

## Skrining Marka ISSR untuk Autentikasi Pegagan (*Centella asiatica* [L.] Urb.) (Screening of ISSR Markers for Pegagan [*Centella asiatica* [L.] Urb] Authentication)

Dyah Subositi\*, Harto Widodo, dan Nita Supriyati

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Jl. Lawu, Tawangmangu, Karanganyar, Indonesia

Telp. (0622)71697010, Faks. (0622)71697010

\*E-mail: dyah.subositi@gmail.com

Diajukan: 4 November 2015; Direvisi: 28 Desember 2015; Diterima: 31 Maret 2016

### ABSTRACT

Pegagan (*Centella asiatica*) is a medicinal plant widely used as raw material for herbal medicine and cosmetics industries. Pegagan is frequently adulterated with puser bumi (*Hydrocotyle verticillata*) as both have the same local name that is “pegagan”. Morphological identification and biochemical markers that used in the authentication of medicinal plant has many limitations due to the age, physiology and environmental conditions. Molecular markers have become one of the most reliable methods for identification and authentication medicinal plants. The aim of this study was to screen of ISSR markers for pegagan (*C. asiatica*) authentication. Genomic DNA isolation was done on pegagan, puser bumi and mixture of pegagan-puser bumi. Thirty ISSR markers were used for amplification and initial screening of pegagan and puser bumi DNA. A total of 164 DNA fragments were amplified, of which 128 were polymorphic (78%). Among 4 markers have been found to distinguish pegagan and puser bumi. The (GA)8CTT marker generated one specific fragment that was clearly amplified in pegagan and one specific fragment of puser bumi amplified using (AG)8T marker. The (CT)8G and (GT)6CC markers each generated 4 specific fragments which were specific for pegagan and puser bumi. Pegagan (*C. asiatica*) could be distinguished from *H. verticillata* using selected ISSR marker.

**Keywords:** pegagan (*Centella asiatica*), puser bumi (*Hydrocotyle verticillata*), authentication, ISSR marker.

### ABSTRAK

Pegagan (*Centella asiatica*) merupakan tumbuhan yang banyak digunakan sebagai bahan baku obat tradisional dan kosmetik. Pegagan seringkali dipalsukan atau disamakan dengan puser bumi (*Hydrocotyle verticillata*) yang mempunyai nama lokal yang sama “pegagan”. Identifikasi morfologi dan marker senyawa kimia untuk autentikasi tumbuhan obat mempunyai kelemahan karena dipengaruhi oleh umur tumbuhan, fisiologi, dan kondisi lingkungan. Penanda molekuler merupakan salah satu metode yang dapat dipercaya untuk identifikasi dan autentikasi tumbuhan obat. Penelitian ini bertujuan untuk skrining marka ISSR untuk autentikasi pegagan (*C. asiatica*). Tahap pertama, yaitu isolasi DNA pegagan, puser bumi, dan campuran keduanya. Sebanyak 30 marka ISSR digunakan untuk amplifikasi dan skrining awal pada pegagan dan puser bumi. Sebanyak 164 fragmen DNA teramplifikasi, 128 di antaranya polimorfik (78%). Empat marka mampu membedakan pegagan dan puser bumi. Marka (GA)8CTT menghasilkan satu fragmen spesifik yang jelas pada pegagan dan satu fragmen spesifik pada puser bumi yang dihasilkan dari marka (AG)8T. Marka (CT)8G dan (GT)6CC masing-masing menghasilkan 4 fragmen spesifik pada pegagan dan puser bumi. Pegagan (*C. asiatica*) dan puser bumi (*H. verticillata*) dapat dibedakan dengan amplifikasi menggunakan marka ISSR terpilih.

**Kata kunci:** pegagan (*Centella asiatica*), puser bumi (*Hydrocotyle verticillata*), autentikasi, marka ISSR.

## PENDAHULUAN

Pegagan (*Centella asiatica* [L.] Urb.) merupakan salah satu tumbuhan obat populer yang banyak dimanfaatkan secara tradisional maupun sebagai salah satu bahan baku industri obat tradisional dan kosmetik. Tanaman ini mempunyai khasiat sebagai penambah daya ingat (*brain tonic*), obat luka, obat sakit perut, obat demam, obat batuk, dan perawatan kulit. Pegagan merupakan terna menahun, batang menjalar, panjang tanaman berkisar antara 0,1–0,8 m, tidak berbatang, daun dalam roset, 2–10 per roset, bentuk ginjal, tepi beringgit-bergigi dengan panjang 1–7 cm, lebar 1,5–9 cm, dan panjang tangkai daun 1–50 cm. Tanaman obat ini memiliki bunga majemuk berbentuk payung, soliter atau 2–5 karangan bersama, jumlah bunga tiga kuntum tiap karangan (Backer dan van den Brink, 1965).

Simplisia pegagan tidak mudah dibedakan dengan adulterannya *Bacopa monnieri* dan genus *Hydrocotyle*, karena mempunyai nama lokal yang sama, terlebih lagi sudah dalam bentuk serbuk. Genus *Hydrocotyle* banyak digunakan untuk adulterasi *C. asiatica* karena mempunyai nilai ekonomis yang lebih rendah dan lebih mudah ditemukan. Genus *Hydrocotyle* yang sering digunakan sebagai adulteran pegagan antara lain, yaitu *Hydrocotyle javanica*, *Hydrocotyle rotundifolia*, dan *Hydrocotyle verticillata* (Daminar dan Bajo, 2013; Jamil *et al.*, 2007).

Puser bumi (*Hydrocotyle verticillata*) merupakan terna yang hidup di lingkungan lembab atau berair, tinggi batang mencapai 10 cm. Tanaman ini memiliki daun tunggal, bentuk helaian daun bulat, tangkai daun di tengah helaian, tepi daun bergiri, permukaan halus, diameter 4–5 cm, bunga majemuk berkarang (Preston dan Constance, 2013). Puser bumi dipercaya mempunyai khasiat sebagai antiradang, anemia, asma, demam, dan peluruh air seni (Daminar dan Bajo, 2013).

Identifikasi tanaman sebagai bahan baku obat merupakan persyaratan penting yang menjamin kualitas produk herbal yang akan dihasilkan. Kekeliruan atau adulterasi (pemalsuan) bahan herbal dapat terjadi secara sengaja maupun tidak sengaja (Biswas dan Biswas, 2014; Jayasinghe *et*

*al.*, 2009). Kekeliruan yang tidak sengaja terjadi karena kurangnya pengetahuan untuk identifikasi spesies, nama lokal sama, kemiripan morfologi, aroma, dan kekuranghati-hatian pada saat mengoleksi (Biswas dan Biswas, 2014). Adulterasi secara sengaja bertujuan untuk mengganti tanaman utama dengan tanaman sejenis yang lebih mudah diperoleh dan lebih murah (Kiran *et al.*, 2010).

Terdapat tiga teknik untuk autentifikasi pegagan, yaitu melalui identifikasi morfologi dan anatomi secara menyeluruh, profil kimia, dan profil genetik/DNA ((Joseph *et al.*, 2001; Joshi dan Khan, 2008; Techen *et al.*, 2011). Autentifikasi diperlukan untuk mengetahui kekeliruan, penggantian maupun pemalsuan bahan baku utama obat dengan spesies atau varietas yang mempunyai morfologi maupun fitokimia yang susah dibedakan (Ngan *et al.*, 1999).

Penanda molekuler DNA dapat digunakan untuk identifikasi taksonomi, hubungan kekerabatan, dan autentikasi tumbuhan obat karena setiap spesies mempunyai komposisi genetik yang unik dan tidak terpengaruh oleh kondisi lingkungan, umur, dan kondisi fisiologis (Feng *et al.*, 2010).

*Inter simple sequence repeats* (ISSR) merupakan salah satu penanda untuk studi genetik tumbuhan. Menurut Zhou *et al.* (2008) ISSR merupakan penanda molekuler yang paling banyak digunakan untuk mempelajari genetik populasi, sidik DNA, dan studi filogenetik pada tanaman karena mempunyai sifat yang sangat sensitif, efektif, polimorfisme tinggi, dan reproduibel. Penanda molekuler ISSR yang telah digunakan untuk autentifikasi tanaman obat antara lain *Panax sp.* (In *et al.*, 2005), *Exocarpium citrigrandis* (Su *et al.*, 2010), *Rheum officinale* (Wang, 2011), *Cissampelos pareira* L. var. *hirsuta* (Vijayan *et al.*, 2014). Penelitian ini bertujuan untuk skrining marka ISSR sebagai tahapan awal untuk autentikasi pegagan (*C. asiatica*) dengan adulterannya, yaitu puser bumi (*H. verticillata*).

## BAHAN DAN METODE

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah pegagan dan puser bumi dan campuran pegagan-puser bumi yang diperoleh dari kebun

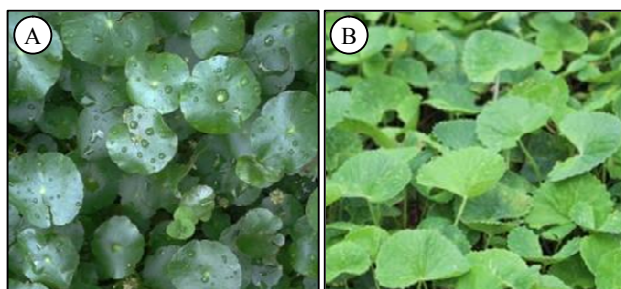
koleksi Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) (Gambar 1). Identifikasi spesies dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Obat B2P2TOOT. Hasil identifikasi pegagan mempunyai nama ilmiah *Centella asiatica* (L.) Urb anggota famili Apiaceae. Puser bumi diidentifikasi sebagai *Hydrocotyle verticillata* Thunb. yang merupakan anggota famili Araliaceae. Salah satu sinonim untuk *C. asiatica* adalah *Hydrocotyle asiatica* L., sedangkan salah satu sinonim *H. verticillata* yaitu *Centella verticillata* (Thunb.) Fourc. ([www.plantlist.org](http://www.plantlist.org)).

Daun muda pegagan dan puser bumi masing-masing 0,1 g disimpan pada freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ , kemudian diisolasi menggunakan protocol dan kit isolasi DNA (*Sigma Gen Elute Plant Genomic DNA Miniprep Kit*). Hasil isolasi DNA genom masing-masing sampel diencerkan 1.000 kali dan diukur absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm ( $\lambda_{260/280}$ ) untuk menentukan kemurnian dan konsentrasi DNA.

Amplifikasi DNA menggunakan 30 marka ISSR (Tabel 1). Sebanyak 2  $\mu\text{l}$  template (25 ng DNA genom), 1  $\mu\text{l}$  marka, 12,6  $\mu\text{l}$  PCR mix, kemudian ditambah  $\text{d}_2\text{O}$  hingga volume 25  $\mu\text{l}$ . Campuran tersebut dimasukkan dalam *Thermocycler* (BioRad) dengan program sebagai berikut: predenaturasi  $95^{\circ}\text{C}$  selama 3 menit, dilanjutkan sebanyak  $39 \times$  siklus yang terdiri atas tahap denaturasi  $95^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit, *annealing*  $48\text{--}54^{\circ}\text{C}$  (tergantung marka) selama 50 detik, dan *elongation*  $72^{\circ}\text{C}$  selama 2 menit, kemudian dilanjutkan *extention*  $72^{\circ}\text{C}$  selama 8 menit dan pada  $4^{\circ}\text{C}$  sebagai *holding temperature*.

Produk amplifikasi dicek menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,8% yang telah diberi *SYBR safe green* pada 80 volt selama 70–90 menit. Visualisasi hasil elektroforesis menggunakan sinar UV pada alat *Gel Documentation System* (BioRad).

Fragmen-fragmen DNA hasil amplifikasi tiap fragmen dipilih berdasarkan ketebalan pita dan polimorfisme yang dihasilkan. Polimorfisme dihitung berdasarkan fragmen DNA yang dihasilkan dari masing-masing marka. Apabila terdapat fragmen DNA yang tebal/jelas dan berbeda atau spesifik pada pegagan dan puser bumi serta muncul



Gambar 1. Sampel yang digunakan dalam penelitian. A = puser bumi (*Hydrocotyle verticillata*), B = pegagan (*Centella asiatica*).

Tabel 1. Fragmen DNA pegagan dan puser bumi hasil amplifikasi menggunakan 30 marka ISSR.

Marka	Fragmen monomorfik	Polimorfisme (%)	Fragmen spesifik			
			Pegagan		Puser bumi	
			Kuat	Lemah	Kuat	Lemah
(AC)8T	1	83,3	-	2	1	2
(AC)9G	-	100	2	-	-	5
(ACC)6G	4	50	1	-	1	2
(ACTG)5	-	100	-	-	-	2
(AG)8C	-	100	2	2	1	1
(AG)8CTT	1	83,3	2	-	-	3
(AG)8RC	-	100	2	-	-	4
(AG)8T	1	80	-	3	1	-
(AG)8YT	2	60	1	1	-	1
(AG)9C	1	88,9	3	2	1	2
(CA)6AG	2	75	-	1	1	4
(CA)6GT	1	83,3	-	1	-	4
(CA)8G	2	77,8	1	2	-	4
(CAC)3GC	4	50	-	1	-	3
(CAG)5	1	80	-	2	1	1
(CT)8G	-	100	1	-	1	-
(CT)8GC	3	66,7	2	-	-	4
(CT)8RA	2	66,7	-	2	-	2
(CT)8RG	-	100	-	1	-	-
(CT)8TG	-	100	-	3	-	2
(GA)8A	1	80	2	1	1	-
(GA)8C	-	0	-	-	-	-
(GA)8CTT	-	100	1	-	-	2
(GA)8T	-	0	-	-	-	-
(GACA)4	3	50	-	1	-	2
(GT)6CC	-	100	1	2	2	1
(GTG)3GC	3	62,5	2	-	-	3
(TG)8A	1	83,3	1	-	-	4
(TG)8AGT	2	71,4	1	2	-	2
(TG)8RT	1	75	-	2	-	1
Total	36	78	25	31	11	61

Kuat = fragmen DNA tebal, jelas, dan tereksresi pada campuran kedua bahan, Lemah = fragmen DNA tipis, *smear*, dan tidak tereksresi pada campuran kedua bahan.

di campuran keduanya maka fragmen tersebut sebagai kandidat marka genetik untuk autentifikasi pegagan.

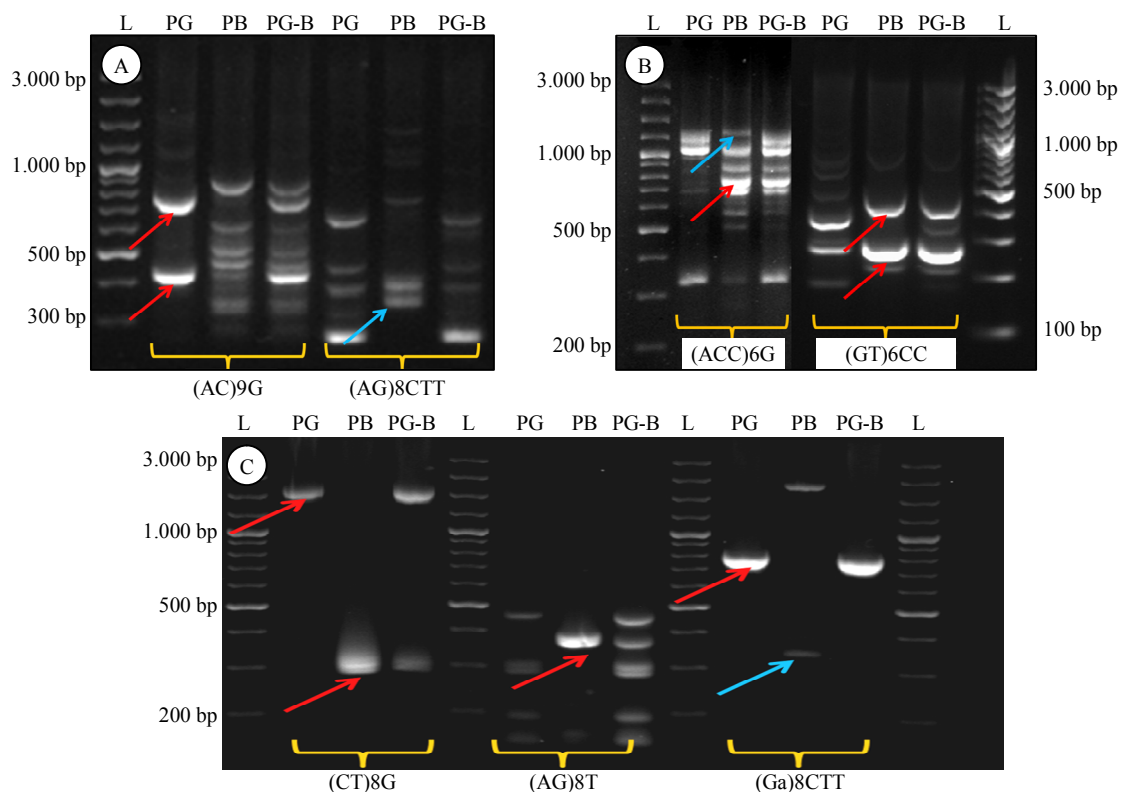
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Keberanian identitas bahan baku tanaman obat merupakan tahap pertama untuk memastikan kualitas, khasiat, dan keamanan produk herbal yang dihasilkan. Penanda molekuler ISSR merupakan salah satu penanda molekuler yang mempunyai kelebihan dibanding dengan karakterisasi morfologi maupun profiling senyawa kimia untuk autentikasi pegagan. Sebanyak 164 fragmen dihasilkan dari amplifikasi menggunakan 30 marka ISSR. Terdapat dua marka yang tidak dapat di-amplifikasi sehingga tidak menghasilkan fragmen DNA, yaitu marka (GA)8C dan (GA)8T (Tabel 1).

Polimorfisme yang dihasilkan dari pegagan dan puser bumi berkisar antara 50–100% dengan rata-rata 78%. Sebanyak sembilan marka menghasilkan polimorfisme 100% dengan motif marka terbanyak (AC)<sub>n</sub> dan (CT)<sub>n</sub>, sedangkan dua marka dengan motif (AG)<sub>8n</sub> tidak teramplifikasi.

Fragmen DNA yang dihasilkan pada semua marka berukuran 150–1.900 bp.

Selain berdasarkan polimorfisme, fragmen DNA yang dihasilkan pada masing-masing marka dipilih berdasarkan ketebalan dan kejelasan fragmen serta terekspresi atau tidaknya pada campuran kedua bahan (Gambar 2). Marka yang diujikan pada pegagan dan puser bumi menghasilkan fragmen spesifik baik yang muncul atau tidak terekspresi pada campuran keduanya. Empat marka, yaitu (GT)6CC, (CT)8G, (AG)8T, dan (GA)8CTT menunjukkan fragmen spesifik serta terekspresi pada campuran pegagan dan puser bumi. Marka (GA)8CTT menghasilkan pita DNA spesifik pada pegagan dengan nilai 720 bp, marka (AG)8T menghasilkan pita DNA spesifik puser bumi dengan nilai 380 bp. Amplifikasi dengan marka (CT)8G menghasilkan pita DNA spesifik pada pegagan dengan nilai 1.500 bp, pada puser bumi sebesar 300 bp, serta marka (GT)6CC menghasil-



Gambar 2. Fragmen DNA pegagan (PG), puser bumi (PB), dan campuran pegagan-puser bumi (PG-B) menggunakan marka ISSR. A = marka (AC)9G dan (AG)8CTT, B = marka (ACC)6G dan (GT)6CC, C = marka (CT)8G, (AG)8T, dan (Ga)8CTT. Panah merah = fragmen DNA tebal, jelas dan terekspresi pada campuran kedua bahan, panah biru = fragmen DNA tipis, *smear*, dan tidak terekspresi pada campuran kedua bahan.

kan pita DNA spesifik pada pegagan dengan nilai 350 bp dan pada puser bumi dengan nilai 250 bp dan 400 bp.

Marka (GA)8C dan (GA)8T tidak menghasilkan fragmen DNA saat amplifikasi. Hal ini kemungkinan disebabkan karena marka tidak cocok atau prosedur PCR kurang tepat terutama, *annealing temperature*. Fragmen DNA hasil amplifikasi berkualitas rendah (fragmen DNA tipis) bahkan tidak teramplifikasi karena ketidakcocokan marka (Fang dan Roose, 1997). Kondisi optimal terutama *annealing temperatur* pada saat PCR merupakan persyaratan utama untuk memperoleh fragmen yang tebal dan jelas serta dengan tingkat polimorfisme yang tinggi (Yadav *et al.*, 2012).

Jumlah marka dalam penelitian ini yang menghasilkan fragmen spesifik sejumlah empat marka dari total 30 marka yang diujikan. Hasil serupa juga ditunjukkan pada penelitian Tripathi *et al.* (2012), yaitu hanya 2 marka ISSR yang menghasilkan fragmen spesifik dan unik untuk autentikasi *C. asiatica* dan *B. monieri* dari 30 marka ISSR yang digunakan. Su *et al.* (2010) juga melakukan skrining terhadap 76 marka ISSR untuk autentikasi *E. citrigrandis*, enam di antaranya menghasilkan tingkat polimorfisme yang tinggi dan dapat digunakan sebagai marker.

Marka ISSR yang digunakan untuk autentikasi dipilih berdasarkan polimorfisme yang tinggi tetapi mempunyai fragmen yang sedikit, jelas, unik untuk pegagan dan atau puser bumi serta ter-ekspressi pada campuran kedua bahan tersebut. Teknik penanda molekuler berdasarkan jumlah polimorfisme yang terdeteksi pada setiap aksesi atau spesies dan fragmen DNA yang unik/spesifik mampu membedakan dengan adulterannya (Tharachand *et al.*, 2012).

Gutteride dan Burns (2013) menyatakan karakterisasi fenotipe atau morfologi umumnya bersifat subjektif sedangkan mikroskopi membutuhkan keahlian. Identifikasi morfologi sulit dilakukan apabila tanaman obat sudah menjadi simplisia kering dan serbuk, dua bentuk inilah yang umumnya sudah didistribusikan ke industri (Yadav *et al.*, 2012). Mukherjee *et al.* (2010) menyatakan bahwa autentikasi tumbuhan obat dapat dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis, akan tetapi

tergantung pada kemampuan dan pengalaman peneliti serta tidak cocok untuk material tumbuhan dalam bentuk fragmen maupun serbuk. Autentikasi dengan menggunakan metode TLC, HPLC, IR, dan NMR untuk mengetahui profil senyawa kimia tumbuhan obat dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan.

Identifikasi spesies menggunakan basis molekuler/DNA tidak cukup untuk menentukan kualitas dan produk yang dihasilkan karena suatu tumbuhan merupakan produk dari genom dan lingkungan (Da-Cheng *et al.*, 2010). Autentikasi dan evaluasi menggunakan parameter yang lengkap dapat menyediakan informasi tumbuhan obat secara utuh. Identifikasi yang tepat dan jaminan mutu merupakan syarat penting untuk memastikan keberlangsungan kualitas produk yang berasal dari tumbuhan obat karena akan menentukan khasiat dan keamanannya (Vijayan *et al.*, 2014).

Autentikasi bahan baku sebaiknya dilakukan tidak hanya menggunakan satu jenis metode untuk memberikan hasil yang tepat dan maksimal. Pemilihan metode autentikasi dapat didasarkan pada jenis spesies tumbuhan obat yang diuji dan sumber daya yang tersedia. Penanda molekuler dapat digunakan sebagai salah satu alternatif maupun pelengkap untuk autentikasi tumbuhan obat yang digunakan sebagai bahan baku obat tradisional. Empat marka ISSR terpilih dapat digunakan untuk amplifikasi dalam rangka autentikasi pegagan dengan salah satu adulterannya, yaitu puser bumi dengan mengikuti prosedur amplifikasi yang sama untuk memperoleh hasil yang reproduisibel.

## KESIMPULAN

Penanda molekuler ISSR dapat digunakan sebagai salah satu metode untuk autentikasi pegagan (*C. asiatica*). Skrining marka ISSR menghasilkan empat marka terpilih, yaitu (GA)8CTT dengan ukuran fragmen 720 bp pada pegagan, fragmen 380 bp pada puser bumi menggunakan marka (AG)8T, (CT)8G dengan ukuran fragmen 1.500 bp untuk pegagan dan 300 bp pada puser bumi, serta (GT)6CC yang menghasilkan fragmen 350 bp pada pegagan dan fragmen 250 bp pada

puser bumi. Keempat marka tersebut dapat digunakan untuk membedakan pegangan dengan puser bumi (*H. verticillata*) yang merupakan salah satu adulterannya.

### DAFTAR PUSTAKA

- Backer, C.A. and R.C.B. van den Brink. 1965. Flora of Java (*Spermatophytes Only*). Vol. II. NVP Noordhoff. Groningen, Netherlands.
- Biswas, K. and R. Biswas. 2014. DNA molecular markers based authentication of herbal drugs-A review. *IJPRS3*(1):581–593.
- Da-Cheng, H., C. Shi-lin, X. Pei-gen, and P. Yong. 2010. Authentication of medicinal plants by DNA-based markers and genomics. *CHM* 2(4):250–261.
- Daminar, N.L. and L.M. Bajo. 2013. Isolation and partial characterization of the most bioactive metabolite from the hexane extract of the aerial part of *Hydrocotyle verticillata* (whorled marshpennywort). *GJSFR* 13(2):1–8.
- Fang, D.Q. and M.L. Roose. 1997. Identification of closely related *Citrus* cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95:408–417.
- Feng, T., S. Liu, and X-J. He. 2010. Molecular authentication of the traditional Chinese medicinal plant *Angelica sinensis* based on internal transcribed spacer of nrDNA. *Electron. J. Biotechnol.* 13(1):1–10
- Gutteridge, A. and M. Burns. 2013. The application of DNA molecular approaches for the identification of herbal medicinal products. *J. Assoc. Public. Anal.* 41:53–66.
- In, D.S., Y.C. Kim, K.H. Bang, J.W. Chung, O.T. Kim, D.Y. Hyun, S.W. Cha, T.S. Kim, and N.S. Seong. 2005. Genetic relationship of *Panax* species by RAPD and ISSR analysis. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 13(5):249–253.
- Jamil, S.S., Q. Nizami, and M. Salam. 2007. *Centella asiatica* (Linn.) Urban a review. *Nat. Prod. Radiance* 6(2):158–170.
- Jayasinghe, R., N.L. Hai, T.E. Coram, and S. Kong. 2009. Effectiveness of an innovative prototype subtracted diversity array (SDA) for fingerprinting plant species of medicinal importance. *Planta Med.* 75:1180–1185.
- Joseph, G.V.R., S. Cathurvedi, and S.S. Deokule. 2001. Standardisation and quality evaluation of *Centella asiatica* Linn. *Anc. Sci. Life* 20(4):99–110.
- Joshi, V.C. and I.A. Khan. 2008. Morphological characterization of medicinal plant *Centella asiatica* (L.) Urb. and detection of its possible substitutes. *Planta Med.* 74(3):2.
- Khan, S., K.J. Mirza, F. Al-Qurainy, and M.Z. Abdin. 2011. Authentication of the medicinal plant *Senna angustifolia* by RAPD profiling. *Saudi J. Biol. Sci.* 18:287–292.
- Kiran, U., S. Khan, K.J. Mirza, M. Ram, and M.Z. Abdin. 2010. SCAR markers: A potential tool for authentication of herbal drugs. *Fitoterapia* 81:969–976.
- Mukherjee, P.K., V. Pitchairajan, V. Murugan, P. Sivasankaran, and Y. Khan. 2010. Strategies for revitalization of traditional medicine. *Chin. Herb. Med.* 2:1–15.
- Ngan, F., P. Shaw, P. But, and J. Wang. 1999. Molecular authentication of *Panax* species. *Phytochemistry* 50(5):787–791.
- Preston, R.E. and L. Constance. 2013. Araliaceae ginseng family. Jepson Herbarium University of California. [http://ucjeps.berkeley.edu/cgi-bin/get\\_IJM.pl?tid=28611](http://ucjeps.berkeley.edu/cgi-bin/get_IJM.pl?tid=28611). (Diakses 4 Agustus 2015).
- Su, C., K.L. Wong, P.P.H. But, W.W. Su, and P.C. Shaw. 2010. Molecular authentication of the Chinese herb Huajuhong and related medicinal material by DNA sequencing and ISSR markers. *J. Food Drug. Anal.* 18(3):161–170.
- Techen, N., V.C. Joshi, C.S. Rumalla, and I.A. Khan. 2011. Validation of the medicinal plant *Centella asiatica* (L.) Urb. and detection of its possible substitutes. *Planta Med.* 77:1–10.
- Tharachand, C., I.C. Selvaraj, and M.N. Mythili. 2012. Molecular markers in characterization of medicinal plants: An overview. *Res. Plant Biol.* 2(2):1–12.
- Tripathi, N., N. Saini, and S. Tiwari. 2012. Development of ISSR and RAPD markers for authentication of *Centella asiatica* and *Bacopa monnieri*. *J. Biotechnol. Biomater.* 2(6):239.
- Vijayan, D., A. Cheethaparambil, G.S. Pillai, and I. Balachandran. 2014. Molecular authentication of *Cissampelos pareira* L. var. *hirsuta* (Buch.-Ham. ex DC.) Forman, the genuine source plant of ayurvedic raw drug 'Patha', and its other source plants by ISSR markers. *Biotech.* 4:559–562.
- Wang, X.M. 2011. Inter-simple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating the genuine species of rhubarb. *J. Med. Plants Res.* 5(5):758–764.
- Yadav, A., J. Ahmad, A.A. Chaudary, and A. Ahmad. 2012. Development of sequence characterized amplified region (SCAR) marker for the authentication of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. *European J. Med. Plants* 2(3):186–198.
- Zhou, Y., C. Zhou, H. Yao, Y. Liu, and R. Tu. 2008. Application of ISSR markers in detection of genetic variation among Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb) cultivars. *Life Sci. J.* 5(4):6–12.