

**MULTIPLIKASI TUNAS *Stevia rebaudiana* (Bertoni)
DENGAN MENGGUNAKAN MEDIA MS, WV5, DKW DAN
KONSENTRASI 6-BENZYL AMINO PURINE (BAP)
SECARA IN VITRO**

ASTRI FEBRIANA IFFAF

H052201002



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2022

**MULTIPLIKASI TUNAS *Stevia rebaudiana* (Bertoni)
DENGAN MENGGUNAKAN MEDIA MS, WV5, DKW Dan
KONSENTRASI 6-BENZYL AMINO PURINE (BAP)
SECARA IN VITRO**

**Tesis Ini Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
Magister Program Studi Biologi Departemen Biologi
Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin**

ASTRI FEBRIANA IFFAF

H052201002

**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN MAKASSAR**

2022

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini :

NAMA : **ASTRI FEBRIANA IFFAF**

NIM : **H052201002**

PROGRAM STUDI : **BIOLOGI**

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri. Bukan merupakan pengambilan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atas keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain. Saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 27 Desember 2021



ASTRI FEBRIANA IFFAF

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

Multiplikasi Tunas *Stevia rebaudiana* (Bertoni) dengan Menggunakan Media MS, WV5, DKW dan Konsetrasi 6 – Benzyl Amino Purine (BAP) Secara In Vitro

Disusun dan diajukan oleh

ASTRI FEBRIANA IFFAF

Nomor Pokok : H052201002

Telah dipertahankan dihadapan panitia ujian yang dibentuk dalam rangka penyelesaian studi program magister Departemen Biologi Universitas Hasanuddin pada Tanggal 07 Januari 2022 dinyatakan memenuhi syarat kelulusan.

Disetujui Oleh :

Pembimbing Pertama



Dr. Andi Ilham Latunra M.Si

NIP.196702071992031001

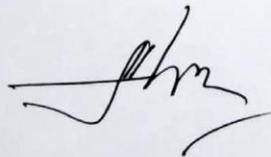
Pembimbing Kedua



Dr. Eva Johannes M.Si

NIP 196102171986012001

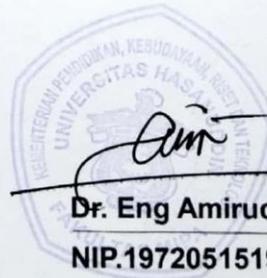
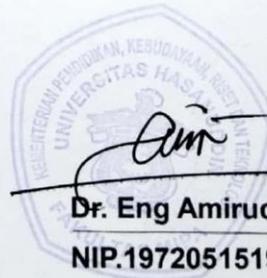
Ketua Program Studi Biologi



Dr. Ir. Slamet Santosa, M.Si

NIP.1962207261987021001

Dekan Fakultas MIPA
Universitas Hasanuddin

Dr. Eng Amiruddin, M.Si

NIP.1972051519970021002

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR ISI	iv
KATA PENGANTAR	vii
ABSTRAK.....	x
ABSTRACT.....	xi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah.....	8
I.3 Tujuan Penelitian.....	8
I.4 Manfaat Penelitian.....	9
I.5 Ruang Lingkup Penelitian.....	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	10
II.1 Tinjauan Umum tentang Kultur Jaringan	10
II.2 Tinjauan Umum Tentang <i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni).....	16
II.3 Kandungan <i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni).....	18
II.4 Morfologi <i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni)	20
II.5 Tinjauan Umum Media Kultur	24
II.6 Tinjauan Umum Zat pengatur Tumbuh	28
II.7 Kerangka Konseptual	32
II.8 Definisi Operasional	34
BAB III METODE PENELITIAN.....	36
III.1 Rancangan penelitian.....	36
III.2 Variabel Penelitian.....	36
III.3 Waktu Dan Tempat Penelitian.....	37
III.4 ALAT DAN BAHAN.....	37
III.5 Objek Penelitian	38

III.6 Teknik Pengumpulan Data	39
III.6.1 Sterilisasi Alat	39
III.6.2 Sterilisasi bahan.....	39
III.6.3 Sterilisasi lingkungan kerja	39
III.6.4 Pembuatan Larutan Stok	40
III.6.5 Pembuatan Media.....	41
III.6.6 Persiapan Ruang Tanam	42
III.6.7 Penanaman	42
III.6.8 Pemeliharaan.....	42
III.6.9 Pengamatan.....	42
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	45
IV.1 Pengaruh Jenis Media terhadap Multiplikasi Tunas <i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni) Secara In Vitro	45
IV.2 Pengaruh Konsentrasi BAP terhadap Multiplikasi Tunas <i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni) secara In Vitro.....	53
IV.3 Pengaruh Interaksi Jenis Media dan Konsentrasi BAP terhadap Multiplikasi Tunas <i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni) secara In Vitro...	59
BAB V PENUTUP	73
V.1 Kesimpulan	73
V.2 Saran	73
DAFTAR PUSTAKA.....	74
LAMPIRAN.....	86

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah swt atas berkat dan limpahan Rahmat, Hidayah dan Karunia-Nyalah sehingga penulis diberikan kesabaran, kesempatan dan kemudahan untuk menyelesaikan tugas akhir penulis yang berjudul “Multiplikasi Tunas *Stevia rebaudiana* (Bertoni) dengan Menggunakan Media MS, WV5, DKW dan Konsentrasi 6 - *Benzyl Amino Purine* (BAP) Secara In-Vitro” sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan tugas akhir (Thesis) di Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.

Penulis juga tidak lupa mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada kedua orang tua penulis, Ayahanda Sampara dan Ibunda St.Aisyah dan Marlina, saudaraku tercinta Ari Triadi Nugraha beserta keluarga besar yang tiada henti-hentinya memberikan do'a, semangat, motivasi, dan nasehat-nasehat dengan penuh keikhlasan, kesabaran serta kasih sayang yang tiada tara.

Penulis menyadari sepenuhnya, dalam penyusunan tesis ini tidak terlepas dari hambatan dan tantangan. Namun berkat kerja keras dan motivasi dari pihak-pihak langsung maupun tidak langsung yang memperlancar jalannya penyusunan tesis ini. Olehnya itu, secara mendalam saya menyampaikan ucapan terima kasih sebesar-besarnya kepada Dr. Andi Ilham Latunra, M.Si selaku pembimbing utama sekaligus

pembimbing akademik atas segala bimbingan, arahan dan motivasi yang telah diberikan kepada penulis. Terima kasih juga saya ucapkan kepada Dr. Eva Johanes, M.Si selaku pembimbing kedua, yang telah memberikan arahan dan bimbingan kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis ini.

Penulis juga mengucapkan banyak terimakasih kepada :

1. Dr.Eng Amiruddin. M.Sc. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin beserta seluruh jajarannya.
2. Dr.Slamet Santosa, M.Si. selaku Ketua Prodi Jurusan Biologi Pascasarjana Universitas Hasanuddin, terima kasih atas segala ilmu, arahan serta bimbingan kepada penulis.
3. Bapak Dr. Eddy Soekendarsi . M.Sc, Bapak Dr. Eddyman W, Ferial, S.Si M.Si., dan Ibu Dr. Elis Tambaru, M.Si. selaku penguji.
4. Seluruh dosen Departemen Biologi yang telah membimbing dan memberikan ilmunya kepada penulis selama perkuliahan, serta staf pegawai Departemen Biologi yang telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan urusan administrasi.
5. Kepada teman-teman Laboratorium Kultur Jaringan yang selalu kompak yang telah membantu penulis dan memberi motivasi serta semangat dalam menyelesaikan penelitian.
6. Kepada saudariku yakni Miftahul jannah S.Si, Raodatul Atfal S.Si Sri Alfiah S.Si, Ulfa Anugrah Utami S.Si, Anugrah Awaliah S.T., Sulfita S.E,

Firdah sukrawati S.KM, Adikku tersayang Nur Azizah S.Ak, Adikku tersayang Muharrani DG. Parumpa, A.Md.Kes, Muh Saifullah S.Ikom, serta teman-teman dekatku terima kasih banyak atas arahan, saran, serta motivasi buat si penulis dan juga selalu memberikan semangat yang tak pernah terhenti hingga tahap akhir penyelesaian tesis ini.

7. Terima kasih juga buat teman-teman dari kelas toefl pusat bahasa Universitas Hasanuddin 2021 telah menjadi pendengar yang baik buat astrid, yang selalu memberikan arahan maupun motivasi agar tetap semangat dalam mencapai target bagi si penulis.
8. Terkhusus kepada kakanda Muh.Eko Pratama S.Kom bisa dikatakan sebagai kakak angkat saya selama ini terima kasih atas kehadirannya untuk assit yang sangat banyak memberikan hal yang positif terutama dalam tahap akhir penyusunan tesis. Baik dalam bentuk mengingatkan, membimbing, menyemangati bahkan mensupport walaupun dari kejauhan sehingga si penulis bisa menyelesaikan kuliahnya tepat waktu.
9. Terima kasih juga kepada saudaraku Muhammad Fadil S.Si dan Yoris Rombe S.Si atas peran pentingnya dalam proses penyelesaian studi bagi si penulis.
10. Teman-teman Biologi angkatan 2020 yang tercinta, terima kasih atas kerjasama dan motivasinya selama ini, semoga kita semua senantiasa diberikan kemudahan dalam urusan kita. Akhirnya dengan segala kerendahan hati saya menyadari bahwa hanya kepada Allah SWT

jualah saya menyerahkan segalanya. Semoga kita semua mendapat curahan & rihdo dari-Nya, Aamiin...

Makassar, 27 Desember 2021

Penulis

ABSTRAK

ASTRI FEBRIANA IFFAF. Multiplikasi Tunas *Stevia* merupakan teknik alternatif untuk memperbanyak bibit berkualitas dalam jumlah yang besar dengan waktu yang singkat. Adapun tujuan dari penelitian ini adalah menganalisis pengaruh jenis media terhadap multiplikasi *Stevia rebaudiana* (Bertoni), menganalisis pengaruh konsentrasi BAP terhadap multiplikasi *Stevia rebaudiana* (Bertoni) dan menganalisis interaksi antara jenis media dan konsentrasi BAP terhadap multiplikasi *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Penelitian ini bersifat kuantitatif dengan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 2 faktor. Faktor pertama adalah jenis media yang terdiri dari 3 macam yaitu media MS, WV5, DKW. Faktor kedua adalah konsentrasi BAP yang terdiri dari 0 μM , 2,2 μM , 4,4 μM , 6,6 μM . Penelitian menggunakan metode kultur jaringan dengan bahan tanaman yaitu eksplan tunas *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Media instan MS, WV5 dan DKW, agar-agar, gula, vitamin, myo-Inositol, BAP, aquades, alkohol 70%, alkohol 96% dan spirtus. Penelitian ini terdiri dari 12 kombinasi perlakuan sebanyak 10 ulangan. Analisis data menggunakan *Analysis Of Variance* (ANOVA) pada taraf kepercayaan ($\alpha = 0,05$). Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa Media MS merupakan media yang baik untuk perbanyak tunas secara *In Vitro*. Konsentrasi BAP 2,2 μM dan BAP 4,4 μM merupakan konsentrasi yang paling optimal pada presentase tumbuh tunas, hari muncul tunas, jumlah tunas, hari muncul daun. Interaksi jenis media dan konsentrasi BAP tidak terdapat pengaruh yang nyata terhadap hari daun membuka sempurna dan jumlah daun, namun berpengaruh nyata terhadap variabel presentase tumbuh tunas, hari muncul tunas, jumlah tunas, hari muncul daun dan tinggi plantlet.

Kata Kunci : Multiplikasi, *Stevia rebaudiana* (Bertoni), *Medium Murashige Skoog* (MS), *Media Dasar Westvaco* (WV5), *Media Driver* dan *Kuniyuki* (DKW), *Benzyl Amino Purine* (BAP).

ABSTRACT

ASTRI FEBRIANA IFFAF. *Stevia* shoots multiplication is an alternative technique to multiply quality seeds in large quantities in a short time. This study aimed to analyze the effect of medium type on *Stevia rebaudiana* (Bertoni) multiplication, analyze the effect of BAP concentration on *Stevia rebaudiana* (Bertoni) multiplication, and analyze the interaction between medium type and BAP concentration on *Stevia rebaudiana* (Bertoni) multiplication. This study was a quantitative study with a completely randomized design (CRD) with 2 factors. The first factor was the type of medium which consisted of 3 types, namely MS, WV5, DKW medium. The second factor was the concentration of BAP which consisted of 0 μM , 2.2 μM , 4.4 μM , 6.6 μM . Research using tissue culture propagation method with plant materials used are shoot explants of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) MS, Instant media, WV5, and DKW, agar, sugar, vitamins, myo-Inositol, BAP, aquades, 70% alcohol, 96% alcohol and spirit. This study consisted of 12 treatment combinations. was repeated 10 times. Using Analysis of Variance (ANOVA) at the confidence level ($\alpha = 0.05$) The results showed that MS medium was a good medium for in vitro shoot multiplication. Concentrations of BAP 2.2 μM and BAP 4.4 μM were the most optimal concentrations in the percentage of shoot growth, day of shoot emergence, number of shoots, and day of leaf emergence. The interaction of medium type and BAP concentration did not significantly affect the day of complete open leaf and number of leaves, but had a significant effect on the percentage of shoot growth, day of shoot emergence, number of shoots, day of leaf emergence and plantlet height.

Keywords: Multiplication, *Stevia rebaudiana* (Bertoni), Murashige Skoog Medium (MS), Westvaco Basal Medium (WV5), Driver and Kuniyuki Medium (DKW), *Benzyl Amino Purine* (BAP)

BAB I PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Tanaman *Stevia rebaudiana* (Bertoni) dikenal dengan pemanis alami non-kalori di dataran tinggi yang berasal dari Paraguay di Amerika Selatan. Tanaman ini termasuk famili Asteraceae dengan jenis tanaman tahunan dan habitus yang berukuran dua meter serta memiliki genus sekitar 200 spesies (Syabana dkk, 2017).

Stevia rebaudiana (Bertoni) merupakan salah satu tanaman pemanis alami yang mempunyai tingkat kemanisan lebih tinggi dibandingkan dengan jenis pemanis alami lainnya. Seiring dengan pertumbuhan penduduk pemanis alami sangat tinggi sehingga perlu dilakukan perbanyakan budidaya tanaman stevia secara modern yakni kultur jaringan dengan bertujuan untuk mendapatkan benih unggul, merata serta jumlah produksi yang lebih banyak.

Teknik *in vitro* atau kultur jaringan yakni suatu metode yang digunakan dengan perbanyakan tanaman, metode ini adalah metode yang efisien dari pengadaan benih unggul secara cepat dan jumlah produksi tanaman yang cukup tanpa harus menggunakan lahan yang sangat luas. Keberhasilan pada suatu teknik *in vitro* ditentukan beberapa faktor yakni kondisi aseptis baik itu dari eksplan, media bahkan dalam proses pengerjaannya. Kondisi tersebut sangat perlu dilakukan untuk mengurangi kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri dan jamur. Terjadinya

kontaminasi pada mikroba sampai saat ini yang masih menjadi masalah terbesar bagi seorang peneliti khususnya dalam teknik kultur jaringan karena media yang digunakan itu sangat menunjang adanya pertumbuhan mikroba yang dapat menghambat terjadinya pertumbuhan eksplan, bahkan bisa menghambat adanya produksi bibit-bibit unggul dalam jumlah yang banyak dengan waktu yang bersamaan.

Menurut (Syabana,2017) Kelebihan dalam menggunakan teknik in vitro yakni dapat menghasilkan bahan tanam unggul secara massal dan cepat. Dengan keuntungan lain pada teknik kultur jaringan yakni adanya metabolit sekunder yang dapat dilakukan sepanjang tahun tanpa dipengaruhi oleh faktor cuaca. Kemudian ditambahkan menurut (Asmono,2017) yang mengatakan bahwa teknik kultur jaringan yakni cara yang sangat efektif dalam pengembangan bibit yang berkualitas serta tingkat keseragaman yang tinggi dengan berbagai jenis tanaman.

Bibit tanaman dalam produksi yang unggul dapat dilakukan dengan cara teknik kultur jaringan. Beberapa perbanyakan yang dilakukan dengan menambahkan media dan zat pengatur tumbuhan untuk meningkatkan adanya pertumbuhan dan perkembangan pada eksplan (Ermayanti dkk,2017).

Pada tingkat keberhasilan dalam proses pelaksanaan kultur jaringan secara in vitro dapat dipengaruhi pada tingkat sterilisasi serta komposisi media. Menurut (Faizah,2019) proses kegiatan kultur jaringan secara in vitro dapat dilakukan dengan lingkungan yang steril dengan menggunakan

bahan yang steril pula. Namun dengan pelaksanaan kultur jaringan secara in vitro itu sendiri sangat umum mengalami kendala ataupun masalah maka harus ditemukan solusi dengan baik dan tepat.

Permasalahan tersebut yakni terjadinya kontaminasi, dengan kontaminasi ini dapat menurunkan tingkat keberhasilan secara drastis. Dari kontaminasi itu bisa berasal dari beberapa faktor, baik faktor internal maupun eksternal. Sedangkan yang paling sulit di atas dalam sumber kontaminasi yakni dari faktor internal karena biasanya dapat ditemukan pada eksplan itu sendiri (Zulkarnain, 2017).

Untuk mencegah dan menghindari adanya kontaminasi usaha yang dapat dilakukan yakni dengan melakukan proses sterilisasi. Dalam proses sterilisasi bahan eksplan yakni salah satu kegiatan penting dalam teknik kultur jaringan dengan tujuan untuk mengeliminasi adanya mikroorganisme yang bisa terbawa pada saat pengembalian eksplan (Faizah,2019) oleh sebab itu perlu menggunakan bahan sterilisasi serta perlakuan secara fisik yang harus dilakukan dengan tepat.

Teknik kultur jaringan membutuhkan lingkungan yang sesuai agar eksplan dapat tumbuh serta berkembang dengan baik. Apabila lingkungan sesuai dengan kebutuhan akan terpenuhi ketika media yang digunakan mempunyai segala sesuatu yang dibutuhkan oleh tanaman. Media alat yang digunakan sebagai pendukung dalam keberhasilan teknik kultur jaringan. Bagi seorang peneliti harus memperhatikan alat yang digunakan sampai benar-benar steril dalam proses pengerjaan kultur jaringan dengan

kondisi yang aseptik serta tetap dengan keadaan yang steril saat melakukan penanaman dalam kultur jaringan.

Dalam proses perbanyakan kultur jaringan secara *in vitro* dapat dilakukan dengan cara multiplikasi pada tunas, prosedur multiplikasi tunas sangat sederhana dan kemungkinan dapat terjadi adanya keragaman somaklonal lebih rendah jika dibandingkan sama organogenesis dan embriogenesis somatik sebab yang digunakan adalah bahan tanaman yang telah terdiferensiasi. Pada umumnya Media Murashige Skoog (MS) dapat digunakan sebagai medium baku dalam proses kultur jaringan secara *in vitro* pada tanaman *Stevia*. Dalam proses multiplikasi tunas yang digunakan pada bahan eksplan yakni tunas pucuk serta tunas samping (Sumaryono dan Sinta, 2012)

Tanaman *Stevia rebaudiana* (Bertoni) bisa dikembangkan dengan cara perbanyakan vegetatif yakni melalui stek batang dengan menghasilkan jumlah yang terbatas mengakibatkan penurunan jumlah secara individu yang dapat diperoleh dari satu tanaman. Sedangkan Perbanyakan generatif pada tanaman *Stevia* dengan melalui benih menghasilkan jumlah yang sangat rendah mengakibatkan pada benih *Stevia* memiliki kemampuan ketika berkecambah itu lebih rendah (Sari,2014) Oleh sebab itu, adanya perbedaan dalam proses perbanyakan kultur jaringan dengan mendapatkan banyaknya individu tanaman yang sangat identik dan lebih cepat (Zulkarnain,2009) Maka kultur jaringan dapat dilakukan dengan perbanyakan pada tanaman *Stevia*.

Dalam proses perbanyakan pada tanaman *Stevia* dengan subkultur tunas sampai munculnya organ tanaman baru adalah multiplikasi, kemudian ditambahkan oleh (Gunawan,1987) yang mengatakan bahwa multiplikasi tunas itu merupakan proses regenerasi organ tanpa adanya pembentukan embrio somatik. Dilakukannya multiplikasi tunas itu sendiri yang bertujuan untuk perbanyakan tunas.

Multiplikasi tunas dalam mencapai tingkat keberhasilan terjadi karena ada berapa faktor antara lain komposisi medium serta zat pengatur tumbuh (Mardiana,2013) pada media terdapat adanya unsur hara makro dan mikro yang dapat menentukan adanya pertumbuhan tunas (planlet) dalam kultur jaringan. Dalam proses penggunaan media sangat mendukung pertumbuhan tunas stevia. Ada beberapa jenis media dasar yang dibutuhkan dalam proses multiplikasi tunas tanaman yakni media MS (Alhady,2012), media DKW (Roostika,2016), serta WV5 (Cezar,2015).

Medium yang paling sering digunakan yakni *Medium Murashige Skoog* (MS) khusus untuk tanaman herba sebab keberhasilan tingkat pertumbuhan pada eksplan tinggi. Media *Westvaco* (WV5) yakni media kultur jaringan yang dikemukakan oleh Coke di tahun 1996 terdapat pada tanaman (*Pinus taeda* L.) (Cezar, 2015). Sedangkan Media *Driver dan Kuniyuki* (DKW) yakni media yang bisa meningkatkan tunas pada tanaman Purwoceng (Roostika, 2016).

Media dasar mempunyai perbedaan adanya kandungan unsur hara makro dan unsur hara mikro yakni media MS yang mempunyai unsur

nitrogen dengan bentuk amonium nitrat dengan jumlah 1650,000 mg/l (20,61 μ M) lebih tinggi. Kemudian menurut (Wiranto,2013) nitrogen adalah komponen sangat penting dalam keberhasilan untuk proses pembentukan dan proses regenerasi eksplan perbanyak vegetatif misalnya pada daun, tangkai daun, batang dan juga akar. Media DKW mempunyai unsur kalsium sangat tinggi dengan bentuk $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dalam jumlah 1664,64 mg/l (8,30 mM) yang tidak dimiliki oleh media MS serta media WV5.

Kalsium nitrat yakni kombinasi unsur kalium dan juga nitrogen (Winarto,2013). Kalsium sangat berperan dalam proses pertumbuhan sel tanaman sedangkan nitrat dapat memberikan efek sangat baik pada tanaman untuk proses penyerapan nutrisi, oleh karena itu sangat mudah larut dalam air (Nursetiadi,2016). Ditambahkan menurut (Purnami,2014) magnesium yakni unsur esensial terdapat penyusun klorofil dan membantu proses sintesis protein. Sedangkan menurut (Gunadi, 2012) Kalium memiliki fungsi dalam hal mengatur proses metabolisme, aktivitas enzim, regulasi osmotik, serapan unsur nitrogen, efisiensi penggunaan air dan proses protein dan dapat meningkatkan ketahanan oleh adanya penyakit.

Menurut (Gridhar, 2012) Penelitian tentang multiplikasi tunas pada proses pertumbuhan dan proses perkembangan tanaman stevia secara in vitro telah dilakukan sebelumnya oleh mencoba untuk menumbuhkan tunas dengan Media MS dan B5 maka ditemukan media terbaik dalam proses pertumbuhan tunas yakni media MS dengan kombinasi BAP 4,4 μ M dan NAA 0,80 μ M, Menurut penelitian (Kumar, 2014) ditemukan media MS yang

diperkaya dengan BAP 13,5 μM dan NAA 8,0 μM dapat menumbuhkan proses regenerasi dan proses pengembangan tunas maksimum. Penelitian lain juga dilakukan oleh menurut (Razak, 2014) adalah multiplikasi tunas tanaman stevia pada media MS, ditemukan bahwa BAP 2,2 μM dan kinetin 0,25 menumbuhkan eksplan dengan tunas yang tinggi penemuan lain menurut (Roostika, 2016) inisiasi tunas terbaik pada bunga sedap malam yakni dengan kombinasi media DKW dengan adanya penambahan BAP 4 mg/l (13,3 μM), dan menurut penelitian (Cezar, 2015) mampu menumbuhkan jumlah tunas pinus (*Pinus taeda* L.) yang tertinggi dengan hormon BAP 2,4 μM pada media WV5.

Media zat pengatur tumbuh (ZPT) juga digunakan dalam proses multiplikasi tunas yakni hormon *6-Benzyl amino purine* (BAP) dan golongan sitokinin (Zulkarnain, 2009). Ditambahkan Menurut (Yusnita, 2003) BAP adalah hormon yang sangat efektif dalam merangsang proses pembentukan tunas sebab mempunyai efektifitas yang tinggi, lebih stabil bahkan tahan terhadap oksidasi dan paling murah diantara sitokinin lainnya (Karjadi, 2008). Kemudian menambahkan bahwa BAP sangat berpengaruh dalam merangsang sel dorman, proses metabolisme sel bahkan mendorong pembelahan sel.

Penggunaan hormon BAP pada tanaman stevia sebelumnya oleh (Alhady, 2012) multiplikasi tunas terbaik pada hormon BAP 2 mg/l (8,9 μM) dengan jumlah tunas 4 per eksplan, penelitian selanjutnya oleh (Guruchandran, 2013) multiplikasi terbaik pada tunas tanaman *Stevia*

terbaik pada hormon BAP 1,5 mg/l (6,6 μ M). Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa kemampuan proses menginisiasi tunas masih rendah serta belum didapatkannya komposisi media yang terbaik untuk multiplikasi tunas tanaman *Stevia* secara *in vitro*.

Oleh karena itu, berdasarkan uraian diatas, penelitian ini diharapkan dapat diperoleh informasi mengenai media dan konsentrasi BAP yang tepat dalam pertumbuhan Multiplikasi Tunas *Stevia rebaudiana* (Bertoni) untuk memperbanyak jumlah tunas.

I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang di atas, maka rumusan masalah pada penelitian ini, yaitu :

1. Bagaimana pengaruh jenis media terhadap multiplikasi *Stevia rebaudiana* (Bertoni)?
2. Bagaimana pengaruh konsentrasi BAP terhadap multiplikasi *Stevia rebaudiana* (Bertoni)?
3. Bagaimana interaksi antara jenis media dan konsentrasi BAP terhadap multiplikasi *Stevia rebaudiana* (Bertoni)?

I.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Menganalisis pengaruh jenis media terhadap multiplikasi *Stevia rebaudiana* (Bertoni)
2. Menganalisis pengaruh konsentrasi BAP terhadap multiplikasi

Stevia rebaudiana (Bertoni)

3. Menganalisis interaksi antara jenis media dan konsentrasi BAP terhadap multiplikasi *Stevia rebaudiana* (Bertoni)

I.4 Manfaat Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Dapat memberikan tambahan ilmu pengetahuan tentang interaksi konsentrasi BAP dan media MS, WV5, DKW terhadap tanaman *Stevia rebaudiana* (Bertoni) secara in vitro
2. Dapat menghasilkan bibit *Stevia rebaudiana* (Bertoni) yang unggul sesuai indukan.
3. Dapat menjadi salah satu cara untuk tetap melestarikan *Stevia rebaudiana* (Bertoni) dari kepunahan dengan memanfaatkan teknologi kultur jaringan untuk mendapatkan bibit dalam jumlah yang banyak dengan waktu yang singkat.

I.5 Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini menggunakan tunas *Stevia rebaudiana* (Bertoni) dengan menggunakan metode teknik kultur jaringan. Kemudian penelitian ini dilakukan selama 5 bulan yakni pada bulan Juni - Oktober 2021 bertempat di Laboratorium Kultur Jaringan Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Tinjauan Umum tentang Kultur Jaringan

Teknik dalam kultur jaringan dapat menekankan lingkungan yang sesuai supaya eksplan dapat tumbuh dan berkembang. Apabila lingkungan sesuai maka media dapat untuk dipilih mempertimbangkan sesuatu kebutuhan pada tanaman. Keberhasilan dalam teknik kultur jaringan yaitu sebagai pemberi nutrisi dengan jumlah banyak dan perbandingan yang benar pada media kultur (Nofrianinda, 2017).

Dalam teknik budidaya tanaman dapat menggunakan teknik konvensional terhadap medium tanah atau medium pasir yang selalu terjadi dalam kendala teknis, lingkungan maupun waktu. Misalnya dalam perbanyakan tanaman dapat menggunakan biji yang memerlukan waktu relatif lama dan hasilnya pun tidak seperti tanaman induknya sendiri. Hal ini sering muncul yaitu adanya gangguan dari alam itu sendiri, baik yang disebabkan oleh jasad hidup misalnya hama dan penyakit, maupun cekaman lingkungan yang dapat mengganggu keberhasilan perbanyakan tanaman di lapangan. Bibit dengan jumlah kebutuhan yang besar, berkualitas, bebas hama dan penyakit, maupun harus tersedia dengan waktu yang singkat tidak dapat terpenuhi dengan teknik konvensional baik secara vegetatif maupun secara generatif (Yuwono, 2012).

Tanaman pada kultur jaringan yaitu suatu upaya untuk mengisolasi bagian-bagian tanaman seperti (protoplas, sel, jaringan dan organ), lalu

mengkulturkan nutrisi buatan dengan kondisi yang steril di bawah kondisi lingkungan yang terkendali supaya bagian-bagian tanaman tersebut dapat beregenerasi menjadi tanaman lengkap kembali. Pada abad ke-20 dalam teknologi berawal dari spekulasi Gottlieb Haberlandt. Yang menyatakan bahwa apabila kondisi lingkungan dan nutrisi sel-sel yang dikulturkan terjadi manipulasi maka sel-sel tersebut akan melangsungkan sekuen-sekuen perkembangan misalnya pertumbuhan tanaman normal. Teknik kultur jaringan saat ini pada tanaman sangat berkembang yang menjadi alat ampuh tidak hanya dalam memperbanyak klonal, akan tetapi juga dalam pemuliaan terhadap berbagai tanaman yang memiliki nilai ekonomi (Zulkarnain, 2009).

Dalam teknik kultur jaringan sebenarnya sangat sederhana yakni suatu sel atau irisan jaringan tanaman yang biasa dinamakan eksplan secara steril disimpan bahkan dipelihara dalam media padat atau media cair sesuai kebutuhan. Hal ini sebagian sel pada permukaan irisan tersebut akan mengalami proses proliferasi kemudian akan membentuk kalus.

Penggunaan dalam teknik kultur jaringan mempunyai tujuan yakni suatu proses untuk memperbanyak suatu tanaman dengan waktu lebih singkat. Kultur jaringan kegunaannya yaitu untuk memproduksi bibit dalam jumlah besar dengan mempunyai sifat unggul, bebas virus, metabolit sekunder, pelestarian plasma nutfah yang hampir punah, percepatan pemuliaan tanaman, termasuk dalam proses rekayasa genetika pada tanaman. Akan tetapi pada prinsipnya semua jenis sel dapat ditumbuhkan,

namun untuk kultur jaringan sebaiknya dipilih bagian tanaman yang masih muda agar lebih cepat tumbuh. Bagian yang mudah tumbuh adalah bagian meristem, organ tanaman yang sifat pertumbuhannya agresif, misalnya pada daun muda, ujung akar, keping biji, dan lain-lain (Yuliarti, 2012).

Kultur jaringan dilakukan dengan mengambil bagian kecil tanaman (eksplan), umumnya potongan organ, disterilkan sehingga bebas mikroba, kemudian ditanam pada medium yang sesuai dengan kebutuhan. Setiap sel memiliki potensi genetik untuk dapat menghasilkan organisme lengkap, atau dikatakan bahwa sel mempunyai sifat yang totipotensi (Zulkarnaen 2009).

Dalam proses kultur jaringan merupakan metode perbanyakan tanaman secara vegetatif. Metode tersebut dengan cara mengisolasi bagian tanaman seperti, mata tunas, daun dan biji dalam media buatan dengan penambahan ZPT sehingga bagian tanaman tersebut dapat memperbanyak diri serta bergenerasi menjadi tanaman yang lengkap. Perbanyakan tanaman secara cepat dan tanaman bebas virus, dapat menciptakan hingga meningkatkan proses keragaman genetik melalui variasi somaklonal (Gunawan, 2013)

Kelebihan dalam teknik kultur jaringan yaitu dapat menghasilkan bibit yang banyak dengan waktu yang singkat, tanaman bebas penyakit, tidak tergantung pada faktor musim buah dan juga adanya pohon induk jika tersedia sumber eksplan, memudahkan proses tukar menukar antara materi tanaman secara nasional dan internasional, dan tanaman yang sulit

dibiakan dalam proses secara generatif itu dapat dibiakan dengan metode kultur jaringan.

Keberhasilan dalam proses pertumbuhan eksplan sangat ditentukan terhadap pemilihan medium pertumbuhan, karena eksplan bersifat heterotrof. Medium pertumbuhan mengandung unsur-unsur makro, unsur - unsur mikro dan unsur-unsur lain yang dibutuhkan dalam pertumbuhan sel tanaman. Penggunaan medium tertentu umumnya berdasarkan jenis eksplan yang ditanam. Eksplan tanaman tertentu membutuhkan medium tertentu. Kemampuan eksplan tumbuh pada medium diketahui dari penelitian yang telah dilakukan (Kartinah, 2013).

Media dalam proses kultur secara *in vitro* yang sering digunakan yakni perbanyakan tanaman adalah media MS. Media ini mempunyai kandungan unsur hara makro dan mikro seperti *myoinositol, niacin, pridoxin hcl, thiamin hcl, glycine* dan juga glukosa (Mandang, 2016).

Perbanyakan secara *in vitro* yaitu metode untuk dapat mengisolasi bagian dari tanaman misalnya protoplas, sel, jaringan, dan juga organ, bahkan menumbuhkannya dalam kondisi yang aseptik. Hal ini dapat memperbanyak diri dan juga dapat beregenerasi menjadi tanaman yang lengkap kembali (Sandra, 2013).

Media kultur yakni salah satu faktor penentu dalam keberhasilan perbanyakan suatu tanaman dengan menggunakan teknik kultur jaringan. Pada saat ini sudah banyak tersedia dalam berbagai bahan yang terdapat

pada media kultur telah diformulasikan untuk mengoptimalkan proses pertumbuhan dan proses perkembangan suatu tanaman yang akan dikulturkan. Seperti media *Murashige dan Skooh* (MS), media gambong (B5), media *Schenk dan Hildebrans* (SH), dan *Woody Plant Medium* (WPM) (Sulistian, 2012).

Keberhasilan teknologi kultur in vitro dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu dalam penggunaan bahan tanam (sumber eksplan), ketepatan penggunaan media kultur serta penambahan zat pengatur tumbuh. Sumber eksplan menjadi syarat utama keberhasilan inisiasi (Kusumawati et al. , 2015)

Pada bagian tanaman yang dapat dijadikan sebagai sumber eksplan yakni pada pucuk muda, batang muda, daun muda, kotiledon, dan juga hipokotil. Media kultur juga dapat menjadi pengaruh tumbuh atau tidaknya suatu tanaman. Untuk mendapatkan proses pertumbuhan tanaman yang optimal dalam tekni kultur jaringan, maka diperlukan media dengan komponen yang tepat (Uzun et al., 2014)

Pada tahapan teknik kultur jaringan dimulai dan pemilihan eksplan yang bagus, yaitu eksplan muda ± 1 mm. Kemudian sterilisasi eksplan menggunakan bahan sterilisasi seperti alkohol, fungisida, bakterisida, dan clorox. Kemudian insiasi yaitu penanaman bahan eksplan ke dalam media kultur dengan penambahan hormon eksogen berupa zat pengatur tumbuh (ZPT) seperti auksin pemacu pertumbuhan akar, sitokinin pemacu pertumbuhan tunas dan kombinasi antara auksin dan sitokinin sebagai

pemacu pertumbuhan kalus. Tahapan selanjutnya adalah menyimpan eksplan ke dalam ruang inkubasi agar eksplan dapat tumbuh akar, tunas, batang dan daun. Kemudian siap dilakukan aklimatisasi yaitu penyesuaian eksplan pada kondisi atau situasi lingkungan dan iklim yang baru sebagai hasil dari suatu proses alamiah (Zulkarnain, 2009).

Eksplan yaitu proses jaringan tanaman yang digunakan sebagai bahan isolasi di dalam cawan maupun botol kultur. Eksplan dapat dipilih dari jaringan meristem karena jaringan tersebut tersusun atas sel meristem (Gunawan, 2013) kondisi fisiologinya eksplan memiliki peranan penting dalam keberhasilan metode kultur jaringan. Eksplan yang digunakan dalam kultur jaringan sangat perlu diperhatikan, yaitu mencari eksplan muda yang memiliki proliferasi lebih tinggi dibanding eksplan yang tua (Zulkarnain, 2009).

Kultur jaringan tanaman *Stevia rebaudiana* (Bertoni) telah banyak dilakukan, antara lain embriogenesis somatik, organogenesis serta kalus. Penelitian embriogenesis dilakukan oleh Naranjo, 2016 yang menyatakan bahwa media MS yang dikombinasikan dengan 2,4-D (18,09 μM) dan 2ip (7,38 μM) menghasilkan jumlah embrio somatik tertinggi per eksplan.

Penelitian organogenesis stevia menggunakan *Thin Cell Layer* (TCL) dilakukan oleh (Mosqueda, 2016) yang menyatakan bahwa media $\frac{1}{2}$ MS tanpa PGR dengan kombinasi TDZ (6,78 μM) mampu menumbuhkan tunas terbaik sehingga mencapai 31,16 per eksplan, sedangkan, penelitian kalus dan metabolit sekunder dilakukan dengan kombinasi BA (8,9013,3

μM) dan NAA ($10,7 \mu\text{M}$) menghasilkan frekuensi pertumbuhan kalus 100%, sedangkan biomassa *Stevia* paling optimal didapatkan pada media MS dengan kombinasi 2,4-d ($0,27 \mu\text{M}$), BAP ($0,27 \mu\text{M}$), ascorbic acid ($0,06 \mu\text{M}$) dan kepadatan inokulum 10 g.l^{-1} .

II.2 Tinjauan Umum Tentang *Stevia rebaudiana* (Bertoni)

Pada tahun 1977 tanaman stevia berasal dari pegunungan Amambay, Paraguay. Di Indonesia pertama kali dalam proses penanaman stevia dilaksanakan di Tawangmangu, Jawa Tengah atas kerja sama dengan Negara Jepang. Sampai saat ini penanaman *Stevia rebaudiana* (Bertoni) banyak dilakukan di daerah dataran tinggi (Azkia dan Tohari, 2019).

Tanaman *Stevia rebaudiana* (Bertoni) termasuk tanaman perdu yang tumbuh pada tempat dengan ketinggian 500-1000 m di atas permukaan laut. Apabila tumbuh di dataran rendah stevia akan cepat berbunga dan mudah mati apabila sering dipanen. Suhu yang cocok untuk pertumbuhannya berkisar antara $14-27 \text{ }^{\circ}\text{C}$ dan cukup mendapat sinar matahari sepanjang hari. Perkembangbiakan stevia dilakukan dengan mengecambahkan biji, stek batang, pemisahan rumpun ataupun dengan kultur jaringan.

Bagian tanaman stevia yang dapat digunakan sebagai pemanis adalah daun. Daun stevia dapat langsung digunakan sebagai pemanis, dengan cara dikeringkan. Proses pengeringan tidak memerlukan suhu yang tinggi.

Tanaman *Stevia rebaudiana* (Bertoni) yaitu salah satu tanaman semak-semak dari keluarga bunga matahari (*Asteraceae*), tanaman stevia mempunyai genus sekitar 240 spesies, dan merupakan tanaman asli dari Amrtika Selatan. Diantara 240 spesies tersebut hanya *Stevia rebaudiana* (Bertoni) yang banyak digunakan sebagai pemanis alami. Suku Indian Guarani tepatnya di Paraguay dan Brasil telah menggunakan daun Stevia sebagai pemanis alami selama berabad-abad (Limanto, 2017).

Stevia rebaudiana (Bertoni) yaitu salah satu tanaman dengan memiliki tingkat kemanisan yakni 200-300 kali dibandingkan dengan kemanisan tebu sehingga dapat dijadikan sebagai sumber bahan pemanis selain tebu (sukrosa). Kandungan senyawa jenis glikosida yang membuat *Stevia* memiliki rasa manis terletak pada daun. Pemanis stevia bersifat non kalori dan tidak bersifat karsinogenik misalnya pada gula sintesis yang dapat menyebabkan penyakit kanker dan karis gigi sehingga sangat cocok dikonsumsi oleh penderita diabetes (Saptaji dkk, 2015).

Stevia rebaudiana (Bertoni) yaitu sumber pemanis rendah kalori. *Stevia* telah menjadi pelengkap apabila memenuhi kebutuhan bahan pemanis yang terus meningkat di Indonesia. Sumber pemanis utama sampai saat ini berasal gula dari tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.).

Menurut Badan Pusat Statistik (2020) mencatat bahwa dalam persentase nilai impor gula Indonesia pada bulan Agustus 2020 terus naik dibandingkan dengan bulan-bulan sebelumnya. Oleh karena itu, pemanis dari tanaman Stevia berperan penting untuk melengkapi kebutuhan

pemanis untuk keperluan sehari-hari maupun industri makanan bahkan minuman.

Dalam varietas unggul merupakan kunci yang sangat penting dalam pengembangan *Stevia rebaudiana* (Bertoni) di Indonesia. Jumlah varietas unggul *Stevia* di Indonesia masih terbatas. Keterbatasan ini perlu diimbangi dengan metode perbanyakan yang cepat, baik melalui biji maupun dalam proses stek. Perbanyakan melalui biji terbatas karena daya kecambah biji *Stevia* yang rendah dan merupakan masalah dalam budidaya *Stevia* (Ucar et al., 2016).

Hasil penelitian Miyazaki and Watanabe (1974), bahkan melaporkan daya berkecambah benih *Stevia* sangat rendah yakni kurang dari 10%, sehingga perbanyakan *Stevia* lebih banyak dilakukan secara vegetatif dengan menggunakan stek batang. Namun, perbanyakan melalui setek terbatas pada tanaman induk yang menjadi sumber perbanyakan.

II.3 Kandungan *Stevia rebaudiana* (Bertoni)

Pada daun tanaman stevia terdapat tiga jenis glikosida yaitu steviosida, rebausida dan dulkosida, yang ketiganya terikat pada karbohidrat, seperti rhamnosa, fruktosa dan glukosa, silosa, arabinosa. Senyawa lain yang terdapat dalam daun *Stevia* adalah sterol, tannin dan karotenoid. Selain itu daun *Stevia* mengandung protein, serat, fosfor, besi, kalsium, kalium, natrium, magnesium, rutin (flavonoid), zat besi, zink, vitamin C dan vitamin A. Tubuh manusia tidak dapat metabolisme

steviosida, oleh karena itu steviosida dibuang dari tubuh tanpa penyerapan kalori. Keuntungan tanaman *Stevia rebaudiana* (Bertoni) sebagai pemanis yaitu tidak berkalori sehingga tidak menaikkan kadar gula darahserta tidak memungkinkan pertumbuhan bakteri dan ragi pada bahan pangan, stabil terhadap panas hingga suhu 200 °C, berfungsi sebagai penguat rasa, memperlambat pembentukan plak dari karies gigi dan tidak toksik, serta merupakan bahan alami dan bukan pemanis buatan.

Pemanenan *Stevia rebaudiana* (Bertoni) harus memperhatikan yakni faktor keamanannya. Jangan menggunakan *Stevia* secara langsung apabila daun terpapar pestisida atau bahan kimia lain yang berbahaya bagi kesehatan.

Dalam *Stevia rebaudiana* (Bertoni) zat pemanisnya yaitu steviosida dan rebaudiosida, senyawa ini tidak dapat difermentasikan oleh bakteri di dalam mulut menjadi asam. Asam ini yang apabila menempel pada email gigi dapat menyebabkan gigi berlubang. Oleh karena itu, *Stevia rebaudiana* (Bertoni) tidak menyebabkan gangguan pada gigi.

Selain itu, penggunaan bahan pemanis alami yang berasal dari *Stevia rebaudiana* (Bertoni) cukup aman untuk di konsumsi. Keunggulan lainnya yaitu tidak toksik, bukan senyawa karsinogenik dan rendah kalori; sehingga aman dikonsumsi. Steviosida aman dikonsumsi oleh penderita diabetes mellitus dan penderita obesitas. *Steviosida* tidak difermentasi oleh bakteri di mulut, sehingga tidak menyebabkan gigi berlubang (Wiryosoendjoyo, 2014). Sehingga hal tersebut dapat membuktikan bahwa

manfaat *Stevia rebaudiana* (Bertoni) sangat banyak dan berguna bagi tubuh sehingga tanaman ini layak untuk dibudidayakan.

Dalam proses perbanyakan tanaman *Stevia rebaudiana* (Bertoni) dapat dilakukan dengan banyak cara yakni salah satunya untuk mengatasi permasalahan perbanyakan tanaman *Stevia* dengan rendahnya persediaan bibit dan perkecambahan benih sangat kecil adalah dengan menggunakan perbanyakan tanaman secara teknik in vitro (Syabana, 2017).

II.4 Morfologi *Stevia rebaudiana* (Bertoni)

Stevia rebaudiana (Bertoni) merupakan tanaman berhabitus terna, semak atau perdu. Memiliki ketinggian sekitar 60-90 cm, dengan bentuk batang bulat lonjong serta memiliki bulu halus. Daun berbentuk elips lonjong, bergerigi dan memiliki posisi duduk berhadapan, jarak tersebar. Bunga berbentuk tabung atau bongkol, berkelamin tunggal atau banci dan memiliki kelopak serta berakar serabut. Tanaman *Stevia* memiliki daya regenerasi yang kuat sehingga dapat tahan terhadap pemangkasan.



Gambar 1 Habitus *Stevia rebaudiana* (Bertoni)
(Edi dan Mardiani, 2015)

Tanaman *Stevia rebaudiana* (Bertoni) dapat tumbuh pada kondisi daerah yang mempunyai ketinggian antara 500 - 1000 m dari permukaan laut, dengan suhu antara 14°C - 27°C dan dengan curah hujan antara 1600-1850 mm/tahun (Tjitsoepomo, 2013).



Gambar 2 Daun *Stevia rebaudiana* (Bertoni) (Istidianti, 2013)

Daun *Stevia rebaudiana* (Bertoni) berbentuk elips lonjong dengan bagian tengah lebar dan bagian ujung daun meruncing tumpul, daun tidak bertangkai dengan panjang antara 3-4 cm, bergerigi dan memiliki posisi duduk berhadapan, jarak tersebar. Senyawa yang terkandung pada daun *Stevia rebaudiana* (Bertoni) antara lain apigenin, austroinulin, avicularin, beta-sitosterol, caffeic acid, kampesterol, kariofilen sentaureidin, asam klorogenik, klorofil, kosmosiin, sinarosid, daukosterol, glikosida diterpene, dulkosid A-B, funikulin formic acid, gibbeellic acid, giberelin, indol-3-asetonitril, isokuersitrin, isoteviol, jihanol, kaempferol, kaurene, lupeol, luteolin, polistakosid, kuersetin, kuersitrin, rebaudiosid A-F, skopoletin,

sterebin, A-H, steviol, steviolbiosid, steviolmonosida, steviosid, steviosid a-3, stigmasterol, umbelliferon, dan santofil.kandungan utama yang terkandung pada stevia adalah derivate steviol terutama steviosid (4-15%), rebausid A (2-4%) dan C (1-2%) serta dulkosida A (0,4-0,7%). (Raini dan Isnawati, 2011).



Gambar 3 Bunga *Stevia rebaudiana* (Bertoni) (Shima et all, 2014).

Bunga berbentuk tabung atau bongkol, berkelamin tunggal atau banci dan memiliki kelopak berjumlah 5 kelopak kecil yang berwarna putih sampai ungu pucat (Djajadi, 2014).



Gambar 4 Batang *Stevia rebaudiana* (Bertoni) (Edi dan Mardiani, 2015).

Bentuk batang bentuk *Stevia rebaudiana* (Bertoni) yaitu memiliki bentuk bulat lonjong yang mudah patah serta memiliki bulu halus. Batang muda berwarna hijau tua sampai coklat muda (Djajadi, 2014).



Gambar 5 Akar *Stevia rebaudiana* (Bertoni)

(Edi dan Mardiani, 2015).

Stevia rebaudiana (Bertoni) dengan jenis akar serabut yang memiliki pangkal akar, cabang akar, rambut akar, serabut akar, ujung akar serta tudung akar (Djajadi, 2014).

Adapun klasifikasi tanaman *Stevia rebaudiana* (Bertoni) adalah sebagai berikut:

Regnum : Plantae

Divisio : Spermatophyta

Classis : Dicotyledonae (biji berkeping dua)

Ordo : Campanulatae

Familia : Compositae (Asteraceae)

Genus : *Stevia*

Spesies : *Stevia rebaudiana* (Bertoni) (Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, 2015).

II.5 Tinjauan Umum Media Kultur

Keberhasilan kultur jaringan ditentukan oleh media kultur jaringan yang merupakan tempat tumbuh bagi eksplan. Media tersebut harus mengandung semua zat yang diperlukan eksplan untuk menjamin pertumbuhan eksplan yang ditanaman. Menurut Inkiriwang (2016) salah satu penentu keberhasilan dalam perbanyakan tanaman melalui kultur in vitro adalah media yang digunakan. Media kultur jaringan tidak hanya menyediakan unsur-unsur hara makro dan mikro tetapi juga gula, vitamin

dan zat pengatur tumbuh. Berbagai komposisi media kultur *in vitro* telah diformulasikan untuk mengoptimalkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman yang dikulturkan.

Pertumbuhan dan morfogenesis dari jaringan tumbuhan secara *in vitro* diatur oleh komposisi 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. Menurut Nugrahaini (2011) media yang digunakan dalam kultur jaringan terdiri dari unsur hara mikro dan makro dalam bentuk vitamin, garam, mineral, ZPT, gula, agar, arang aktif, bahan organik lain (bubur pisang, air kelapa, ekstrak kecambah, ekstrak buah).

Media yang digunakan dalam kultur jaringan terdiri dari dua macam, yaitu media padat dan media cair. Media padat merupakan media yang memiliki komponen kimia yang dibutuhkan dalam pertumbuhan tanaman dan kemudian ditambahkan dengan zat pematat berupa agar-agar (nursandi, 2011).

Terdapat beberapa media dasar yang digunakan sebagai media kultur jaringan diantaranya adalah: media Murashige dan Skoog (MS) yaitu media yang digunakan hampir pada semua jenis tanaman terutama tembakau. Media MS mempunyai kandungan 40 mM N dalam bentuk NO_3^- dan 29 mM N dalam bentuk NH_4^+ . Kandungan N ini, lima kali lebih tinggi dari N total pada Miller, 15 kali lebih tinggi dari media tembakau Hildebrandt dan 19 kali lebih tinggi dari media dasar White. Kalium juga ditingkatkan

sampai 20 mM, sedangkan P, 1.25 mM. Unsur makro lainnya konsentrasinya dinaikkan sedikit. Pertama kali unsur makro dalam media MS digunakan untuk kultur kalus tembakau, tetapi komposisi MS ini biasanya digunakan untuk kultur jenis tanaman lain (Erwin, 2013).

Media Driver dan Kuniyuki (DKW) merupakan media yang memiliki kadar ion P dan ion N lebih tinggi dibandingkan media MS. ion P dan Ion N merupakan makronutrien yang berperan dalam sintesis protein yaitu asam amino sehingga metabolisme dalam sel tetap terjaga, sehingga tanaman berhasil tumbuh dan memanjang membentuk tunas baru, sedangkan media dasar Westvaco (WV5) merupakan media kultur yang memiliki kandungan nutrient makro dan mikro dalam perbandingan dan kadar tertentu, serta sumber tenaga (umumnya digunakan sukrosa). Seringkali juga memiliki kandungan satu atau dua macam vitamin dan zat perangsang pertumbuhan. Berbagai media dasar tersebut memiliki perbedaan kandungan hara makro dan mikro didalamnya.

Tabel 1 Kandungan hara pada berbagai macam media

Komponen	Jenis Media					
	MS		WV5		DKW	
	mg/l	Mm	mg/l	Mm	mg/l	Mm
Unsur Makro						
NH ₄ NO ₃	1650,00	20,61	1416,00	17,70	700,00	8,74
MgSO ₄	180,54	1,50	361,49	3,00	903,79	7,51

KNO ₃	1900,00	18,79	-	-	1084,06	10,72
KH ₂ PO ₄	170,00	1,25	265,00	1,95	270,00	1,98
KCl	-	-	-	-	718,67	9,64
K ₂ SO ₄	-	-	1559,00	18,00	-	-
CaCl ₂	332,02	2,99	112,50	1,01	452,88	4,08
Ca (NO ₃) ₂ .2H ₂ O	-	-	1664,64	8,30	-	-
Unsur Mikro	mg/l	μM	mg/l	μM	mg/l	μM
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	29,91	17,00	72,19	8,60	29,91
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	1,03	0,39	1,61	0,25	1,03
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90	100,00	33,80	200,00	15,16	89,69
KI	0,83	5,00	-	-	0,83	5,00
H ₃ BO ₃	6,20	100,27	4,80	77,63	31,00	501,37
FeNaEDTA	36,70	100,00	44,63	121,61	36,71	100,00
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,10	0,25	1,00	0,25	1,00
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,11	-	-	0,025	0,11
Vitamin	mg/l	μM	mg/l	μM	mg/l	μM
Glycine	2,00	26,64	2,00	26,64	-	-
Myo-Inositol	100	554,94	100	554,94	1000	5549,39
Nicotinic acid	0,50	4,06	1,00	8,12	-	-
Pyridoxine HCL	0,50	2,43	-	-	-	-
Thiamine HCL	0,10	0,30	2,00	5,93	0,40	1,19

Sumber: Murashige dan Skoog (1962); Driver dan Kuniyuki (1984); Coke (1996)

Tingkat kemasaman (pH) media mempunyai pengaruh terhadap pertumbuhan tanaman *in vitro*. Tingkat kemasaman media perlu diatur untuk keseimbangan sitoplasma dan menjaga membran sel (Gunawan, 1992). Menurut Pierik (1987), senyawa yang digunakan dalam pengukuran pH adalah HCL dan NaOH.

Penambahan NaOH atau HCL dilakukan setelah semua larutan stok dan gula tercampur atau sebelum penambahan agar-agar. pH media yang terlalu rendah adalah (<4,5) dan pH terlalu tinggi (lebih dari 7) dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan kultur dan mengakibatkan tanaman *abnormal*.

Berdasarkan penelitian sebelumnya tentang pertumbuhan tunas stevia pada media kultur telah dilakukan oleh Latha dan Usha (2003) yang menyatakan bahwa media MS dengan penambahan 8,87 μM BA dan 5,71 μM IAA mampu menumbuhkan tunas hingga 10-11 per eksplan, sedangkan Gridhar (2012) membandingkan antara media B5 dan Ms dan menyatakan bahwa media MS dengan kombinasi 4,4 μM dan 0,8 μM IAA mampu menumbuhkan tunas *Stevia* sampai 28 eksplan tunas.

Media DKW sebelumnya dilakukan oleh Lizawati (2009) bahwa media tersebut dengan penambahan BAP 2 mg/l (8,9 μM) mampu menginduksi multiplikasi tunas dan menurunkan presentase daun, sedangkan media WV5 sebelumnya dilakukan oleh Oliveira (2012) bahwa media tersebut dengan penambahan BAP mampu menginduksi multiplikasi tunas *Pinus taeda* hingga 4-5 tunas.

II.6 Tinjauan Umum Zat pengatur Tumbuh

Salah satu faktor yang berpengaruh adalah zat pengatur tumbuh (ZPT). ZPT merupakan senyawa organik bukan hara yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat dan dapat mengubah proses

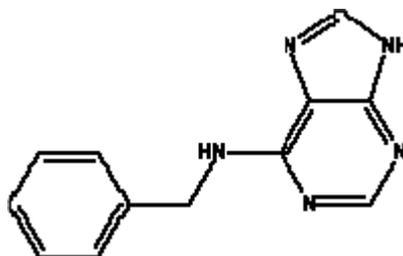
fisiologi tumbuhan. Penggunaan ZPT dapat merangsang cepat pertumbuhan dan perkembangan tanaman pada kondisi normal, sedangkan apabila tidak menggunakan zat pengatur tumbuh pertumbuhan tanaman akan lambat utamanya tanaman yang dikembangbiakkan secara vegetatif (Trisna et al., 2013).

Sitokinin dan auksin merupakan dua kelompok hormon tanaman yang sangat penting dan diperlukan dalam kegiatan kultur jaringan embryogenesis somatik. Hormon auksin di dalam tubuh tanaman dihasilkan oleh pucuk-pucuk batang, pucuk-pucuk cabang dan ranting yang menyebar luas ke dalam seluruh tanaman. Auksin dalam konsentrasi tinggi menghambat pertumbuhan mata tunas samping. Fungsi auksin untuk merangsang pemanjangan sel, pembentukan kalus, dan pertumbuhan akar. Sedangkan sitokinin adalah suatu kelompok hormon tanaman yang menginduksi pembelahan sel dan tunas adventif, serta pembentukan dominasi apikal pada kultur jaringan.

Menurut Santoso dan Nursadi (2012). Bentuk dasar sitokinin adalah adenine(6 - *Benzyl Amino Purine*). Adenine merupakan bentuk dasar yang menentukan aktifitas sitokinin. Panjang rantai dan *double bond* dalam rantai tersebut akan meningkatkan aktifitas ZPT ini. Sitokinin memiliki rantai samping yang kaya akan karbon dan *hydrogen*, menempel pada nitrogen yang menonjol dari puncak cincin purin. Menurut Rochmah (2014), sitokinin yang biasa digunakan adalah BAP (*6-Benzyl Amino Purine*), kinetin, zeatin,

2C 1-4 PU, 2.6- C1-4, 2iP (*N*6 -2- *Isopentanyl Adenin*), PBA, dan TDZ (*thidiazuron*).

Hormon sitokinin yang sering digunakan dalam perbanyakan tunas secara *in vitro* adalah BAP. Menurut Karjadi (2012) BAP adalah senyawa turunan adenin yang berperan dalam merangsang sel dorman, metabolisme sel, serta aktivitas utamanya mendorong pembelahan sel dan morfogenesis. Menurut Yusnita (2012) penggunaan BAP dalam kultur jaringan sering digunakan karena paling efektif untuk merangsang pembentukan tunas karena memiliki efektifitas tinggi, lebih stabil dan tahan terhadap oksidasi serta paling murah diantara sitokinin lainnya. Hormon BAP merupakan sitokinin sintesis yang memiliki berat molekul sebesar 225,26 dengan rumus molekul $C_{12}H_{11}N_3$ (Alitalia, 2008),



Gambar 6 Struktur Molekul BAP

Hasil penelitian Maryani dan Zamroni (2015), penggandaan tunas krisan secara *in vitro* memberikan jumlah akar yang banyak, dan semakin meningkatnya hormon BAP jumlah akar semakin menurun. Hal ini membuktikan bahwa BAP memiliki peran dalam menekan pertumbuhan akar, sehingga sitokinin sangat penting dalam multiplikasi atau

penggandaan tunas. Menurut Nursandi (2012) juga menambahkan bahwa BAP bisa menghambat pembentukan akar nenas secara spontan pada konsentrasi konsentrasi 17.76 μM . Multiplikasi merupakan proses induksi pembentukan jaringan, menjadi tunas dan tanaman sempurna. Proses multiplikasi ini diawali oleh adanya hormon pertumbuhan *Benzyl adenin* dan sitokinin lainnya, baik sendiri maupun dalam kombinasi dengan asam indol asetat atau asam naftalen, sedangkan pembentukan tunas dan diferensiasi disebabkan asam giberelat, sedangkan pembentukan akar dapat terjadi serentak atau dapat diinduksi sesudahnya.

Berdasarkan penelitian sebelumnya pada tanaman *Gladiolus* (*Gladiolus* Sp.) pada penelitian (Pragya, 2012) yang menyatakan bahwa eksplan mata tunas nilam pada kombinasi 8,88 μM BAP + 9,29 μM Kinetin + 1,07 μM NAA menghasilkan rata-rata jumlah tunas mencapai 29,63 tunas per eksplan, dengan panjang rata-rata 3,91 cm per eksplan. Penelitian selanjutnya oleh Baiji (2013), pada tanaman alder hitam (*Alnus glutinosa* L) menyatakan bahwa BAP berpengaruh terhadap jumlah tunas.

Presentase pertumbuhan tunas mencapai 100% diperoleh pada perlakuan 1-3 μM BAP dengan rata-rata 12-14 tunas per eksplan. Penelitian sebelumnya juga dilakukan oleh Lee (1997) pada tanaman krisan yang berkerabat dekat dengan *Stevia*. Kombinasi yang terbaik dalam pertumbuhan tunas krisan adalah 2,5 μM BA dan 2,5 μM NAA yang menghasilkan 4-5 per eksplan. Penelitian selanjutnya oleh Nahid (2007) yang menyatakan bahwa kombinasi yang terbaik adalah 4,7 μM kinetin dan

2,2 μM NAA, sedangkan Zalewska (2010) menyatakan bahwa kombinasi terbaik pada konsentrasi BAP 2,7 μM dengan penambahan 11,4 μM IAA.

Berdasarkan penelitian sebelumnya pada tanaman *Stevia*, yaitu oleh Alhady (2012) memperlihatkan bahwa multiplikasi tunas *Stevia* dengan penambahan konsentrasi BAP 0,5 mg/l (2,2 μM) pada media MS mampu menghasilkan presentase tumbuh sebesar 50-100%, Sedangkan pada penelitian Guruchandran (2013) presentase tumbuh tunas *Stevia* terbaik pada hormon BAP 1,5 mg/l (6,6 μM).

Penelitian selanjutnya Kumar (2014) menumbuhkan tunas dengan media MS yang diperkaya dengan kombinasi 13,5 μM BAP dan 8,0 μM NAA dan melaporkan bahwa media tersebut dapat menumbuhkan regenerasi dan pengembangan tunas maksimum. Sedangkan media WV5 pernah dilakukan oleh (Oleivera, 2012) menumbuhkan tunas *Pinus taeda* L. Terbanyak 4,3 sampai 5,8 per eksplan dengan penambahan 0,44 μM BAP dan 2,69 μM NAA, sedangkan menghasilkan multiplikasi tunas terbaik hingga 16,95.

II.7 Kerangka Konseptual

Stevia rebaudiana (Bertoni) yaitu salah satu tanaman dengan memiliki tingkat kemanisan yakni 200-300 kali dibandingkan dengan kemanisan tebu sehingga dapat dijadikan sebagai sumber bahan pemanis selain tebu (sukrosa).

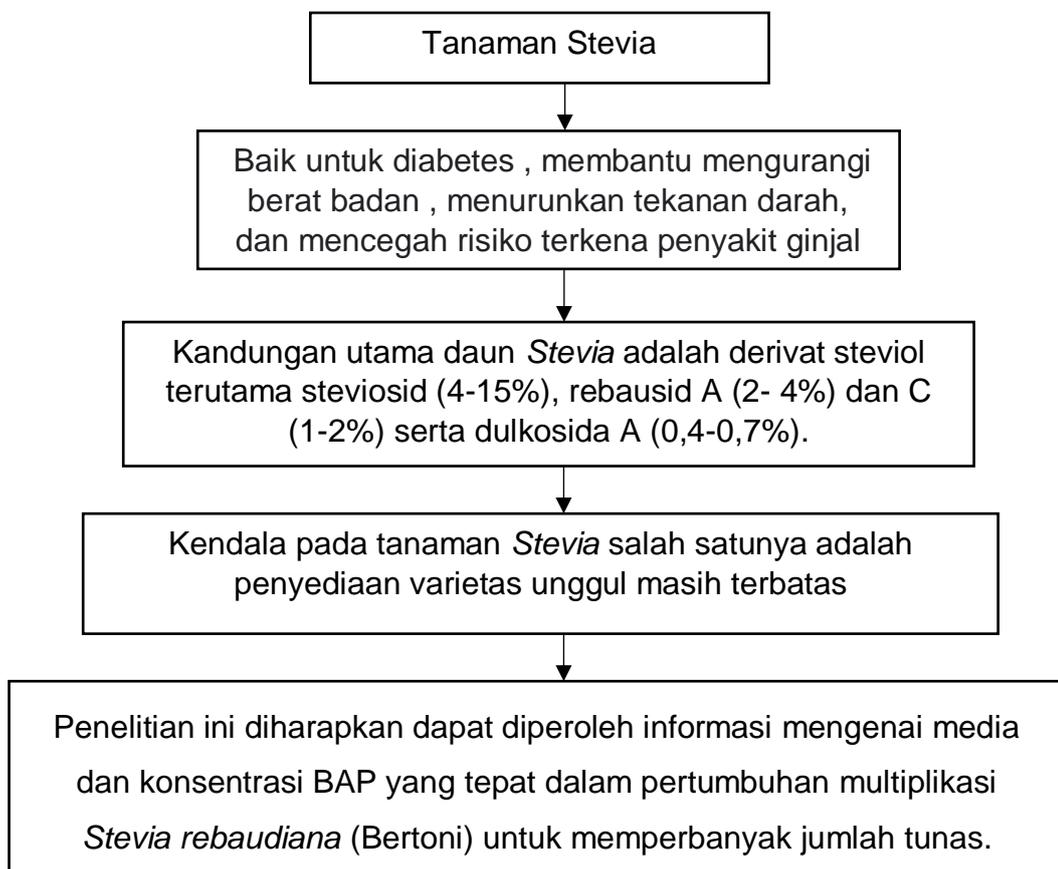
Stevia rebaudiana (Bertoni) menawarkan banyak manfaat bagi kesehatan yang telah dibuktikan oleh para ahli penelitian, diantaranya : Tidak mempengaruhi kadar gula darah, aman bagi penderita diabetes, mencegah kerusakan gigi dengan menghambat pertumbuhan bakteri di mulut, membantu memperbaiki pencernaan dan meredakan sakit perut. Baik untuk mengatur berat badan, untuk membatasi makanan manis berkalori tinggi.

Daun *Stevia rebaudiana* (Bertoni) mengandung: apigenin, austroinulin, avicularin, beta-sitosterol, caffeic acid, kampesterol, kariofilen, sentaureidin, asam klorogenik, klorofil, kosmosiin, sinarosid, daukosterol, glikosida diterpene, dulkosid A-B, funikulin, formic acid, gibberellic acid, gibberelin, indol-3-asetonitril, isokuersitrin, isosteviol, jhanol, kaempferol, kaurene, lupeol, luteolin, polistakosid, kuersetin, kuersitrin, rebaudiosid AF, skopoletin, sterebin A-H, steviol, steviolbiosid, steviolmonosida, steviosid, steviosid a-3, stigmasterol, umbelliferon, dan santofil. Kandungan utama daun stevia adalah derivat steviol terutama steviosid (4-15%) ,rebausid A (2- 4%) dan C (1-2%) serta dulkosida A (0,4-0,7%).

Kendala pada tanaman *Stevia rebaudiana* (Bertoni) salah satunya adalah penyediaan varietas unggul masih terbatas sehingga kedepan perlu didukung oleh teknik perbanyakan bahan tanaman bermutu dan efisien secara massal serta teknologi budidaya.

Dilakukan perbanyakan dengan menggunakan metode kultur jaringan yakni dapat menghasilkan bibit dalam jumlah yang banyak tanpa memerlukan jumlah induk yang banyak dan waktu yang relatif singkat.

Oleh karena itu, berdasarkan uraian diatas, penelitian ini diharapkan dapat diperoleh informasi mengenai media dan konsentrasi BAP yang tepat dalam pertumbuhan multiplikasi *Stevia rebaudiana* (Bertoni) untuk memperbanyak jumlah tunas.



II.8 Definisi Operasional

1. **Eksplan** adalah bagian dari tanaman yang diambil untuk ditumbuhkan pada medium secara aseptik.

2. Zat pengatur tumbuh sintetis yang digunakan adalah BAP (*Benzyl Amino Purine*) sebagai sitokinin

3. Plantlet adalah hasil perkembangan kalus yang telah nampak seperti tanaman aslinya, memiliki daun, batang dan akar yang jelas.

4. Tunas merupakan jenis reproduksi yang sering ditemukan pada organisme dengan pengelompokan kolonial, karena merupakan keuntungan evolusi untuk menetap di habitat baru dan membentuk koloni baru.

5. Inisiasi adalah pengambilan eksplan dari bagian tanaman yang akan dikulturkan. Bagian tanaman yang sering digunakan untuk kegiatan kultur jaringan adalah tunas atau satu buku tunas

6. Multiplikasi merupakan cara meningkatkan perbanyakan pucuk atau **tunas** pada plantlet.