.com

Abstract

*Research has been conducted to determine the effect of sterilizer combination to the contamination level of Pegagan's (*Centella asiatica* L. Urban) explant. Lamina and petiolus were used as an explant. Sterilizer combination is divided into two groups; Methods 1 (M1) and Methods 2 (M2). M1 consists of 0,5% Tetracycline solution, 0,3% Bayclean solution, 0,7% Dithane suspension, 0,3% Tetracycline solution, and aquadest. Meanwhile, M2 consists of Dettol solution, alkohol 70%, 20% Bayclean solution, 0,3% Dithane suspension, and Aquadest. The difference of both methods were on the presences of antibiotics (Tetracycline) in M1 and desinfectans (Bayclean) in M2. Research shows that lamina sterilized by M2 has less contamination than M1, although the petiolus show the same level of contamination. It is believed to be related to the structure that makes lamina contaminated easily.*

Keywords : *Centella asiatica* (L.) Urban, In Vitro Culture, Sterilization Methods

PENDAHULUAN

Penggunaan tumbuhan sebagai tanaman obat telah meluas secara global dan mendapat perhatian dari masyarakat. Tumbuhan dapat dikategorikan sebagai tanaman obat apabila tumbuhan tersebut digunakan dalam pengobatan serta memiliki senyawa aktif yang berkhasiat sebagai obat dan dapat digunakan untuk mencegah atau mengobati suatu penyakit (Hassan, 2012). Tumbuhan yang dimanfaatkan sebagai tanaman obat di hutan tropis Indonesia diperkirakan sebanyak 7.500 jenis dari 30.000 jenis tumbuhan yang ada. Namun, baru sekitar 200 jenis yang telah dimanfaatkan sebagai bahan baku dalam industri obat tradisional (BPOM RI, 2004; Kotranas, 2006).

Beberapa jenis tanaman obat telah banyak digunakan, baik untuk pengobatan tradisional maupun untuk pengobatan modern (industri obat). Tanaman obat seperti *Centella asiatica* (L.) Urban

(pegagan) banyak digunakan di India (Singh *et al.*, 2011) dan Indonesia (Santa dan Prajogo, 1992). *Centella asiatica* (L.) Urban (sinonim *Hydrocotyle asiatica* Linn.) (Singh *et al.*, 2010) yang lebih dikenal dengan nama lokal pegagan atau kaki kuda merupakan tumbuhan herba dari divisi *Magnoliophyta*, kelas *Magnoliopsida*, bangsa *Apiales*, dan suku *Apiaceae* (*Umbelliferae*) (BPOM RI, 2008). Pegagan merupakan tanaman terna atau herba tahunan, batang berupa stolon yang menjalar diatas permukaan tanah dengan panjang sekitar 10–80 cm. Daun tunggal tersusun dalam roset yang terdiri atas 2-10 daun, berbentuk seperti ginjal (*reniformis*). Tepi daun bergerigi atau beringgit. Tangkai daun tegak dan bagian dalamnya berlubang. Perbungaan berupa bunga majemuk tipe payung tunggal (*umbella*), terisi atas 3–5 anak bunga. Buah dengan 2 daun buah dan 2 ruang. Buah kecil dengan tipe *schizocarpium*. Biji

dengan perikarpium yang agak tebal (BPOM, 2010; Soerjani *et al.*, 1987; Santa dan Prajogo, 1992).

Pegagan telah digunakan sebagai tumbuhan obat selama bertahun-tahun di India, China, Srilanka, Nepal, dan Madagaskar (Singh *et al.*, 2010). Secara tradisional pegagan digunakan untuk penyakit kulit (BPOM RI, 2010). Selain itu, pegagan juga digunakan untuk mengobati sakit perut, batuk, batuk berdarah, disentri, penyembuh luka, radang, pegal linu, asma, wasir, tuberkulosis, lepra, demam dan penambah selera makan (Januawati dan Muhammad, 1992; Shukla *et al.*, 1999; Padua *et al.*, 1999).

Pegagan memiliki berbagai senyawa aktif yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber obat. Senyawa aktif yang dimiliki pegagan antara lain hidrokotilina (alkoholik), asiaticosida (glikosida), oksiasiatikosida (saponin), madecosida, asam madecosid, brahminosida, sesquiterpen, triterpenoid, asam lemak, dan minyak atsiri (Hashim, 2011; Januawati dan Muhammad, 1992; HMPC, 2010).

Manfaat yang sangat besar untuk pengobatan membuat pegagan banyak dieksploitasi di alam (Tiwari *et al.*, 2000). Singh pada tahun 2010 menyebutkan status konservasi pegagan masuk ke dalam spesies *Endangered*, kemudian di tahun 2013 berubah menjadi *Least concern* (IUCN Red List, 2013). Hal tersebut

mungkin saja disebabkan karena mulai banyak dilakukan pembudidayaan pegagan baik secara *in vivo* maupun secara *in vitro*.

Dewoto pada tahun 2007 mengemukakan bahwa telah terjadi peningkatan permintaan tanaman obat di Indonesia. Hal tersebut disebabkan oleh kecenderungan masyarakat untuk menggunakan bahan obat alam. Faktor yang mendorong hal tersebut ialah obat sintesis lebih mahal dan lebih banyak efek sampingnya (BPOM RI, 2004; Dewoto, 2007). Permintaan tanaman obat di dunia diketahui berjumlah 342.550 ton pada tahun 1991-1998, dimana pada masa tersebut terjadi peningkatan permintaan obat herbal (Schippmann *et al.*, 2002; Dewoto, 2007). Sementara itu di Indonesia, 15,6% masyarakatnya menggunakan tanaman obat pada tahun 2000 dan jumlah tersebut meningkat menjadi 31,7% pada tahun 2001 (Dewoto, 2007).

Peningkatan permintaan tanaman obat menyebabkan suplai tanaman obat harus tersedia dalam jumlah yang besar. Hal tersebut agak sulit dilakukan jika masih menggunakan teknik budidaya konvensional atau melalui teknik *in vivo*. Selain itu, permintaan suplai tanaman obat yang semakin tinggi berakibat pada tingginya eksploitasi di alam yang berpotensi mengurangi jumlah populasinya (Tiwari *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2010). Oleh sebab itu, salah satu cara yang dapat

Kartika Salam Juarna: Uji Tingkat Kontaminasi Eksplan *Centella asiatica* (L.) Urban (Pegagan) Dalam Kultur *In Vitro* Melalui Perbandingan Dua Metode Sterilisasi dilakukan adalah dengan melakukan budidaya tanaman secara *in vitro*. (2008), Efrizal (2009), dan Tiwari *et al.* (2010).

Kultur *in vitro* tumbuhan merupakan salah satu cara pengembangan materi biologis tumbuhan (sel, jaringan, organ) berdasarkan teori totipotensi pada media nutrisi dalam kondisi aseptik. Teori tersebut mengemukakan bahwa setiap sel hidup mampu mengekspresikan semua informasi genetik yang dimiliki ke dalam bentuk organ utuh sehingga setiap eksplan dapat tumbuh menjadi semai atau anakan (Pierik, 1997; Susilowati, 2003). Prinsip tersebut kemudian dimanfaatkan untuk melakukan perbanyakan tanaman secara cepat dan dalam jumlah besar. Proses perbanyakan tanaman melalui teknik kultur *in vitro* memungkinkan suatu anakan memiliki sifat yang sama dengan induknya (Henuhili, 2013).

Teknik kultur *in vitro* tumbuhan sering dilakukan untuk proses budidaya tanaman hortikultura, termasuk di dalamnya tanaman obat. Hal tersebut disebabkan karena teknik kultur *in vitro* memiliki beberapa kelebihan dibanding teknik budidaya tanaman lainnya. Kelebihan tersebut antara lain, eksplan yang digunakan cukup kecil, waktu regenerasi yang relatif cepat, serta sifat anakan yang cenderung seragam (Suryowinoto, 1996; Abbas, 2011). Penelitian terkait budidaya pegagan secara *in vitro* telah banyak dilakukan antara lain oleh Patra *et al.* (1998), Mohapatra *et al.*

Penelitian kultur *in vitro* pegagan juga telah dilakukan di Departemen Biologi FMIPA UI sejak tahun 2006. Penelitian yang dilakukan antara lain induksi kalus dari eksplan lamina dan petiolus oleh Handayani pada tahun 2006 dan Azhari pada tahun 2007, serta induksi akar adventif dan pemeriksaan senyawa triterpenoid dari akar adventif oleh Efrizal pada tahun 2009. Selanjutnya, pada tahun 2012 Febriyanti melakukan studi tentang metode sterilisasi eksplan yang kemudian dimodifikasi oleh Novianti pada tahun 2013.

Masalah yang sering dijumpai dalam kultur *in vitro* salah satunya adalah kontaminasi eksplan. Hal tersebut dapat menghambat proses kultur karena menyebabkan eksplan tidak tumbuh atau bahkan mati. Salah satu cara yang dilakukan untuk meminimalkan tingkat kontaminasi adalah dengan melakukan sterilisasi terhadap eksplan (Kartini, 1996; Pierik, 1997). Terdapat beberapa metode sterilisasi yang telah diterapkan selama penelitian kultur *in vitro* pegagan di Departemen Biologi FMIPA UI. Dua diantaranya adalah metode sterilisasi yang digunakan oleh Febriyanti pada tahun 2012 dan Novianti pada tahun 2013. Kedua metode tersebut memiliki perbedaan dalam pemberian antibiotik selama proses sterilisasi. Selain itu, kondisi lingkungan

yang tidak seragam pun diperkirakan menjadi salah satu faktor yang kemudian menyebabkan perbedaan hasil. Untuk itu, perlu dilakukan perbandingan hasil tingkat kontaminasi eksplan dari kedua metode sterilisasi tersebut dalam kondisi lingkungan yang seragam. Hal tersebut bertujuan agar diketahui metode yang memperlihatkan tingkat kontaminasi yang lebih rendah.

METODOLOGI

Bahan

Eksplan yang digunakan adalah bagian lamina (daun) dan petiolus (tangkai daun) pegagan (*Centella asiatica* L. Urban). Media yang digunakan adalah media agar-agar dengan kombinasi agar-agar sebanyak 8 gram ditambah dengan 30 gram gula pasir (dilarutkan dengan akuades sampai 1 liter).

Cara Kerja

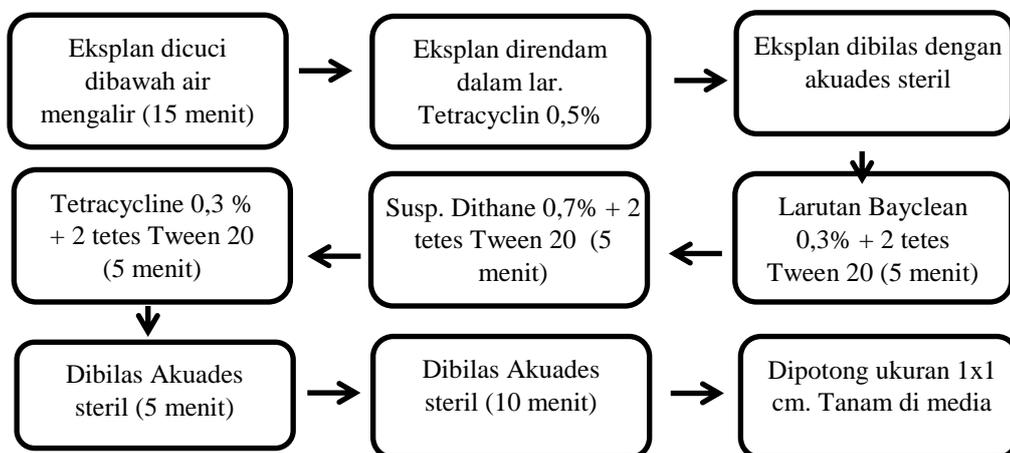
Pembuatan dan sterilisasi media

Pembuatan media agar-agar 8% dilakukan dengan menggunakan agar-agar [Swallow Globe] sebanyak 8 gram dan gula [Gulaku] sebanyak 30 gram. Suhu yang digunakan untuk membuat media agar-agar diatur stabil pada kisaran 100°C, sedangkan kuat rotasinya disesuaikan dengan densitas media. Proses pembuatan media dibiarkan sampai larutan yang sebelumnya berwarna kekuningan menjadi bening sebagai indikator bahwa larutan tersebut telah homogen.

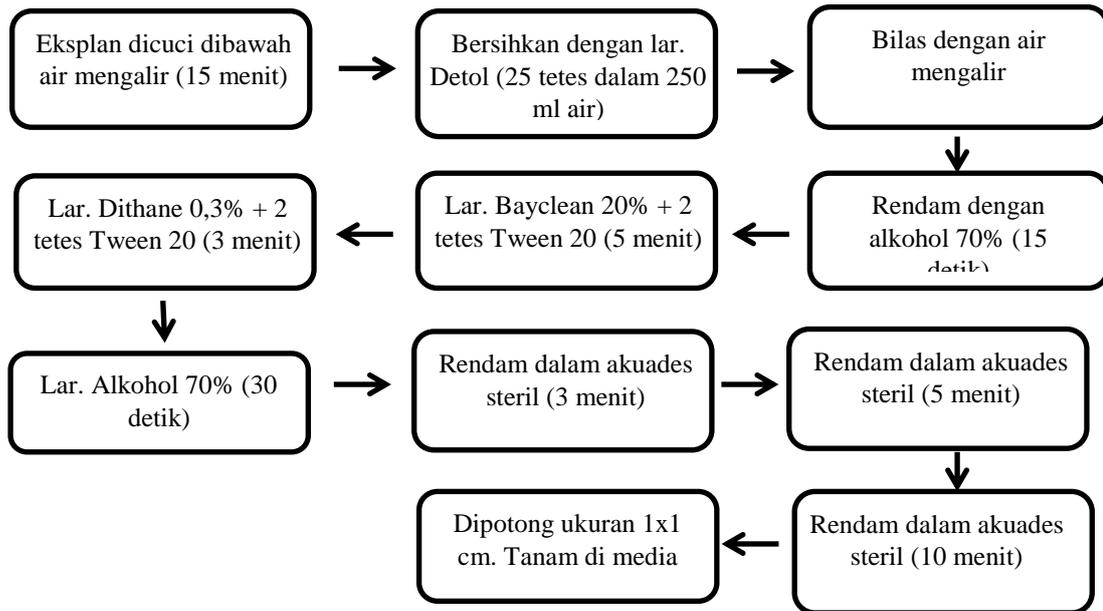
Larutan media yang telah homogen kemudian dituangkan ke botol kultur dengan volume sekitar 10 ml pada masing-masing botol kultur. Botol kultur yang telah berisi media kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf. Penggunaan autoklaf diatur pada suhu 121°C selama 15 menit. Larutan media yang telah disterilisasi basah kemudian disimpan dalam rak kultur selama sepekan untuk pengamatan kontaminasi media.

Sterilisasi dan penanaman eksplan

Metode 1



Metode 2

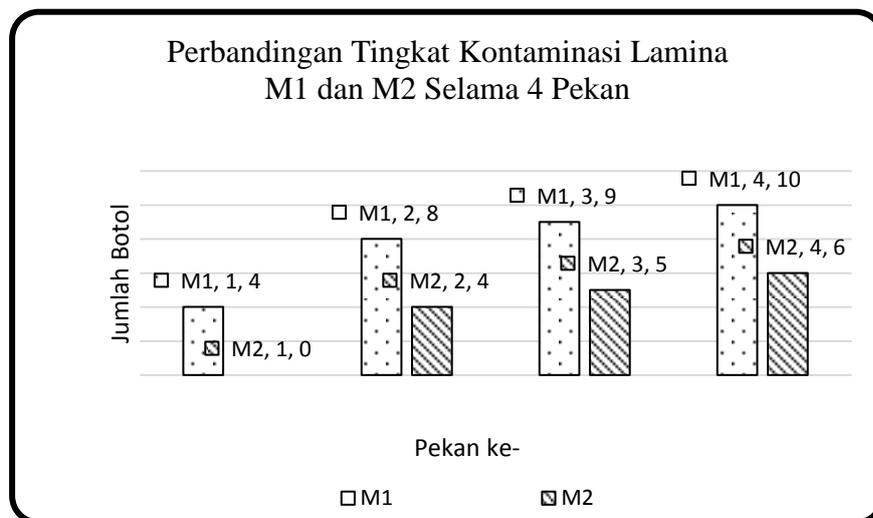


HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan Kontaminasi Eksplan dan Media

Pengamatan kontaminasi dilakukan satu kali per pekan untuk memantau kondisi eksplan sekaligus melihat keberhasilan sterilisasi eksplan. Kontaminasi yang biasa ditemukan yaitu berupa kontaminasi bakteri, khamir, atau

kapang. Kontaminasi bakteri ditandai dengan warna keruh pada media dan terkadang muncul aroma, kontaminasi khamir ditandai dengan warna keruh seperti susu sedangkan kontaminasi kapang ditandai dengan munculnya benang-benang miselia (Gamborg dan Phillips, 1995).



Gambar 1. Histogram perbandingan tingkat kontaminasi lamina M1 dan M2 selama 4 pekan

Secara umum, hasil pengamatan kontaminasi pada eksplan lamina dan petiolus menunjukkan bahwa eksplan lamina lebih rentan terhadap kontaminasi dibanding eksplan petiolus. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh struktur lamina yang pipih. Struktur tersebut berpotensi untuk membuat lamina-lamina tersebut saling menempel satu sama lain ketika proses sterilisasi di dalam labu Erlenmeyer sehingga sterilisasi permukaan yang dilakukan kurang baik hasilnya.

Hasil pengamatan eksplan lamina metode 1 (M1) pada pekan pertama menunjukkan kontaminasi kapang di botol nomor 2, 10, 11, dan 14. Pengamatan pekan kedua memperlihatkan terjadinya penambahan kontaminasi sebanyak 4 botol di botol nomor 6, 7, 8, dan 9. Pekan selanjutnya hanya bertambah satu botol yaitu botol nomor 3 dan di pekan terakhir terjadi kontaminasi di botol nomor 13 sehingga total kontaminasi lamina dengan menggunakan metode satu sebanyak 10 botol. Kontaminasi yang terjadi di 10 botol tersebut semuanya merupakan kontaminasi kapang yang ditandai dengan munculnya benang-benang miselia berwarna kehitaman yang mulai tumbuh dari tepian eksplan lalu menyebar ke seluruh permukaan media.

Eksplan Lamina Daun

Hasil pengamatan eksplan lamina metode 2 (M2) sama sekali tidak menunjukkan kontaminasi di pekan

pertama. Baik eksplan maupun media semuanya terpantau dalam keadaan bersih dari kontaminan. Pekan kedua, hasil pengamatan memperlihatkan adanya kontaminasi kapang di empat buah botol yaitu botol nomor 2, 7, 8, dan 11. Pekan selanjutnya kontaminasi bertambah di satu botol yaitu botol nomor 15. Pengamatan di pekan terakhir menunjukkan kontaminasi tambahan di botol nomor 1 sehingga total akhir kontaminasi menjadi 6 buah botol yang semuanya merupakan jenis kontaminasi kapang.

Pengamatan hasil dua metode sterilisasi tersebut memperlihatkan bahwa metode 2 memberikan hasil sterilisasi yang lebih baik dibandingkan metode 1. Sebanyak 10 botol terkontaminasi oleh kapang pada metode 1 sedangkan metode 2 hanya sebanyak 6 botol saja. Hasil tersebut membuktikan bahwa pemberian *Tetracycline* tidak memberikan hasil yang lebih baik sehingga hipotesis awal tidak terbukti.

Metode dua memberikan hasil lebih baik kemungkinan dikarenakan seri sterilan yang terdiri dari antiseptik dan desinfektan berefek lebih baik terhadap penghambatan pertumbuhan mikroorganisme. Zat yang terkandung di dalam antiseptik Dettol dan desinfektan Bayclin membunuh mikroorganisme dengan segera sedangkan *Tetracycline* yang merupakan antibiotik memerlukan waktu yang lebih lama dalam menghambat

sintesis protein bakteri sehingga ketika eksplan dipindah ke sterilan selanjutnya, proses sintesis protein belum benar-benar terhambat.

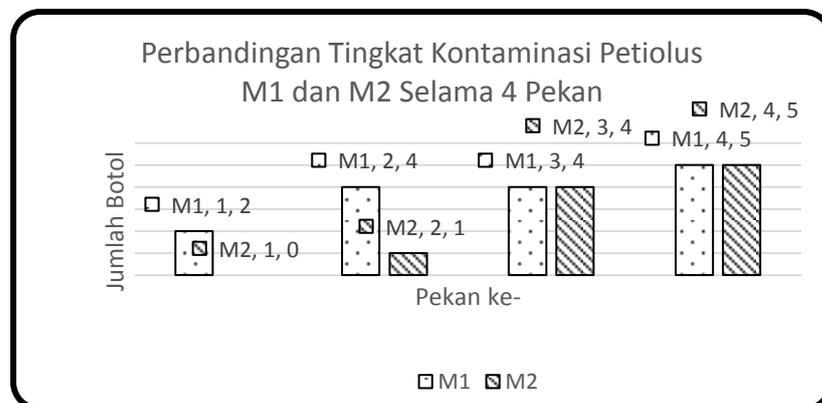
Eksplan Petiolus Daun

Hasil pengamatan eksplan petiolus yang menggunakan metode 1 memperlihatkan adanya dua botol yang terkontaminasi pada pekan pertama. Pengamatan di pekan kedua menunjukkan adanya penambahan kontaminasi kapang pada botol nomor 9 dan kontaminasi bakteri atau khamir pada botol nomor 7. Pengamatan pekan ketiga tidak menunjukkan adanya tambahan kontaminasi. Pengamatan pekan terakhir terdapat satu tambahan botol yang terkontaminasi sehingga total kontaminasi pada petiolus metode 1 sebanyak 5 botol dengan proporsi empat botol dengan kontaminasi jenis kapang dan satu botol dengan kontaminasi jenis bakteri atau khamir.

Hasil pengamatan eksplan petiolus metode 2 tidak memperlihatkan adanya kontaminasi pada pekan pertama. Semua

botol masih dalam keadaan bersih dari kontaminan. Pekan selanjutnya botol nomor 13 terkontaminasi oleh jenis kapang. Pekan ketiga, terdapat tambahan tiga botol yang terkontaminasi oleh kapang yaitu botol nomor 1, 6, dan 12. Pekan terakhir pengamatan menunjukkan botol nomor 2 juga terkontaminasi sehingga hasil akhir keseluruhan terdapat lima buah botol yang terkontaminasi dan semuanya merupakan kontaminasi jenis kapang.

Hasil pengamatan eksplan petiolus metode 2 tidak memperlihatkan adanya kontaminasi pada pekan pertama. Semua botol masih dalam keadaan bersih dari kontaminan. Pekan selanjutnya botol nomor 13 terkontaminasi oleh jenis kapang. Pekan ketiga, terdapat tambahan tiga botol yang terkontaminasi oleh kapang yaitu botol nomor 1, 6, dan 12. Pekan terakhir pengamatan menunjukkan botol nomor 2 juga terkontaminasi sehingga hasil akhir keseluruhan terdapat lima buah botol yang terkontaminasi dan semuanya merupakan kontaminasi jenis kapang.



Gambar 2. Histogram perbandingan tingkat kontaminasi petiolus M1 dan M2 selama 4 pekan

Tabel 1. Rekapitulasi Kontaminasi Eksplan *Centella asiatica* L. Urban

Metode	Eksplan	Total Eksplan	Jumlah Kontaminasi (per Pekan)												Total Kontaminasi (%)
			Pekan 1			Pekan 2			Pekan 3			Pekan 4			
			B	K	Σ	B	K	Σ	B	K	Σ	B	K	Σ	
1	Lamina	15	0	4	4	0	8	8	0	9	9	0	10	10	66 %
	Petiolus	15	0	2	2	0	4	4	0	4	4	0	5	5	33 %
2	Lamina	15	0	0	0	0	4	4	0	5	5	0	6	6	40%
	Petiolus	15	0	0	0	0	1	1	0	4	4	0	5	5	33%

Keterangan : B = Kontaminasi oleh bakteri/khamir, K = Kontaminasi oleh Kapang

Berdasarkan hasil pengamatan, tingkat kontaminasi eksplan petiolus metode satu dan metode dua memperlihatkan hasil yang sama yaitu kontaminasi ditemukan di lima botol kultur. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh struktur morfologi petiolus yang berbentuk batang silindris. Struktur tersebut cenderung lebih memudahkan proses sterilisasi eksplan karena petiolus tidak saling menempel saat perendaman seperti yang terjadi pada lamina. Akibatnya, hasil pengamatan tidak menunjukkan secara spesifik metode mana yang lebih baik untuk sterilisasi petiolus.

Pengamatan respons eksplan dan media

Pengamatan lain yang dilakukan adalah pengamatan respons eksplan. Respons eksplan yang diamati dibagi menjadi pencokelatan, pemanjangan, dan pelekukan. Kultur lamina dengan menggunakan metode satu menghasilkan respons pencokelatan di semua eksplan, dan terdapat dua eksplan yang memperlihatkan dua respons pelekukan, sedangkan kultur lamina dengan metode dua memperlihatkan pencokelatan di semua eksplan.

Kultur petiolus metode satu memperlihatkan hasil delapan eksplan mengalami pencokelatan, tiga eksplan mengalami pelekukan, satu eksplan mengalami pemutihan, dua eksplan mengalami pemanjangan, satu eksplan mengalami pencokelatan namun hanya di ujungnya saja dan satu eksplan tidak memperlihatkan respons apa pun. Kultur petiolus metode dua memperlihatkan hasil delapan eksplan mengalami pencokelatan, satu eksplan mengalami pelekukan, satu eksplan mengalami pencokelatan namun hanya di satu sisi, satu eksplan mengalami pemutihan dan satu eksplan mengalami pemanjangan.

Respons pencokelatan dapat terjadi karena adanya enzim polifenol oksidase yang dilepaskan oleh tumbuhan dalam kondisi oksidatif ketika jaringan tumbuhan mengalami pelukaan. Enzim tersebut mengoksidasi senyawa fenol dengan oksidator berupa Cu⁺² dan oksigen yang kemudian menghasilkan senyawa quinon. Senyawa quinon ketika berinteraksi dengan protein akan berubah menjadi senyawa melanat yang berwarna coklat.

Senyawa tersebut jika terakumulasi dalam jumlah banyak akan menjadi racun bagi tumbuhan (George dan Sherrington, 1984).

Reaksi pencokelatan ditemukan hampir di semua jenis eksplan baik eksplan lamina maupun eksplan petiolus. Hal tersebut disebabkan oleh adanya pelukaan yang terjadi pada jaringan eksplan sehingga memicu reaksi sintesis senyawa melanat yang berwarna coklat. Peristiwa pencokelatan dapat dicegah dengan cara memberikan senyawa adsorban dan antioksidan. Senyawa adsorban yang umum digunakan dalam kultur *in vitro* antara lain arang aktif dan *polivinilpirolidon*, sedangkan antioksidan yang umum digunakan adalah asam askorbat (Abdelwahd *et al.*, 2008).

Hasil pengamatan lain menunjukkan bahwa terjadi reaksi pemanjangan pada eksplan. Biasanya respons pemanjangan diperlihatkan pada eksplan yang ditumbuhkan dalam media yang diberikan tambahan hormon. Namun, respons pemanjangan tetap ditemukan dalam media yang tidak diberikan hormon. Hal tersebut

dapat terjadi kemungkinan karena adanya aktivitas dari hormon endogen yang masih terdapat di dalam eksplan sehingga memungkinkan terjadinya pertumbuhan eksplan.

Dengan demikian, dapat dilihat bahwa tingkat kontaminasi lebih tinggi terjadi pada metode M1, sedangkan tingkat kontaminasi pada metode M2 masih cukup tinggi yaitu di atas 50%. Namun demikian, respons yang ditunjukkan oleh metode M1 beragam karena adanya respons pemutihan, pelekukan, dan pemanjangan pada beberapa eksplan sedangkan pada metode M2 secara umum lebih banyak terlihat respon pencokelatan yang terjadi hampir di semua eksplan.

KESIMPULAN

Pengamatan kontaminasi menunjukkan bahwa metode terbaik adalah metode 2 (M2) dengan kontaminasi lamina sebanyak 40% dan kontaminasi petiolus sebanyak 33%. Respons eksplan pada metode M1 dan M2 memperlihatkan adanya respons pencokelatan, pelekukan, dan pemanjangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas B. 2011. Prinsip Dasar Kultur Jaringan. Penerbit Alfabeta, Bandung : x +138 hlm.
- Abdelwahd RN, Hakam M, Labhilili SM, Udupa. 2008. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. *African Journal of Biotechnology*, 7(8): 997-1002.
- BPOM RI. 2004. Monografi ekstrak tumbuhan obat Indonesia. Vol. 1. BPOM RI, Jakarta: xi + 159 hlm.
- BPOM RI. 2010. Booklet Pegagan. BPOM RI, Jakarta : iv + 14
- Dewoto HR. 2007. Pengembangan obat tradisional Indonesia menjadi fitofarmaka. *Majalah Kedokteran Indonesia*, 57(7): 205-211.

- Efrizal RA. 2009. Pemeriksaan kelompok senyawa triterpenoid pada akar adventif hasil kultur *in vitro* daun *Centella asiatica* (L.) Urban (pegagan). Skripsi S-1. Departemen Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Depok: vii + 83 hlm.
- Gamborg OL dan GC Phillips (ed). 1995. Plant cell, tissue and organ culture: Fundamental methods. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York: xxiv + 358 hlm.
- George EF dan PD Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial laboratory. Exegetics Limited, Basingstoke: viii + 709 hlm.
- Hassan BAR. 2012. Medicinal plants (important and uses). *Pharmaceutica Analytica Acta*, 3: 10.
- Kartini E. 1996. Sterilan yang sesuai untuk budidaya *in vitro* tunas *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. *Chimera*, 1(2): 56-66.
- Mohapatra H, DP Barik dan SP Rath. 2008. A brief communication: *In vitro* regeneration of medicinal plant *Centella asiatica*. *Biologia Plantarum*, 52(2): 339-342.
- Patra A, B Rai, GR Rout, P Das. 1998. Successful plant regeneration from callus culture of *Centella asiatica* (Linn.) Urban. *Plant Growth Regulation*, 24: 13-16.
- Pierik RLM. 1997. *In vitro* culture of higher plants, 4th ed. Springer Science+Business Media Dordrecht, Dordrecht: v + 348 hlm.
- Pribadi ER. 2009. Pasokan dan Permintaan Tanaman Obat Indonesia Serta Arah Penelitian dan Pengembangannya. *Perspektif*, 8 (1) : 52 – 64
- Santa GP dan B Prajogo. 1992. Studi taksonomi *Centella asiatica* (L.) Urban. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*, 1(2): 46-47.
- Shukla A, AM Rasik, GK Jain, R Shankar, DK Kulshrestha, BN Dhawan. 1999. *In vitro* and *in vivo* wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. *Journal of Ethnopharmacology*, 65: 1-11.
- Singh S, A Gautam, A Sharma, A Batra. 2010. *Centella asiatica* L.: A plant with immense medicinal potential but threatened. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 4(3): 9-17.
- Suryowinoto M. 1996. Pemuliaan tanaman secara *in vitro*. Kanisius, Yogyakarta: 5-252 hlm.
- Tiwari KN, NC Sharma, V Tiwari, BD Singh. 2000. Micropropagation of *Centella asiatica* (L.), a valuable medicinal herb. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63: 179-185.