

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Stevia (Stevia rebaudiana) merupakan salah satu jenis tanaman obat di Indonesia yang memiliki keunikan berupa rasa manis pada daunnya. Daun stevia ini mengandung sejumlah senyawa glikosida diterpen dengan steviol sebagai aglikonnya. Komponen utama yang memberikan rasa manis dan terkandung paling banyak pada daun stevia adalah steviosida (Daneshyar dkk., 2010), yang diperkirakan 300 kali lebih manis dari sukrosa (Geuns, 2003).

Bahan pemanis ini telah digunakan di banyak negara sebagai pemanis alami non-kalori, sehingga dapat direkomendasikan untuk penderita diabetes mellitus tipe 2 dan penderita obesitas (Jagatheeswari dan Ranganathan, 2012). Penggunaannya juga telah diuji dan tidak memberikan efek samping (Megaji dkk., 2005 dalam Saikar dkk., 2009). Daun stevia memiliki banyak manfaat, selain rasa manis dan tanpa efek samping, juga berpotensi memberikan manfaat kesehatan sebagai antihiperlipidemik (Jeppesen dkk., 2002), antihipertensi (Hsu dkk., 2002) dan menjaga kesehatan gigi (Geuns dkk., 2003a dalam Daneshyar dkk., 2010).

Potensi yang dimiliki oleh stevia menjadi perhatian banyak orang sehingga banyak pula keinginan untuk mengembangkan tanaman ini. Kemampuan biji stevia untuk berkecambah sangatlah rendah dan propagasi secara vegetatif juga terbatas dilakukan karena rendahnya jumlah individu yang dapat diperoleh dari satu tanaman induk (Sivaram dan Mukundan, 2003 ; Saikar dkk., 2009 ; Janarthanam dkk., 2010).

Oleh karena itu, kultur *in vitro* dapat menjadi alternatif dan sebagai sumber yang efisien untuk produksi metabolit sekunder (Janarthanam dkk., 2010).

Kultur *in vitro* yang lebih berpotensi untuk digunakan dalam produksi metabolit sekunder adalah kultur suspensi sel dan kultur kalus (Rahardja dan Wiryanta, 2005). Banyak faktor yang dapat mempengaruhi inisiasi proliferasi dan sintesis metabolit sekunder dalam kultur kalus dan suspensi sel, seperti genotipe tumbuhan, komposisi medium dan faktor-faktor fisik dalam pertumbuhan sel seperti cahaya dan suhu (Siregar dkk., 2006). Penambahan zat pengatur tumbuh pada kalus dapat mempengaruhi produksi senyawa metabolit sekunder (Wardani dkk., 2004).

Penelitian ini menggunakan kultur kalus dan steviosida pada penelitian ini diperoleh dengan menginduksi kalus dari daun stevia. Kalus merupakan proliferasi massa jaringan yang belum terdiferensiasi. Kumpulan sel terbentuk di seluruh permukaan irisan eksplan, sehingga semakin luas irisan eksplan maka semakin cepat dan banyak kalus yang terbentuk (Herdaryono dan Wijayani, 1994). Induksi kalus dapat dioptimasi dengan kombinasi zat pengatur tumbuh (ZPT) berupa auksin dan sitokinin.

Komposisi medium kultur juga memainkan peranan penting dalam menentukan morfogenetik kalus (Gupta dkk., 2010). Wiryosoendjoyo (2009) telah berhasil menumbuhkan kalus dari eksplan daun stevia pada medium *New Phaeonopsis* (NP) dan menjelaskan bahwa pertumbuhan kalus pada eksplan daun stevia yang ditanam pada medium *Murashige and Skoog* (MS) membutuhkan waktu yang lebih lama dibandingkan pada medium NP. Hal ini karena medium MS memiliki konsentrasi

garam-garam mineral yang tinggi sehingga akan menyebabkan kondisi medium cenderung hipertonis yang menghambat pertumbuhan eksplan. Konsentrasi garam-garam mineral pada medium NP lebih rendah dibandingkan medium MS, sehingga dapat memacu pertumbuhan eksplan. Pada penelitian ini, medium kultur yang digunakan adalah medium $\frac{1}{2}$ MS dan NP.

Kandungan steviosida bergantung dari kultivar dan lingkungan pertumbuhannya, yaitu antara 5 – 22 % dari berat kering daun (Kennelly, 2002). Menurut Das dkk. (2006), senyawa glikosida steviol banyak disintesis di daun dari pada di akar dari tanaman stevia, sedangkan menurut Gupta dkk. (2010), eksplan daun merupakan materi tumbuhan terbaik untuk produksi kalus. Hendaryono dan Wijayani (1994) juga mengungkapkan untuk pemilihan eksplan sebagai bahan dasar pembentukan kalus sebaiknya dipilih bagian tanaman yang masih muda karena masih bersifat meristematik seperti ujung daun, ujung batang, keping biji dan sebagainya. Oleh karena itu, eksplan yang digunakan pada penelitian ini adalah bagian daun dari tanaman stevia yang masih muda.

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui kombinasi ZPT yang optimum untuk menginduksi kalus dan untuk memproduksi steviosida dari eksplan daun pada medium MS. Pada penelitian ini dilakukan dua tahap penelitian. Tahap pertama merupakan tahap induksi kalus daun stevia pada medium $\frac{1}{2}$ MS dan medium NP yang diberi hormon 2,4-D 1 mg/l. Tahap kedua merupakan tahap pemeliharaan kalus untuk produksi steviosida pada medium $\frac{1}{2}$ MS dan NP dengan variasi kombinasi ZPT.

B. Keaslian Penelitian

Janarthanam dkk. (2010) melakukan penelitian mengenai produksi metabolit sekunder melalui kultur kalus stevia dari eksplan nodus dan daun stevia. Berdasarkan penelitiannya, eksplan daun stevia menunjukkan respon induksi kalus dan proliferasi yang lebih baik daripada eksplan nodus, dimana 75% kalus terinduksi pada hari ke-12 setelah inokulasi dengan menggunakan hormon 2,4-D 1,0 mg/l. Produksi biomassa kalus dilakukan pada medium MS dengan kombinasi hormon yang berbeda. Pada medium produksi biomassa kalus, kombinasi hormon 2,4-D 0,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l + Kinetin 1,0 mg/l merupakan kombinasi hormon paling optimum.

Das dkk. (2006) melakukan penelitian dengan menginisiasi kalus dari eksplan daun stevia dan memeliharanya pada medium MS dengan konsentrasi garam medium yang berbeda, yaitu $\frac{1}{2}$ MS, 1 MS dan 2 MS. Kombinasi 2,4-D 1,0 mg/l + Kinetin 0,2 mg/l menunjukkan pertumbuhan kalus dengan proliferasi terbaik pada konsentrasi garam medium $\frac{1}{2}$ MS dan 1 MS, sedangkan kombinasi NAA 0,1 mg/l + BAP 2,0 mg/l sebagai kombinasi hormon terbaik untuk pemeliharaan kalus. Penggunaan medium MS dengan konsentrasi garam medium $\frac{1}{2}$ MS menunjukkan hasil yang lebih baik untuk pemeliharaan kalus. Kandungan persentase steviosida pada kalus yang tumbuh di medium $\frac{1}{2}$ MS (5,6%) lebih tinggi dibandingkan kalus yang tumbuh di medium 1 MS (4,45%).

Gupta dkk. (2010) juga melakukan penelitian untuk memproduksi senyawa steviol glikosida dengan menumbuhkan kalus dari eksplan daun salah satunya. Induksi kalus dilakukan dengan menggunakan berbagai kombinasi hormon seperti 2,4-D,

NAA, IBA dan kinetin. Kombinasi NAA 0,75 mg/l + 2,4-D 1 mg/l merupakan kombinasi hormon optimum yang mampu menginduksi kalus 100% setelah tiga minggu. Perbanyakkan kalus dilakukan dengan subkultur kalus pada medium MS dengan konsentrasi garam medium 1 MS dan $\frac{1}{2}$ MS. Jumlah kalus maksimum dari hasil subkultur kalus eksplan daun diperoleh dari perlakuan yang diberi NAA 2 mg/l.

Sivaram dan Mukundan (2003) juga telah melakukan penelitian dengan menggunakan daun stevia sebagai salah satu eksplannya. Kombinasi hormon BAP ($8.87 \mu\text{M} \approx 2 \text{ mg/l}$) dan IBA ($9.80 \mu\text{M} \approx 2 \text{ mg/l}$) pada medium MS merupakan kombinasi hormon yang dapat memberikan kandungan glikosida maksimal pada kalus (5,8%). Nilai ini lebih tinggi dari kandungan steviosida pada daun stevia *in vivo* maupun *in vitro* (4,9% dan 3,6%).

C. Perumusan Masalah

1. Apakah ada perbedaan kecepatan waktu induksi kalus dari eksplan daun stevia pada jenis medium yang berbeda?
2. Jenis medium dan kombinasi ZPT manakah yang mampu menghasilkan indeks pertumbuhan kalus terbesar?
3. Jenis medium dan kombinasi ZPT manakah yang mampu menghasilkan kadar steviosida terbesar?

D. Tujuan

1. Mengetahui perbedaan kecepatan waktu induksi kalus dari eksplan daun stevia pada jenis medium yang berbeda.
2. Mengetahui jenis medium dan kombinasi ZPT terbaik yang mampu menghasilkan indeks pertumbuhan kalus terbesar.
3. Mengetahui jenis medium dan kombinasi ZPT terbaik yang mampu menghasilkan kadar steviosida terbesar.

E. Manfaat

Manfaat teoritis dari penelitian ini adalah sebagai sumber informasi atau referensi untuk penelitian selanjutnya yang menggunakan stevia sebagai objek penelitiannya, khususnya untuk produksi metabolit sekunder. Manfaat praktis dari penelitian ini untuk meningkatkan produksi steviosida dari kalus daun stevia.