II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Deskripsi Tanaman *Stevia rebaudiana*

Menurut Geuns (2003), *Stevia rebaudiana* Bertoni (Gambar 1) adalah tanaman semak yang berasal dari daerah Amerika Selatan (daerah perbatasan antara Paraguay dan Brazil). Daun stevia mengandung steviosida yang merupakan komponen utama pemberi rasa manis. Kandungannya antara 4 – 20 % dari berat kering daun stevia (tergantung dari kondisi penanaman dan pertumbuhannya). Komponen lain pemberi rasa manis pada daun stevia tetapi dalam kadar yang lebih rendah, yaitu steviolbiosida, rebaudiosida A, B, C, D, E, F dan dulcosida A.

Stevia termasuk tumbuhan semak yang tingginya mencapai 30 cm. Daunnya langsung menempel pada batang dengan panjang sekitar 3 – 4 cm, berbentuk lanset atau bentuk spatula dengan ujung lamina daun yang tumpul. Tepi daun bergerigi mulai dari bagian tengah hingga ujung daun. Permukaan atas daun dan batang muda memiliki rambut-rambut halus (trikoma), sedangkan batang tua menjadi berkayu. Akarnya sedikit bercabang dan bunga berwarna ungu cerah (Madan dkk., 2010).

Stevia rebaudiana Bertoni pertama kali diklasifikasikan tahun 1899 oleh Moises Santiago Bertoni. Awalnya tanaman ini benama *Eupatorium rebaudianum* dan berubah nama menjadi *Stevia rebaudiana* Bertoni pada tahun 1905 (Lemus-mondaca dkk., 2012). Kedudukan taksonomi tanaman stevia menurut Yadav dkk. (2011) sebagai berikut :

Kerajaan : Plantae
Sub-kerajaan : Tracheobionta
Super-divisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Sub-kelas : Asteridae
Grup : Monochlamydae
Bangsa : Asterales
Suku : Asteraceae
Tribe : Eupatorieae
Marga : *Stevia*
Spesies : *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Persebaran stevia kini telah tersebar ke beberapa daerah di dunia, seperti Kanada, beberapa negara Asia dan Eropa. Diantara 230 spesies pada genus *Stevia*, hanya spesies *rebaudiana* dan *phlebophylla* yang menghasikan steviol glikosida. Tanaman ini telah digunakan berabad-abad oleh suku Guarani di Paraguay sebagai pemanis dan untuk pengobatan penyakit ringan (Lemus-Mondaca dkk., 2012).

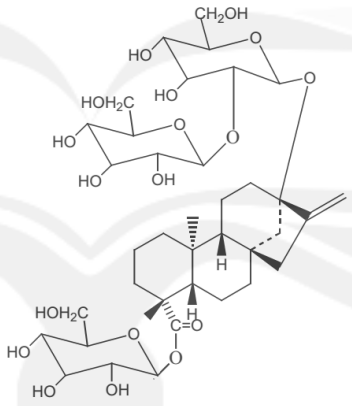
Gambar 1. *Stevia rebaudiana* Bertoni (Lemus-Mondaca dkk., 2012)

B. Steviosida sebagai Metabolit Sekunder

Tumbuhan tidak hanya melakukan metabolisme primer, tetapi juga melakukan metabolisme sekunder menggunakan jalur metabolisme tertentu untuk pembentukan

senyawa kimia khusus yang disebut metabolit sekunder (Herbert, 1995). Karakteristik metabolit sekunder adalah struktur kimianya heterogen dan terbentuk hanya pada kelompok makhluk hidup bahkan jenis tertentu. Metabolit yang diproduksi oleh tumbuhan tersebut memiliki nilai penting dalam berbagai industri khususnya bahan baku industri farmasi, penyedap, makanan dan parfum (Khadi dkk., 1981).

Menurut Gupta dkk. (2010), ada 9 tipe senyawa glikosida steviol yang ditemukan pada tanaman stevia, diantaranya steviosida, rebaudiosida A, rebaudiosida B, rebaudiosida C, rebaudiosida D, rebaudiosida E, rebaudiosida F, steviolbiosida A dan dulcosida A. Bahan pemanis yang paling berlimpah pada daun stevia adalah steviosida (Gambar 2) yang merupakan senyawa yang paling bertanggung jawab terhadap rasa manis pada daun stevia.



Gambar 2. Struktur Steviosida (Geuns, 2008)

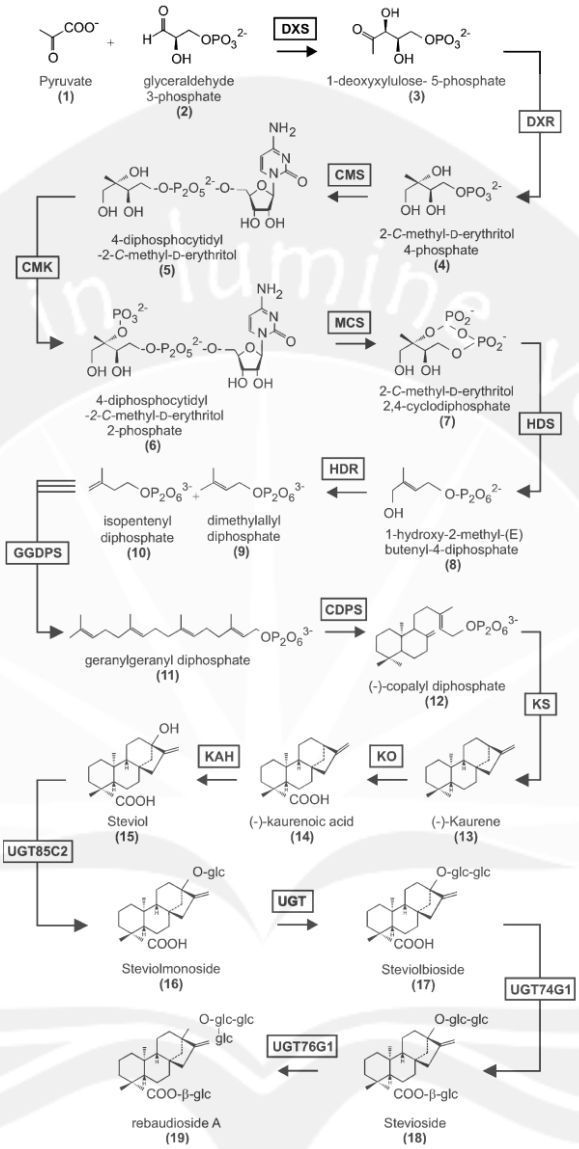
Senyawa ini terbentuk dari tiga molekul glukosa dan satu molekul steviol (Janarthanam dkk., 2010). Steviosida juga merupakan senyawa gula yang stabil pada suhu 100^{o}C (Uddin dkk., 2006). Kandungannya dapat mencapai 13–20% pada daun

stevia kering, sedangkan rebaudiosida hanya sekitar 1–3% pada daun stevia kering (Das dkk., 2006).

C. Biosintesis Steviosida

Kesimpulan bahwa steviol disintesis dari Kaurene melalui jalur mevalonat telah terungkap lebih dari 30 tahun yang lalu (Brandle dan Telmer, 2007). Menurut Kim dkk. (1996) dalam Brahmachari dkk. (2011), ada aktivitas yang tinggi dari *3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A* (HMG-CoA) reduktase di kloroplas *Stevia rebaudiana* yang merupakan enzim pokok dari jalur asam mevalonat (MVA) ke isopentildifosfat (IPP), sehingga disimpulkan bahwa asam mevalonat (MVA) sebagai perantara dari jalur biosintesis steviol. Akan tetapi, kesimpulan tersebut tidak didukung dengan bukti langsung (Geuns, 2003; Brahmachari dkk., 2011).

Menurut Brahmachari dkk. (2011), penelitian Totte dkk. (2000) menunjukkan bahwa adanya keterlibatan jalur *2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate* (MEP) sebagai jalur biosintesis untuk *ent-kaurene* yang merupakan kerangka dari steviosida dan giberelin (GA). Menurut Geuns (2003), kesimpulan tersebut telah dibuktikan dari 5548 sekuens cDNA dari daun *Stevia*. Banyak gen spesifik yang ditemukan dari jalur MEP dan tidak ada yang teridentifikasi dari jalur MVA, sehingga biosintesis steviosida disimpulkan melalui jalur MEP (Gambar 3). Tahap awal proses biosintesis steviosida ini terjadi di plastida (Osbourn dan Lanzotti, 2009).



Gambar 3. Skema Biosintesis Steviosida melalui Jalur MEP
(Brandle dan Telmer, 2007)

Keterangan: DXS = *deoxyxylulose-5-phosphate synthase*; DXR = *deoxyxylulose-5-phosphate reductoisomerase*; CMS = *4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthase*; CMK = *4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase*; MCS = *4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase*; HDS = *1-hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl 4-diphosphate synthase*; HDR = *1-hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl 4-diphosphate reductase*; GGDPS = *geranylgeranyl diphosphate synthase*; CDPS = *copalyl diphosphate synthase*; KS = *kaurene synthase*; KO = *kaurene oxidase*; KAH = *kaurenoic acid 13-hydroxylase*

D. Kultur *in vitro* dan Induksi Kalus

Kultur *in vitro* merupakan ilmu dan teknik untuk menumbuhkan sel, jaringan atau organ tanaman pada medium buatan. Kultur jaringan dapat diinisiasi dari bagian jaringan tanaman yang disebut eksplan (George, 2008). Beberapa syarat yang harus dipenuhi dalam kegiatan kultur *in vitro* seperti pemilihan eksplan sebagai bahan dasar, penggunaan medium yang sesuai, keadaan yang aseptik dan pengaturan udara yang baik terutama untuk kultur cair. Eksplan sebaiknya dipilih bagian tanaman yang masih muda dan mudah tumbuh, yaitu bagian meristem seperti daun muda, ujung batang, keping biji dan sebagainya (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Kultur *in vitro* memiliki keunggulan untuk produksi metabolit sekunder karena kecepatan pertumbuhan sel-selnya dan hanya membutuhkan sedikit material tumbuhan (Babu dkk., 2011). Produksi metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* dipengaruhi berbagai faktor baik secara genetis maupun lingkungan. Adanya perbedaan kondisi lingkungan pertumbuhan antara kultur *in vitro* dan tanaman asalnya memungkinkan untuk adanya perbedaan kandungan metabolit sekundernya baik secara kualitatif maupun kuantitatif (Wardani dkk., 2004).

Kalus akan tumbuh pada permukaan irisan eksplan (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Terbentuknya kalus pada bagian eksplan yang terluka disebabkan oleh otolisis sel dan dari sel yang rusak tersebut akan dihasilkan senyawa-senyawa yang akan merangsang pembelahan sel pada lapisan berikutnya (Gunawan, 1992). Kalus dapat diinisiasi dari hampir semua bagian tanaman, tetapi organ yang berbeda menunjukkan kecepatan pembelahan sel yang berbeda pula (Hartman dkk., 1990).

E. Medium Kultur *in vitro*

Pertumbuhan dan morfogenesis dari jaringan tumbuhan secara *in vitro* diatur oleh komposisi dari medium kultur. Pada dasarnya kebutuhan nutrisi setiap tumbuhan sama, namun untuk memperoleh pertumbuhan yang optimum dari suatu jaringan tumbuhan dalam kondisi laboratorium bisa berbeda untuk beberapa spesies. Komponen utama dalam medium kultur jaringan tumbuhan diantaranya adalah nutrien inorganik (makronutrien dan mikronutrien), sumber karbon, suplemen organik, zat pengatur tumbuh dan agen pemadat (Razdan, 2003).

Makronutrien adalah unsur yang dibutuhkan oleh tumbuhan dalam jumlah banyak dan mengandung enam unsur utama yang dibutuhkan, yaitu nitrogen (N), fosfor (P), kalium (K), kalsium (Ca), magnesium (Mg) dan sulfur (S) (Razdan, 2003). Mikronutrien adalah unsur yang dibutuhkan oleh tumbuhan dalam jumlah sedikit tetapi penting seperti besi (Fe), nikel (Ni), mangan (Mn), klorin (Cl), seng (Zn), boron (B), tembaga (Cu), molibdat (Mo), kobalt (Co), aluminium (Al), iodin (I) dan natrium (Na) (George dan de Klerk, 2008). Menurut Epstein (1971), suatu unsur dikatakan esensial untuk pertumbuhan tanaman jika suatu tanaman tidak bisa menyelesaikan siklus hidupnya tanpa unsur tesebut, pengaruhnya spesifik dan tidak bisa digantikan oleh unsur yang lain, berpengaruh secara langsung pada tanaman dan dikenal sebagai unsur pokok.

Menurut Zulkarnain (2009), sukrosa biasanya diberikan pada konsentrasi 20 – 30 g/l dan hampir semua kultur memperlihatkan respon pertumbuhan yang optimum dengan pemberian disakarida dalam bentuk sukrosa. Sumber karbon yang paling

disarankan dalam kultur jaringan tanaman adalah sukrosa. Penambahan sumber karbon akan mempercepat proliferasi sel dan regenerasi tunas (Razdan, 2003).

Vitamin memiliki fungsi katalitik pada sistem enzim dan dibutuhkan dalam jumlah kecil (Zulkarnain, 2009). Menurut Radzan (2003), vitamin dan asam amino dibutuhkan untuk mendapatkan pertumbuhan yang baik dari suatu jaringan tumbuhan. Macam vitamin yang sering digunakan adalah *thiamine* (B_1), *nicotinic acid* (B_3), *calcium pentothenat* (B_5), *pyridoxine* (B_6) dan *myoinositol*. Vitamin biasanya ditambahkan antara 0,1 – 10 mg/l.

Medium *Murashige and Skoog* (MS) merupakan media yang mengandung komposisi garam yang lengkap (Radzan, 2003) dan dapat digunakan untuk hampir semua jenis kultur (Gunawan, 1992). Keistimewaan medium MS adalah kandungan nitrat, kalium dan amoniumnya yang tinggi (Gamborg, 1991 dalam Purba, 2009). Komposisi dari medium MS dapat dilihat pada Lampiran 1.

Medium *New Phalaenopsis* (NP) merupakan medium untuk pertumbuhan embrio anggrek *Phalaenopsis* yang telah berhasil diformulasikan oleh Islam dkk. (1998). Medium NP dapat menggantikan peran medium MS dalam budidaya jaringan daun stevia (Wiryosoendjoyo dkk., 2011). Komposisi dari medium NP dapat dilihat pada Lampiran 2.

F. Zat Pengatur Tumbuh

Zat pengatur tumbuh (ZPT) biasa ditambahkan dalam medium untuk membantu pertumbuhan kultur (Narayanaswamy, 1994). Ada beberapa kelas dari zat pengatur

tumbuh tanaman, yaitu auksin, sitokinin, gibereilin, etilen dan asam absisat. Auksin dan sitokinin sejauh ini adalah zat pengatur tumbuh yang paling penting untuk regulasi pertumbuhan dan morfogenesis (Machakova dkk., 2008).

Menurut Gupta dkk. (2010), auksin adalah salah satu ZPT yang menyebabkan pemanjangan sel, dominasi apikal dan inisiasi akar. Konsentrasi dan keseimbangan dari kombinasi auksin dan sitokinin akan mempengaruhi regenerasi organ dari sel yang dikulturkan. Kedua ZPT tersebut meregulasi metabolisme sekunder pada sel yang dikulturkan secara *in vitro* dengan mengontrol diferensiasi sel. Pengaruh auksin dan sitokinin akan berbeda untuk tiap spesies dan tiap produk (Saito dan Mizukami, 2002).

Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), 2,4-*Dichlorophenoxyacetic Acid* (2,4-D) dan *Naphtalene-acetic-acid* (NAA) merupakan golongan auksin sintetis yang sifatnya stabil karena tidak mudah terurai oleh enzim-enzim yang dihasilkan sel ataupun oleh pemanasan saat proses sterilisasi medium. Zat pengatur tumbuh 2,4-D sering digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus embriogenik dan merupakan ZPT paling efektif dalam memacu pembentukan kalus. Konsentrasi 2,4-D yang biasa digunakan untuk tanaman dikotil adalah 0,001 – 2 mg/l (George dan Sherrington, 1984). Zat pengatur tumbuh 2,4-D pada konsentrasi rendah akan menginduksi pembentukan kalus, namun pada konsentrasi tinggi akan menyebabkan mutasi karena 2,4-D bersifat herbisida (Goldsworty dan Mina, 1991). *Indole-3-butyric acid* (IBA) bersifat termolabil dan dapat rusak selama pemanasan, meskipun sifatnya lebih stabil dari *Indole-acetic acid* (IAA) (Machakova dkk., 2008).

Sitokinin berfungsi untuk menstimulasi pembelahan sel, proliferasi kalus, pembentukan tunas, memacu proliferasi meristem ujung, menghambat pertumbuhan akar serta mendorong pembentukan klorofil pada kalus (Santoso dan Nursandi, 2002). *Benzyl-amino-purine* (BAP) merupakan salah satu golongan sitokinin yang mempunyai sifat lebih stabil, lebih murah dan lebih tersedia. Hormon ini dapat mendorong pembentukan kalus sekaligus merangsang munculnya tunas dari kalus yang terbentuk (Herawan dan Ismail, 2009). Kinetin (*N6-furfuryladenine*) adalah zat pengatur tumbuh sitokinin yang memiliki kemampuan untuk menginduksi pembelahan sel. Kinetin sering digunakan pada kultur sel dan jaringan tanaman untuk menginduksi pembentukan kalus (jika dikombinasikan bersama auksin) dan untuk menumbuhkan tunas dari kalus (dengan konsentrasi auksin yang lebih rendah) (Duszka dkk., 2009).

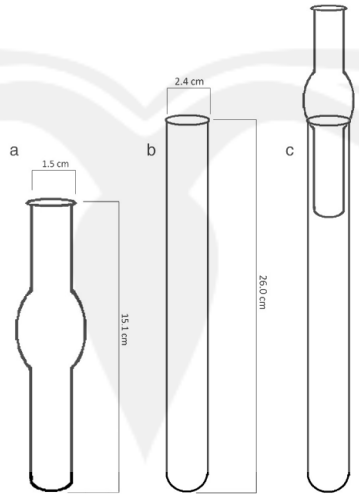
G. Ekstraksi dengan Prinsip Refluks dan Cold Finger

Menurut Handa (2008), ekstraksi merupakan istilah yang umum digunakan dalam bidang farmasetikal yang melibatkan pemisahan senyawa aktif (komponen potensi obat) dari suatu jaringan tumbuhan atau hewan. Senyawa aktif tersebut dipisahkan dari komponen lain dengan menggunakan pelarut tertentu dan prosedur ekstraksi tertentu. Ekstraksi diawali dengan tahap pengeringan yang bertujuan untuk menurunkan kadar air dalam bahan (Ma'mun dkk., 2006). Hal ini dikarenakan jika kadar air dalam bahan masih tinggi dapat mendorong aktivitas enzim seperti hidrolase, oksidase dan polimerase untuk mengubah kandungan kimia yang ada dalam bahan menjadi produk lain (Pramono, 2005 dalam Ma'Mun dkk., 2006). Ekstraksi bahan obat

dari materi tumbuhan akan melibatkan beberapa tahapan seperti pengecilan ukuran, penyarian, penyaringan, pemekatan dan pengeringan (Handa, 2008).

Ekstraksi dengan refluks termasuk metode ekstraksi konvensional yang telah umum digunakan. Menurut Seidel (2006), ekstraksi ini dapat dilakukan dengan merendam materi tumbuhan dengan pelarut tertentu dalam labu bulat yang dihubungkan dengan kondensor. Pelarut kemudian dipanaskan hingga mencapai titik didihnya dan uap akan terkondensasi sehingga pelarut akan kembali ke labu ekstraksi. Kelemahan metode ini adalah senyawa termolabil sangat rentan terdegradasi.

Cold finger adalah sebuah tabung gelas yang berbentuk seperti jari yang diletakkan di atas tabung penyari selama proses penyarian dengan pemanasan (Gambar 4). Tabung *cold finger* diisi dengan air dengan tujuan untuk mendinginkan bagian atas dari tabung penyari, sehingga terjadi refluks dan kondensasi senyawa volatil supaya tidak hilang akibat penguapan (Ferreira dkk., 2013).



Gambar 4. Diagram Skematik Tabung *Cold Finger* (Ferreira dkk., 2013)
Keterangan : a = tabung *cold finger*; b = tabung penyari; c = tabung *cold finger* dengan tabung penyari

Menurut Tandon dan Rane (2008), pemilihan jenis pelarut yang digunakan bergantung dari beberapa faktor seperti selektifitas, polaritas, titik didih, stabilitas kimia dan suhu, keamanan, kemudahan terbakar dan biaya. Metanol memiliki titik didih yang lebih rendah dari etanol, yaitu 64,7^{o}C untuk metanol dan 78^{o}C untuk etanol. Metanol juga telah banyak digunakan sebagai pelarut untuk proses ekstraksi karena dapat meningkatkan efisiensi ekstraksi (Rajab dkk., 2009). Menurut Pol dkk. (2007), metanol menunjukkan kemampuan yang lebih baik untuk mengisolasi steviosida dari daun stevia daripada air dalam suhu 110 – 160^{o}C.

H. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis merupakan teknik separasi yang cepat dimana sampel dianalisis dengan menggunakan plat yang terbuat dari kaca, aluminium atau plastik, yang dilapisi dengan silika gel atau materi lain. Plat ditempatkan pada *chamber* kromatografi yang mengandung pelarut. Substansi yang diuji akan ikut bergerak bersama pelarut dan kecepatan geraknya ditentukan berdasarkan fase diam dan fase geraknya. Substansi yang terpisah tersebut dapat diproses perwarnaan ataupun dengan proses fisik seperti penyinaran UV. Pergerakan substansi dapat memberikan nilai Rf yang dapat digunakan untuk dibandingkan dengan substansi referensi. Proses ini berdasarkan tingkat polaritas senyawa (Koolman and Roehm, 2005).

Menurut Holme and Peck (1998), sampel ditotolkan dengan menggunakan pipa kapiler atau mikropipet dengan volume antara 1 – 20 µl. Kerusakan permukaan harus dihindari dan larutan referensi / standar harus ditotolkan juga pada plat yang sama.

Setelah ditotolkan, plat dikeringkan dan ditempatkan pada wadah yang berisi pelarut dengan kedalaman 0,5 – 1 cm. Jika pelarut yang digunakan adalah pelarut volatil, maka atmosfer dari wadah tersebut harus dibuat jenuh. Ketika pelarut telah bergerak hingga ke bagian atas plat (10 – 20 cm) atau telah mencapai batas yang dibuat (misalnya 1 cm dari tepi atas), plat harus diangkat dan dikeringkan secepatnya.

Menurut Pramesthi (2008), untuk identifikasi senyawa yang dipisahkan menggunakan perbandingan rambatan senyawa dibandingkan dengan rambatan zat pelarutnya dikenal dengan harga Rf (*Retention factor*).

$$\text{Rf} = \frac{\text{Jarak titik pusat bercak dari penotolan}}{\text{Jarak rambat fase gerak}}$$

Angka Rf berjarak antara 0,00 – 1,00, sedangkan hRf ialah angka Rf dikalikan faktor 100 menghasilkan nilai berjarak antara 0 – 100 (Stahl, 1985 dalam Pramesthi, 2008).

Menurut Heinrich dkk., (2004) dalam Hartono (2008), lempeng biasanya dilapisi *adsorbent* dengan indikator *fluorescens* (F_{254}) sehingga senyawa alam yang mengabsorbsi sinar UV dekat (254 nm) akan menampakkan spot hitam dengan *background* lempeng hijau. Untuk senyawa alam yang tidak nampak dengan deteksi UV membutuhkan reagent semprot seperti vanilin-asam sulfat, reagen Dragendorff, asam fosfomolibdat, antimoni triklorida dan anisaldehid-asam sulfat.

I. Spektrodensitometri *in situ*

Menurut Sastrohamidjojo, (1985) dalam Pramesthi (2008), KLT densitometri merupakan salah satu metode dari analisis KLT kuantitatif. Penetapan kadar suatu

senyawa dengan metode ini dilakukan dengan mengukur kerapatan bercak senyawa yang dipisahkan dengan cara KLT. Pengukuran kerapatan bercak yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan kerapatan bercak standar yang dielusi bersama-sama.

Penentuan kadar menggunakan alat densitometer dan dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu senyawa standar dielusi bersama dalam satu plat, kemudian *Area Under the Curve* (AUC) sampel dibandingkan dengan harga AUC senyawa standar. Cara lainnya dapat dilakukan dengan membuat kurva standar hubungan antara konsentrasi standar dengan AUC. Kurva standar diperoleh dengan membuat totolan larutan standar pada plat KLT dengan bermacam-macam konsentrasi. Bercak yang diperoleh dicari nilai AUC-nya dan dari kurva standar akan diperoleh persamaan garis lurus Y = bx + a di mana x adalah kadar zat yang ditotolkan dan Y adalah AUC (Supardjan, 1987 dalam Pramesthi, 2008).

J. Hipotesis

1. Ada perbedaan kecepatan waktu induksi kalus dari eksplan daun stevia pada jenis medium yang berbeda.
2. Kalus yang tumbuh pada medium NP dengan kombinasi hormon 2,4-D 0,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l + Kin 1 mg/l mampu menghasilkan indeks pertumbuhan kalus terbesar.
3. Kalus yang tumbuh pada medium NP dengan kombinasi hormon IBA 2 mg/l + BAP 2 mg/l mampu menghasilkan kadar steviosida tebesar.