

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 Deskripsi Stevia (*Stevia rebaudiana* B.)

Stevia rebaudiana Bertoni adalah tanaman dari family Compositae yang berasal dari Paraguay. Daunnya telah digunakan selama berabad-abad sebagai pemanis (Talha, 2012). Tanaman stevia merupakan tanaman semak yang tumbuh tegak hingga 65 cm (Brandle, 1998). Daun berbentuk lonjong langsing sampai oval, bergerigi halus, terletak berhadapan, panjang 2-4 cm, lebar 1-5 cm, dan tulang daun menyirip.

Batang tanaman stevia berbentuk bulat lonjong dan berbulu halus, memiliki banyak percabangan. Bunga stevia merupakan bunga sempurna (hermaphrodite), bentuk terompet, dengan mahkota berbentuk tabung, tangkai benang sari dan tangkai putik pendek, kepala sari kuning, putik berbentuk silindris, putih kotak, bentuk jarum. Bunga stevia kecil (7-15 mm), berwarna putih (Talha, 2012). Perakaran tanaman stevia merupakan akar serabut yang terbagi menjadi dua bagian, yaitu perakaran halus dan perakaran tebal. Tanaman ini memiliki daya regenerasi yang kuat sehingga tahan terhadap pemangkasan. Gambar tanaman stevia dapat dilihat pada Gambar 2.1.

Stevia dapat tumbuh dan berproduksi dengan baik di daerah yang mempunyai ketinggian antara 500-1000 meter dari permukaan laut (dpl), suhu udara antara 14⁰C-27⁰C, curah hujan antara 1600-1850 mm/tahun. Tanaman ini menghendaki tempat yang terbuka atau cukup mendapat sinar

matahari, dengan panjang penyinaran lebih dari dua belas jam per hari (Rukmana, 2003).

Menurut Syamsuhidayat (1991), tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) memiliki sistematika sebagai berikut:

Divisi : *Spermatophyta*

Sub divisi : *Angiospermae*

Kelas : *Dicotyledoneae*

Ordo : *Asterales*

Famili : *Compositae*

Genus : *Stevia*

Spesies : *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Tanaman stevia dapat diperbanyak secara generatif dan vegetatif, namun yang paling terbukti efisien ialah perbanyakan secara vegetatif. Perbanyakan stevia secara generatif dengan biji sulit dilakukan karena daya berkecambahnya yang sangat rendah (Goettemoeler dan Ching 1999). Perbanyakan tanaman stevia secara vegetatif dapat dilakukan dengan anakan, stek batang, dan kultur jaringan.



Gambar 2.1: *Stevia rebaudiana* B. (Salas, 2010)

Beberapa kelebihan stevia antara lain (Mishra, 2010): (1) Stevia adalah produk alami dan bukan sintetik: pemanis stevia (steviosida) tidak mengandung kalori, (2) Daun stevia sebagai pemanis dapat digunakan langsung secara alami sehingga dalam jumlah kecil dapat digunakan untuk berbagai kebutuhan, (3) Tidak beracun, (4) Daun serta ekstrak steviosida murni dapat dimasak langsung, (5) Stabil bila dipanaskan hingga 200⁰C, (6) Non-fermentasi, (7) Memiliki nilai rasa tinggi, dan (8) Teruji secara klinis dan sering digunakan oleh manusia tanpa ada pengaruh negatif.

2.2 Habitat dan Penyebaran

Stevia ditemukan oleh seorang ahli kimia Paraguay bernama Dr. Moises Santiago Bertoni pada tahun 1903, sehingga diberi nama *Stevia rebaudiana* Bertoni sebagai penghormatan kepada sang penemu tumbuhan yang berasal dari kawasan tropika dan sub-tropika di Amerika Selatan dan Amerika Tengah tersebut.

Stevia merupakan tanaman asli dari daerah pegunungan Brazil dan Paraguay. Selama berabad-abad, pemanis herbal ini telah digunakan oleh budaya asli untuk menghilangkan rasa pahit dari berbagai obat-obatan nabati dan minuman (Elkins, 1997).

Pemanfaatan tanaman stevia sebagai bahan pemanis telah lama dikenal oleh penduduk asli di Amerika. Pada mulanya, tanaman ini hanya dikembangkan di Brazil dan Praguay. Namun, beberapa tahun kemudian juga dikembangkan di Jepang dan selanjutnya berkembang di Negara-negara Asia, misalnya di Malaysia, Filipina, Papua New Guinea, Korea Selatan, RRC, dan Taiwan.

Tanaman stevia diperkirakan masuk ke Indonesia pada Tahun 1977 atas kerja sama pengusaha Jepang dan Indonesia. Budidaya stevia telah dicoba di beberapa daerah dengan ketinggian sekitar 1000 meter di atas permukaan laut seperti di daerah Tawangmangu, Sukabumi, Garut, Bengkulu Jawa Timur, dan Sulawesi Selatan (Rukmana, 2003).

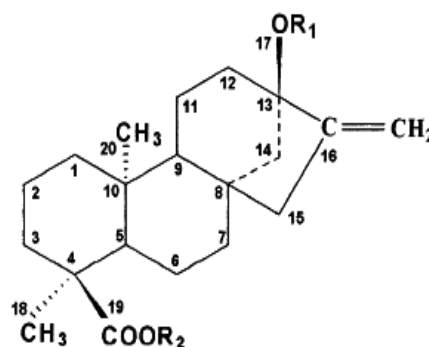
2.3 Kandungan Kimia Stevia (*Stevia rebaudiana* B.)

Daun Stevia mengandung diterpen steviol glikosida, seperti Steviosida, Rebaudiosida A, Rebaudiosida B, Rebaudiosida C, rebaudiosida D, Rebaudiosida E, Rebaudiosida F, Steviolbiosida A, dan Dulkosida A (Gupta, 2010). Jika rebaudiosida A, D, dan E itu digabungkan, maka campurannya akan memiliki tingkat kemanisan yang setara dengan steviosida. Selainitu, diketahui pula bahwa pada struktur kimia dari steviosida

juga terdapat senyawa yang lain meliputi steviol, Rebaudioside A, isosteviol dan dihydroisosteviol.

Menurut Inamake (2010) stevia sebagai pemanis alami mengandung seluruh glikosida dalam daunnya, dan steviosida merupakan komponen yang paling banyak terkandung (5-22% dari berat kering daunnya) sehingga, tanaman stevia sering disebut juga dengan rumput manis, daun manis, herba manis, dan daun madu, dikarenakan stevia memiliki tingkat kemanisan 300 kali lebih manis dibandingkan dengan gula (Ahmed, 2007). Struktur kimia steviosida dan senyawa terkaitnya dapat dilihat pada Gambar 2.2 dan Tabel 2.1

Glikosida bila dikristalkan akan terbentuk serbuk putih yang tidak berbau. Menurut Elkins (1997), glikosida merupakan senyawa organik yang mengandung senyawa gula (*glycone*) dan bukan gula (*aglycone*). *Glycone* terdiri dari unsur pokok yaitu rhamnosa, fruktosa, glukosa, xylosa, arabinosa. Sedangkan yang lainnya terdiri dari senyawa kimia yaitu sterol, tanin, dan karotenoid. Selain itu juga stevia mengandung protein, karbohidrat, fosfor, besi, kalsium, potasium, sodium, flavonoid, zinc, vitamin C dan vitamin A.



Gambar 2.2 : Struktur Kimia dari Steviosida

Tabel 2.1: Struktur kimia dari Steviosida dan senyawa terkait (Geuns, 2003)

No.	Jenis senyawa	R1	R2
1	Steviol	H	H
2	Steviolbioside	H	β -glc- β -gluc (2 \rightarrow 1)
3	Stevioside	β -glc	β -glc- β -gluc (2 \rightarrow 1)
4	Rebaudioside A	β -glc	β -glc- β -gluc (2 \rightarrow 1) β -glc (3 \rightarrow 1)
5	Rebaudioside B	H	β -glc- β -gluc (2 \rightarrow 1) β -glc (3 \rightarrow 1)
6	Rebaudioside C (Dulcoside B)	β -glc	β -glc- β -gluc (2 \rightarrow 1) β -glc (3 \rightarrow 1)
7	Rebaudioside D	β -glc- β -gluc (2 \rightarrow 1)	β -glc- β -gluc (2 \rightarrow 1) β -glc (3 \rightarrow 1)
8	Rebaudioside E	β -glc	β -glc- β -gluc (2 \rightarrow 1)
9	Rebaudioside F	β -glc- β -gluc (2 \rightarrow 1)	β -glc- β -Xyl (2 \rightarrow 1) β -glc (3 \rightarrow 1)
10	Dulcoside A	β -glc	β -glc- α -Rha (2 \rightarrow 1)

Glc: glucose; Rha: rhamnose; Xyl: xylose

Menurut Bawane (2012), dalam daun stevia mengandung steviosida (5-10%) dan rebaudiosida A (2-4%) sebagai sumber pemanis disamping sumber pemanis lain yang jumlahnya sedikit seperti rebaudiosida C– E (1-2%) dan dulkosida A dan C (0,4-0,7%), serta glukosida kecil, termasuk flavonoid glikosida, kumarin, asam sinamat dan beberapa minyak penting. Tingkat kemanisan gula stevia antara 200-300 kali sukrosa. Sumber pemanisnya sekitar 14% dari daun kering dan beberapa senyawa pemanisnya serupa pada struktur aglikon steviol terhubung di C-13 dan C-19 sampai mono, di-atau trisakarida yang terdiri residu glukosa dan atau rhamnosa. Sementara itu, beberapa pemanis sintetis yang telah dikenal dan banyak digunakan adalah sakarin, siklambat dan aspartam (Cahyadi, 2008). Pemanis sintesis seperti Siklambat, kontroversial yang masih digunakan, ternyata hanya

mempunyai tingkat kemanisan antara 30-80 kali dari tingkat kemanisan sukrosa. Aspartam juga termasuk pemanis sintesis kontroversial dan sering digunakan, tingkat kemanisan antara 100-200 kali kemanisan sukrosa. Dengan kata lain, perbandingan tingkat kemanisan gula stevia lebih unggul apabila dibandingkan dengan siklamat atau aspartam yang selama ini banyak dipakai sebagai pemanis berbagai produk makanan dan minuman (Sudarmaji, 1982). Keunggulan stevia dibandingkan salah satu pemanis buatan (Aspartam) dapat dilihat pada Tabel 2.2 dibawah ini.

Tabel 2.2 Keunggulan Stevia dibandingkan pemanis buatan (Arora, 2010)

Stevia	Pemanis Buatan
Mengatur atau membangkitkan selera (bekerja di otak untuk meningkatkan perasaan kepuasan)	Merangsang selera (makanan rendah energi, tubuh mengenali berkurangnya sumber energi dan mengirim sinyal yang merangsang selera)
Membantu pengobatan kekurangan maupun kelebihan berat badan (mengurangi konsumsi makanan manis dan berlemak)	Menaikkan berat badan (meningkatkan konsumsi karbohidrat, merangsang penyimpanan makanan dan kelebihan berat badan)
Belum menjadi perhatian utama dalam studi kesehatan	Penggunaan pemanis buatan dalam skala besar menimbulkan efek samping
Cocok untuk dimasak dan dibakar karena panasnya stabil di atas 200 ⁰ C, bukan untuk fermentasi	Tidak cocok untuk di masak dan dibakar, ketika dipanaskan di atas 300 ⁰ C akan melaksanakan methanol yang terpecah menjadi formaldehid (bahan pemicu kanker), asam cuka, dan DKP (diketopiperazine, penyebab tumor otak)
Nilai kalori 2,7 kcal/g	Nilai kalori Aspartam 4 kcal/g
Mengandung lebih banyak bahan pemanis	Mengandung lebih sedikit bahan pemanis
Lebih murah	Mahal
Aman dan berperan dalam pengobatan diabetes	Tidak aman dalam pengobatan diabetes

Meskipun steviosida yang paling tinggi memiliki tingkat kemanisannya, namun bila dipergunakan secara tersendiri sebagai gula murni untuk bahan pemanis makanan dan minuman dalam dosis banyak, maka akan menyebabkan rasa manisnya kurang mengena pada lidah. Hal ini dikarenakan stevia produk-produknya memiliki rasa yang pahit pada batasan penggunaannya dalam minuman ataupun dalam bentuk lainnya. Sumber rasa pahit pada stevia disebabkan karena adanya tanin, flavonoid, dll (Bawane, 2012). Potensi utama stevia sebagai pemanis dari glikosida dalam daun stevia dapat dilihat pada Tabel 2.3 dibawah ini.

Tabel 2.3 Potensi utama stevia sebagai pemanis dari glikosida dalam daun stevia (Bawane, 2012)

Glikosida	Berat kering (%)	Total glikosida (%)	Potensi pemanis (sukrosa=1)
Steviosida	5-10	60-70	250-300
Rebaudiosida A	2-4	30-40	350-400
Rebaudiosida C	1-2	15-20	50-120
Dulcosida	0,3	----	50-120

2.4 Manfaat dan Kegunaan Stevia (*Stevia rebaudiana* B.)

Stevia rebaudiana, merupakan sumber penting dengan bahan aktif steviosida yang rendah kalori (Babu, 2011). Menurut Bawane (2012), manfaat stevia sebagai obat adalah sebagai berikut:

1) Efek hipoglikemik

Masyarakat Paraguay mengatakan bahwa stevia bermanfaat sebagai obat hipoglikemik dan diabetes karena menjaga pankreas dan mengembalikan fungsi pankreas menjadi normal. Sebagian studi klinis melaporkan bahwa

efek mengonsumsi ekstrak daun stevia dapat menurunkan 35,2% kadar gula darah normal setelah 6-8 jam. Studi serupa juga telah dicoba pada manusia dan hewan coba.

2) Efek dalam Kardiovaskular (Pembuluh Jantung)

Penggunaannya sebagai obat jantung dapat menormalkan tekanan darah, mengatur detak jantung, dan untuk indikasi cardiopulmonary yang telah pertama kali dilaporkan dalam penelitian terhadap tikus pada tahun 1978.

3) Efek sebagai antimikroba

Penelitian menunjukkan bahwa *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* dan mikroba lain tidak dapat hidup pada komposisi stevia yang non kalori, sehingga produk stevia cocok sebagai pencuci mulut dan pasta gigi.

4) Efek dalam Pencernaan

Di Cina, teh stevia dapat dibuat dari air panas atau air dingin digunakan sebagai pemanis teh yang rendah kalori, merangsang nafsu makan, membantu pencernaan dalam mengatur berat badan dan mempertahankan awet muda.

5) Efek pada kulit

Salah satu sifat dari ekstrak cair stevia yang belum diteliti dalam lingkup laboratorium adalah kemampuannya dalam membantu mengatasi masalah kulit. Guarani yang telah lama mengenal stevia, melaporkan bahwa stevia efektif bila digunakan sebagai obat jerawat, seborrhea, dermatitis, eczema, dan lain-lain. Penggunaannya dengan cara dioleskan langsung pada luka, dengan demikian dapat mempercepat proses penyembuhan luka, tanpa

bekas luka. Selain itu, hasil penggunaan olesan maupun ekstrak stevia menjadikan kulit lebih halus dan lebih lembut.

Manfaat lain dari stevia sebagai obat antara lain, sebagai pemanis alami, untuk pencegahan gigi berlubang, sebagai sarana menurunkan berat badan, diabetes, hipertensi, depresi, dan diuretik. Sedangkan penggunaan stevia diantaranya (Bawane, 2012):

1. Sebagai pengganti gula dan pemanis buatan
2. Sebagai penambah rasa
3. Sebagai teh herbal
4. Sebagai tanaman obat
5. Dalam produk farmasi
6. Dalam minuman maupun makanan
7. Dalam produk seperti permen karet, pasta gigi
8. Sebagai perpaduan dengan pemanis lainnya.

2.5 Kultur Jaringan *in vitro*

2.5.1 Pertumbuhan kultur *in vitro*

Pertumbuhan merupakan proses dalam kehidupan tanaman yang mengakibatkan perubahan ukuran tanaman semakin besar dan juga yang menentukan hasil tanaman. Pertambahan ukuran tubuh tanaman secara keseluruhan merupakan hasil dari pertambahan ukuran bagian-bagian (organ-organ) tanaman akibat dari pertambahan jaringan sel yang dihasilkan oleh pertambahan ukuran sel. Jumlah sel yang semakin banyak atau ruang (volume) sel yang semakin besar membutuhkan semakin

banyak bahan-bahan sel yang disintesis menggunakan substrat yang sesuai (Sitompul, 1995).

Kultur jaringan adalah istilah umum yang ditujukan pada budidaya secara *in vitro* terhadap berbagai bagian tanaman yang meliputi batang, daun, akar, bunga, kalus, sel, protoplas, dan embrio. Bagian-bagian tersebut yang diistilahkan dengan eksplan, diisolasi dari kondisi *in vivo* dan dikultur ada medium buatan yang steril sehingga dapat beregenerasi dan berdiferensiasi menjadi tanaman lengkap (Zulkarnain, 2009). Hartman (1990) menggunakan istilah yang lebih spesifik, yaitu *mikropropagasi* terhadap pemanfaatan teknik kultur jaringan dalam upaya perbanyakan tanaman, dimulai dari pengkulturan bagian tanaman yang sangat kecil (eksplan) secara aseptik di dalam tabung kultur atau wadah lain yang serupa.

Kegunaan utama dari kultur jaringan adalah untuk mendapatkan tanaman baru dalam jumlah banyak dalam waktu yang relatif singkat, yang mempunyai sifat fisiologi dan morfologi sama persis dengan tanaman induknya, menghemat waktu dan tenaga (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Menurut Zulkarnain (2009), keuntungan kultur jaringan tanaman diantaranya, *pertama*, jutaan klon dapat dihasilkan dalam waktu setahun hanya dari sejumlah kecil material awal. *Kedua*, sebagai alternatif bagi spesies-spesies yang resisten terhadap sistem perbanyakan vegetatif konvensional dengan melakukan manipulasi terhadap faktor-faktor lingkungan, termasuk penggunaan zat pengatur tumbuh. *Ketiga*, kemungkinan untuk mempercepat pertukaran bahan tanaman di tingkat

internasional. *Keempat*, tidak tergantung pada musim, serta untuk dapat menghasilkan metabolit sekunder yang dihasilkan dari kalus dengan kadar yang lebih tinggi daripada dengan cara biasa (langsung dari tanaman) (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

2.5.2 Teknik Kultur Jaringan

Pelaksanaan teknik kultur jaringan ini berdasarkan teori sel seperti yang dikemukakan oleh Schleiden dan Schwann, yaitu bahwa sel mempunyai kemampuan autonom, bahkan mempunyai kemampuan totipotensi. Totipotensi adalah kemampuan setiap sel, dari mana saja sel tersebut diambil, apabila diletakkan dalam lingkungan yang sesuai akan dapat tumbuh menjadi tanaman yang sempurna (Suryowinoto, 1991 dalam Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Teknik kultur jaringan akan dapat berhasil dengan baik apabila syarat-syarat yang diperlukan terpenuhi. Syarat-syarat tersebut meliputi pemilihan eksplan sebagai bahan dasar untuk pembentukan kalus, penggunaan medium yang cocok, keadaan yang aseptik, dan pengaturan udara yang baik. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), saat ini teknik kultur jaringan telah semakin luas penggunaannya, antara lain:

1. *Meristem culture*

Yaitu budidaya jaringan dengan menggunakan eksplan dari jaringan muda atau meristem

2. *Pollen culture/anther culture*

Yaitu budidaya jaringan dengan menggunakan eksplan dari pollen atau benangsari untuk tujuan mendapatkan tanaman diploid selain persilangan

3. *Protoplast culture*

Yaitu budidaya jaringan dengan menggunakan eksplan dari protoplas. Protoplas adalah sel hidup yang telah dihilangkan dinding selnya.

4. *Chloroplast culture*

Yaitu budidaya jaringan dengan menggunakan kloroplas untuk keperluan fusi protoplas (memperbaiki sifat tanaman dengan membuat varietas baru).

5. *Somatic cross/silangan protoplas/fusi protoplas*

Yaitu menyilangkan dua macam protoplas menjadi satu, kemudian dibudidayakan sampai menjadi tanaman kecil yang mempunyai sifat baru. Persilangan ini dapat dilakukan dengan menggunakan zat kimia atau dengan listrik.

2.6 Faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur *in vitro*

Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi keberhasilan kultur jaringan adalah sebagai berikut (Santoso dan Nursandi, 2003):

1. Genotif

Pada beberapa jenis tumbuhan, embrio mudah tumbuh akan tetapi, pada tumbuhan lain sukar tumbuh, disebabkan perbedaan kultivar dari jaringan.

2. Eksplan

Eksplan berupa sel, jaringan atau organ yang digunakan sebagai bahan inokulum dan ditanam dalam media kultur. Bagian yang digunakan sebagai eksplan adalah sel yang aktif membelah, dari tanaman induk sehat dan berkualitas tinggi. Ukuran eksplan kecil ketahanan eksplan kurang baik dan bila eksplan terlalu besar, akan mudah terkontaminasi.

3. Komposisi Media

Media sebagai sumber makanan harus mengandung senyawa organik dan anorganik, seperti nutrient makro dan mikro dalam kadar dan perbandingan tertentu, gula, air, asam amino, vitamin, dan ZPT. Faktor lain yang tidak boleh diabaikan adalah ion ammonium dan potassium.

4. Oksigen

Suplai oksigen yang cukup sangat menentukan laju multiplikasi tunas dalam usaha perbanyakan in vitro.

5. Cahaya

Intensitas cahaya yang rendah dapat mempertinggi embryogenesis dan organogenesis. Intensitas cahaya optimum pada kultur 0-10000 lux (inisiasi), 1000-10000 (multiplikasi), 10000-30000 (pengakaran) dan <30000 untuk aklimatisasi. Perkembangan embrio membutuhkan tempat gelap 7-14 hari, kemudian dipindah ke tempat terang untuk pembentukan klorofil.

6. Temperatur

Temperatur yang umum digunakan untuk kultur berbagai tanaman adalah $\pm 20^{\circ}\text{C}$. Suhu terlalu rendah dapat menghambat pertumbuhan tanaman dan

suhu terlalu tinggi dapat membuat tanaman merana. Temperatur optimum tergantung jenis tumbuhan, temperatur normal antara 22-28⁰C.

7. pH

pH (keasaman) dimana sel-sel dikembangkan dengan kultur jaringan memiliki toleransi PH yang relatif sempit dan tidak normal antara 5-6. Apabila eksplan sudah tumbuh biasanya PH media umumnya akan naik.

8. Lingkungan yang aseptik

Kondisi lingkungan sangat menentukan terhadap tingkat keberhasilan pembiakan tanaman dengan kultur jaringan.

2.7 Media Kultur Jaringan

Keberhasilan dalam metode kultur jaringan sangat tergantung dari media yang digunakan. Penggunaan media dengan komposisi tepat akan memberikan kondisi yang baik bagi pertumbuhan dan perkembangan eksplan (Gunawan, 1988).

Banyak formulasi media yang ada, masing-masing berbeda dalam hal kuantitas maupun kualitas komponennya. Dari sekian banyak formulasi yang ada, beberapa telah sering dipakai. Antara lain seperti yang telah dikemukakan oleh Toshio Murashige dan dipublikasikan oleh Murashige dan Skoog pada tahun 1962 (Wetherell, 1982). Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) dalam kultur jaringan ada beberapa jenis media yang umum digunakan, antara lain adalah:

1. medium dasar B5 atau Gamborg: digunakan untuk kultur suspense sel kedelai, *alfafa*, dan *legume* lain.

2. medium dasar White: digunakan untuk kultur akar. Medium ini merupakan medium dasar dengan konsentrasi garam-garam mineral yang rendah.
3. medium Vacin dan Went (VW): digunakan khusus untuk medium anggrek.
4. medium dasar Nitsch dan Nitsch: digunakan untuk kultur tepung sari (*pollen*) dan kultur sel.
5. medium dasar Schenk dan Hildebrandt: digunakan untuk kultur jaringan tanaman monokotil.
6. medium dasar Woody Plant Medium (WPM): digunakan untuk tanaman yang berkayu.
7. medium dasar N6: digunakan untuk tanaman serealia terutama padi.
8. medium dasar Murashige dan Skoog (MS): Digunakan untuk hampir semua macam tanaman, terutama tanaman *herbaceous*. Media MS (Murashige dan Skoog) adalah media yang paling sering digunakan dalam kultur jaringan (Hartmann dan Ketser, 1983).

Media kultur yang memenuhi syarat adalah media yang mengandung nutrient makro dan mikro dalam kadar dan perbandingan tertentu, serta sumber tenaga (umumnya digunakan sukrosa). Seringkali juga mengandung satu atau dua macam vitamin dan zat perangsang pertumbuhan (Wetherell, 1982). Hartman (1990) juga menyatakan bahwa, bahan dalam kultur jaringan adalah sebagai berikut:

1. Garam-garam organik: makro dan mikro

Setiap tanaman membutuhkan paling sedikit 16 unsur untuk pertumbuhannya yang normal, yang termasuk unsur makro dan mikro.

jenis-jenis yang termasuk unsur makro adalah nitrogen (N), fosfor (P), kalium (K), sulfur (S), kalsium (Ca), dan magnesium (Mg). Sedangkan unsur-unsur makro biasanya diberikan dalam bentuk NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan KH_2PO_4 .

Unsur-unsur yang termasuk di dalam unsur mikro yang dibutuhkan dalam jumlah yang kecil adalah klor (Cl), mangan (Mn), besi (Fe), tembaga (Cu), seng (Zn), bor (B), dan molybdenum (Mo). Sedangkan unsur-unsur mikro biasa diberikan dalam bentuk $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, dan $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

2. Bahan organik: karbohidrat, vitamin, dan ZPT

Zat-zat organik yang biasanya ditambahkan dalam medium kultur jaringan adalah sukrosa, mio-inositol, vitamin, asam-asam amino dan zat pengatur tumbuh (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Senyawa kimia organik yang biasa dipakai sebagai sumber energi dalam kultur adalah karbohidrat yang tersusun atas unsur C, H, O sebagai elemen penyusun utama. Bahan organik termasuk karbohidrat meliputi gula, sukrosa, dan selulosa. Menurut Katuuk (1989), secara umum konsentrasi optimum sukrosa adalah 2-3%. Kadar sukrosa yang digunakan sebagai sumber energi untuk menginduksi pertumbuhan eksplan adalah 2-7%. Sukrosa bersifat labil terhadap suhu tinggi sehingga bila disterilkan dalam autoklaf dengan zat lain mengakibatkan penguraian sukrosa menjadi kombinasi sukrosa, D-glukosa, dan D-fruktosa yakni terbentuknya aldosa (D-glukosa) dan ketosa (D-fruktosa) yang melimpah.

Vitamin adalah bahan yang perlu ditambahkan dalam medium kultur *in vitro*, sebab sel bagian tanaman yang dikulturkan secara *in vitro* belum mampu membuat vitamin sendiri untuk kehidupannya (Katuuk, 1989). Vitamin-vitamin yang sering digunakan dalam media kultur jaringan antara lain adalah Tiamin (vitamin B₁), Piridoksin (vitamin B₆), dan asam nikotinat (Hendaryono dan Wijayani, 1994)

Zat pengatur tumbuh dibutuhkan untuk menginduksi pembelahan sel. Senyawa yang paling sering digunakan adalah asam 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan asam naftalenasetat (NAA). Sitokinin seperti kinetin atau benziladenin kadang-kadang dibutuhkan bersama 2,4-D atau NAA untuk mendapatkan pembentukan kalus yang baik.

3. Kompleks alami: air kelapa, jus tomat, ekstrak pisang dan kentang
4. Bahan tambahan: bahan pematat (agar, gelrite, hidrogel). Media hara ini dapat berbentuk padat, semi padat dan cair (Wattimena, 1992).

Bentuk fisik media dapat berupa padat atau cair. Media padat menggunakan pematat media seperti agar dan gelrite sedangkan media cair adalah media yang tidak menggunakan pematat (Yusnita, 2003). Menurut (Hendaryono dan Wijayani, 1994), media padat digunakan untuk tujuan mendapatkan kalus (induksi kalus), dan kemudian dengan medium diferensiasi yang berguna untuk menumbuhkan akar serta tunas, sehingga kalus dapat menjadi planlet. Media padat adalah media yang mengandung semua komponen kimia yang dibutuhkan oleh tanaman dan dipadatkan dengan menambahkan zat pematat, yang dapat berupa agar-agar batang, agar-agar bubuk atau agar-agar dalam kemasan kaleng yang memang khusus

digunakan untuk keperluan laboratorium. Beberapa keuntungan dari media padat adalah apabila menggunakan eksplan berukuran kecil akan mudah terlihat, selain itu eksplan berada di atas permukaan media sehingga tidak memerlukan alat bantu lain untuk aerasi. Keuntungan media padat lainnya adalah tunas dan akar tumbuh teratur pada media yang diam (Wattimena, 1992).

Media MS (Murashige dan Skoog) adalah media yang umum dan paling banyak digunakan dalam kultur jaringan terutama untuk jenis tanaman herbaceous. Media MS adalah perbaikan dari media Skoog pada komposisi garam anorganiknya. Media MS memiliki kandungan N lebih tinggi baik bentuk nitrit maupun nitrat dibandingkan media lainnya (Gunawan, 1988). Dari sekian banyak formulasi yang ada, media MS adalah media yang paling sering digunakan dalam kegiatan kultur jaringan, karena Medium MS termasuk media kultur yang komposisi unsur hara mikro dan makronya lebih lengkap dibandingkan media dasar lainnya. Media MS mempunyai konsentrasi garam-garam mineral yang tinggi dan senyawa N dalam bentuk NO_3^- dan NH_4^+ . Selain itu, media MS dapat digunakan untuk tanaman apa saja, selain itu kadar mineral dalam medium MS relatif lebih tinggi dibandingkan medium lain (Hendaryono dan Wijayani, 1994)

2.8 Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)

Di dalam tubuh tanaman terdapat hormon tumbuh yaitu, senyawa organik yang jumlahnya sedikit dan dapat merangsang ataupun menghambat berbagai proses fisiologis tanaman. Di dalam tubuh tanaman senyawa organik

ini jumlahnya hanya sedikit, maka diperlukan penambahan hormon dari luar. Hormon sintesis yang ditambahkan dari luar tubuh tanaman disebut zat pengatur tumbuh (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Abidin (1983) menyatakan bahwa hormon adalah zat pengatur tumbuh yang terkandung dalam tanaman senyawa organik yang bukan hara (*nutrient*), yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung (*promote*), menghambat (*inhibit*) dan dapat merubah proses fisiologi tumbuhan.

Zat pengatur tumbuh dibuat untuk memacu pembentukan fitohormon (hormon tumbuhan) yang sudah ada di dalam tanaman atau menggantikan peran hormon bila tanaman tidak memproduksi hormon dengan baik (Sumisari, 2006). Tanpa penambahan ZPT dalam medium biasanya pertumbuhan tanaman akan lambat.

Zat pengatur tumbuh di dalam tanaman terdiri dari lima kelompok yaitu Auksin, gibberelin, cytokinin, ethylene, dan inhibitor dengan ciri khas dan pengaruh yang berlainan terhadap proses fisiologis (Abidin, 1983). Ada 2 jenis hormon tanaman yang sekarang banyak dipakai dalam propagasi *in vitro* yaitu auksin dan sitokinin (Wetherell, 1982).

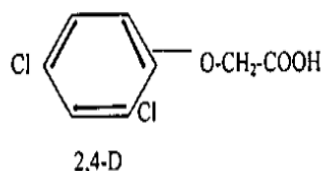
2.8.1 Auksin

Auksin adalah sekelompok senyawa yang berfungsi meningkatkan pemanjangan sel, pembelahan sel, dan pembentukan akar adventif. Auksin yang paling banyak digunakan pada kultur *in vitro* adalah indole-3-acetic acid (IAA), naphthalenacetic acid (NAA), dan 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (Zulkarnain, 2009) serta Indol Buterik Asetat (IBA)

(Hendaryono dan Wijayani, 1994). Konsentrasi auksin yang rendah akan meningkatkan pembentukan akar adventif, sedangkan auksin dengan konsentrasi tinggi akan merangsang pembentukan kalus dan menekan morfogenesis (Smith, 1992).

Zat pengatur tumbuh yang paling sering digunakan dan paling efektif adalah 2,4-D (Santoso dan Nursandi, 2003). 2,4-D merupakan golongan auksin sintesis yang mempunyai sifat lebih stabil daripada IAA, karena tidak mudah terurai oleh enzim-enzim yang dikeluarkan oleh sel atau oleh pemanasan pada saat proses sterilisasi (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Pemberian 2,4-D pada konsentrasi 10^{-7} – 10^{-5} M tanpa sitokinin sangat efektif untuk induksi proferasi kalus pada kebanyakan kultur. Pierik (1997) menganjurkan untuk membatasi penggunaan 2,4-D pada kultur *in vitro* karena 2,4-D dapat meningkatkan peluang terjadinya mutasi genetik dan menghambat fotosintesis pada tanaman yang diregenerasikan.

Penambahan auksin dalam jumlah yang lebih besar, atau penambahan auksin yang lebih stabil, misalnya 2,4-D cenderung menyebabkan terjadinya pertumbuhan kalus dari eksplan dan menghambat regenerasi pucuk tanaman (Wethrell, 1982). Gugus bangun 2,4-D dapat dilihat pada gambar 2.3 dibawah ini.



Gambar 2.3 Gugus bangun 2,4-D (*2,4-Dikhloro fenoksiasetat*)
(Hendaryono dan Wijayani, 1994)

Penelitian Janarthanam (2010) disebutkan bahwa, persentase kalus yang dikembangkan dari eksplan daun lebih baik daripada yang berasal dari eksplan ruas batang. Perkembangan kalus dari eksplan daun yang dikultur pada media MS dengan 1 mg/l 2,4-D menunjukkan induksi kalus dan proliferasi terbaik mencapai 75%. Sedangkan pada penelitian Debnath (2008), menunjukkan bahwa kalus terbaik diperoleh pada media MS dengan penambahan 2,05 mg/l 2,4-D. Ali (2010) juga menggunakan 2,4-D sebagai ZPT untuk perbanyak stevia, dan diantara semua perlakuan, kalus terbaik berasal dari eksplan daun mencapai persentase 96% dalam waktu 11 hari pada media MS dengan penambahan 3,0 mg/l 2,4-D.

2.8.2 Air Kelapa sebagai Media Kombinasi dalam Kultur Jaringan

Air kelapa merupakan salah satu persenyawaan organik kompleks yang biasa ditambahkan kedalam media kultur jaringan. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), di dalam air kelapa terkandung Diphenil urea yang mempunyai aktivitas seperti sitokinin, yaitu mempunyai aktivitas pembelahan sel. Sebab, air kelapa adalah endosperm cair yang sangat kaya akan makanan sehingga, jika air kelapa tersebut ditambahkan dalam medium kultur jaringan, eksplan yang ditanam akan tumbuh baik. Air kelapa yang baik untuk digunakan adalah buah kelapa yang daging buahnya tidak terlalu lunak, tetapi juga belum terlalu keras (umur 210-240 hari).

Tidak semua air kelapa baik digunakan dalam kultur jaringan. Air kelapa muda menghasilkan kualitas produk yang lebih baik, sedangkan air dari kelapa yang tua justru dapat menghambat pertumbuhan jaringan.

Kandungan utama air kelapa adalah air (94%) dan substansi untuk meningkatkan pertumbuhan yang dapat mempengaruhi kultur *in vitro*. Kandungan tersebut antara lain ion-ion anorganik, asam amino, asam organik, vitamin, gula, alkohol, lipid, komponen nitrogen dan fitohormon (Al-Khayri, 2010). Menurut Kristina (2012), kandungan kimia air kelapa menunjukkan komposisi ZPT kinetin (sitokinin) dalam air kelapa muda adalah 273,62 mg/l dan zeatin 290,47 mg/l, sedangkan kandungan IAA (auksin) adalah 198,55 mg/l, seperti yang ada pada Tabel 2.3.

Tingginya kandungan sitokinin maupun auksin terjadi karena ZPT tersebut diproduksi dalam jaringan meristematik yang aktif membelah. Air kelapa merupakan ZPT alami yang banyak digunakan dalam perbanyakan *in vitro* berbagai tanaman hias diantaranya anggrek, karena memiliki sitokinin (Kristina, 2012).

Pada kelapa muda, yang kondisi endospermnya masih seperti susu, kandungan sitokinin maupun auksin alami sangat tinggi. Seiring dengan bertambahnya umur kelapa, kandungan ZPT alaminya juga akan berkurang. Hal ini sejalan dengan penurunan kandungan ZPT alami terjadi karena energi yang ada dibutuhkan untuk pembentukan daging buah.

Tabel 2.4 Komposisi ZPT air kelapa muda pada dua perlakuan pemanasan (Kristina, 2012)

Perlakuan pemanasan air kelapa	Konsentrasi ZPT alami (mg/L)		
	Sitokinin		Auksin
	Kinetin	Zeatin	IAA
Tanpa perlakuan	41,13	34,16	38,57
Pemanasan 5 ⁰ C, 10 menit	273,62	290,47	198,55
Pemanasan 121 ⁰ C, autoklaf	50,09	28,65	20,89

Perlakuan sterilisasi dengan autoklaf menurunkan kandungan ZPT alami dalam air kelapa. ZPT alami memiliki sifat mudah terdegradasi sehingga akan terurai bila melalui proses pemanasan tinggi dengan autoklaf. Selain penurunan kandungan ZPT alami, warna air kelapa pun berubah menjadi kecoklatan. Namun, walaupun terjadi penurunan kandungan sebesar 10 kali lipat, ZPT tersebut masih dapat mendukung pertumbuhan kultur sehingga perlakuan sterilisasi dengan autoklaf tetap dapat digunakan (Kristina, 2012), hal ini dapat dilihat pada Tabel 2.4

Kandungan vitamin dalam air kelapa muda cukup beragam, diantaranya thiamin dan piridoksin. Selain kandungan ZPT, kandungan vitamin dalam air kelapa dapat dijadikan substitusi vitamin sintetik yang terkandung pada media MS. Kandungan hara makro seperti N, P, dan K, serta beberapa jenis unsur mikro dalam air muda juga berpeluang dikembangkan lebih lanjut sebagai upaya substitusi unsur hara makro dan mikro serta sumber karbon, yakni sukrosa. Konsentrasi garam mineral dan sukrosa air kelapa menurun seiring dengan bertambahnya umur dari 6-9 bulan. Di dalam air kelapa ditemukan 3 jenis gula, yakni glukosa dengan komposisi 34-45%, sukrosa dari 53% sampai 18% dan fruktosa dari 12-36%. Sukrosa mengalami penurunan konsentrasi seiring dengan pertambahan umur (Kristina, 2012). Komposisi vitamin, mineral dan sukrosa dalam air kelapa muda dan tua dapat dilihat pada tabel 2.5.

Hasil penelitian Surachman (2011) menunjukkan bahwa, penambahan air kelapa 10% pada media MS mampu menghasilkan tunas mencapai 100% pada perbanyakan nilam secara *in vitro*. Pada penelitian

Ahmed (2009) dikatakan bahwa, proliferasi kalus yang baik dapat teramati setelah hari ke-25. Dan induksi kalus maksimum mencapai 98,4% terlihat pada media MS dengan tambahan 0,5 mg/l 2,4-D atau 1,0 mg/l NAA serta 10% air kelapa untuk embryogenesis somatik dan regenerasi tanaman dari kultur sel suspensi *Gymnema selvestre*. Penelitian Nambiar (2012) menyatakan bahwa, dari semua perlakuan dengan menggunakan bahan organik alami, seperti ekstrak pisang dan tomat dan air kelapa, ternyata 10% air kelapa adalah media tambahan terbaik pada media PLB untuk mengetahui efek beberapa zat organik sebagai media kultur *Dendrobium* Alya Pink. Pertumbuhan kalus juga meningkat pada penambahan media air kelapa 10 sampai 15% pada embryogenesis somatic kurma (*Phoenix dactylifera L.*) (Al-Khayri, 2010).

Tabel 2.5 Komposisi mineral, vitamin, dan sukrosa yang ada pada kelapa muda dan tua (Kristina, 2012)

Komposisi	Air kelapa muda (mg/100 ml)	Air kelapa tua (mg/100ml)
Vitamin (vitamin)		
Vitamin C	8,59	4,50
Riboflavin	0,26	0,25
Vitamin B5	0,60	0,62
Inositol	2,30	2,21
Biotin	20,52	21,50
Piridoksin	0,03	-
Thiamin	0,02	-
Mineral (Mineral)		
N	43,00	-
P	13,17	12,50
K	14,11	15,37
Mg	9,11	7,52
Fe	0,25	0,32
Na	21,07	20,55
Mn	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
Zn	1,05	3,18
Ca	24,67	26,50
Sukrosa (Sucrose)	4,89	3,45

Penggunaan air kelapa ketika ditambahkan ke dalam media yang mengandung auksin, dapat menginduksi sel-sel tanaman untuk membelah dan tumbuh dengan cepat. Pemberian air kelapa digunakan untuk mendorong pertumbuhan jaringan, sedangkan ZPT untuk diferensiasi sel (Abidin, 1983). Konsentrasi air kelapa yang biasa dipakai untuk medium kultur jaringan adalah 10% - 15% liter atau setara dengan 100-150 ml/liter, dapat juga sampai 200 ml/liter.

Dalam pertumbuhan jaringan, sitokinin dapat meningkatkan pembelahan sel pada jaringan tanaman serta mengatur pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Zulkarnain, 2009), proliferasi pucuk, dan morfogenesis pucuk (Smith, 1992). Bersama-sama dengan auksin memberikan pengaruh interaksi terhadap diferensiasi jaringan (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Apabila dalam perbandingan konsentrasi sitokinin lebih besar dari auksin, maka hal ini akan memperlihatkan stimulasi pertumbuhan tunas dan daun. Sebaliknya, apabila sitokinin lebih rendah dari auksin, maka hal ini akan mengakibatkan stimulasi pada pertumbuhan akar. Sedangkan apabila perbandingan sitokinin dan auksin berimbang, maka pertumbuhan tunas, daun, dan akar akan berimbang pula (Abidin, 1983).

Faktor yang perlu diperhatikan dalam penggunaan zat pengatur tumbuh antara lain jenis zat pengatur tumbuh yang akan digunakan, konsentrasi, urutan penggunaan, dan periode masa induksi dalam kultur tertentu (Gunawan, 1988).

2.9 Kultur Kalus

Dalam budidaya *in vitro*, menginduksi kalus merupakan salah satu langkah penting. Pembentukan kalus ditentukan sumber eksplan, komposisi nutrisi pada medium dan faktor lingkungan (Yuwono, 2006). Jenis dan konsentrasi hormon, jenis asam amino serta rasio auksin dan sitokinin sangat menentukan dalam menginduksi pembentukan kalus (Ma'rufah, 2008)

Kultur kalus bertujuan untuk memperoleh kalus dari eksplan yang diisolasi dan ditumbuhkan dalam lingkungan terkendali. Kalus diharapkan memperbanyak dirinya secara terus-menerus. Kalus merupakan suatu massa amorf yang tersusun atas sel-sel parenkim berdinding sel tipis yang berkembang dari luar hasil proliferasi sel-sel jaringan induk (Yuwono, 2006).

Metabolit sekunder bisa diperoleh melalui kultur kalus. Metabolit yang dihasilkan dari kalus sering kali kadarnya lebih tinggi dari pada metabolit yang diambil langsung dari tanamannya. Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk meningkatkan pertumbuhan kalus adalah dengan menambahkan prazat ke dalam media (Sitorus, 2011). Pemilihan media kultur jaringan merupakan kunci sukses dalam kultur jaringan.

Ciri-ciri kalus dapat dilihat dengan adanya massa sel yang tumbuh dan tidak terorganisir dari hasil proses diferensiasi eksplan, berupa dinding sel tipis dan saling terpisah, sel tumbuh keluar dari eksplan. Kultur kalus dapat dikembangkan dengan menggunakan eksplan yang berasal dari berbagai sumber, misalnya tunas muda, daun, ujung akar, buah, dan bagian bunga, di dalam media yang mengandung auksin dan kadang-kadang juga sitokinin (Gunawan, 1988). Kalus yang terbentuk menunjukkan keberadaan

kalus mempunyai aktifitas pembelahan yang tinggi (Santoso dan Nursandi, 2003).

Santoso dan Nursandi (2003) menyatakan bahwa, kemampuan bagian tanaman untuk membentuk kalus tergantung pada:

1. **Umur fisiologi** bahan tanam waktu diisolasi, untuk pengambilan bahan tanam dari umur fisiologi *juvenile* lebih baik dibanding umur fisiologi yang mendekati *mature*. Pendekatan juvenilisasi pada tanaman dewasa dapat dilaksanakan dan seringkali efektif.
2. **Musim** pada waktu bahan tanam diisolasi, pengambilan pada musim kemarau lebih sulit tumbuh tetapi resiko kontaminasi kecil, sedangkan pada musim penghujan potensialnya besar tetapi resiko kontaminasinya besar pula.
3. **Bagian tanaman** yang digunakan sebagai bahan tanam, disini bahan tanam yang masih meristematik akan lebih memungkinkan cepat mendapatkan kalus dibandingkan bagian tidak sedang tumbuh.
4. **Jenis tanaman**, juga sangat mempengaruhi kecepatan dan efektifitas pembentukan kalus.
5. **Faktor luar**, seperti ketersediaan oksigen yang perlu lebih tinggi, terjadinya akumulasi CO₂ yang lebih banyak, perlunya ketersediaan hara lebih banyak, perimbangan zat pengatur tumbuh yang tepat, cahaya yang cukup, suhu yang optimum, dan lain sebagainya.

2.10 Kualitas Kalus Hasil Kultur

Kualitas kalus dapat dilihat dari tekstur dan warna kalus. Tekstur kalus merupakan salah satu penanda yang digunakan untuk menilai suatu kualitas kalus. Sutjahjo (1994) menjelaskan bahwa terdapat dua macam kalus yang terbentuk dalam kultur *in vitro* suatu tanaman, yaitu (1) kalus embriogenik dan (2) kalus non embriogenik. Kalus embriogenik adalah kalus yang mempunyai potensi untuk beregenerasi menjadi tanaman melalui organogenesis atau embryogenesis. Sedangkan kalus non embriogenik adalah kalus yang mempunyai kemampuan sedikit atau tidak mempunyai kemampuan untuk beregenerasi menjadi tanaman. Kalus embriogenik yang mempunyai struktur kompak, tidak tembus cahaya dan pertumbuhan relatif lambat merupakan tipe yang dikehendaki dalam seleksi *in vitro* tanaman. Menurut Green (1984) dalam Sutjahjo (1994), kalus seperti ini disebut kalus tipe-I, sebaliknya kalus yang kurang kompak, friabel, dan pertumbuhannya cepat disebut kalus tipe-II. Kemampuan regenerasi kalus umumnya menurun sesuai lamanya jaringan dikulturkan, namun beberapa kultur kalus kemampuan regenerasinya dapat bertahan dalam jangka waktu relatif panjang.

Tekstur kalus kompak merupakan kalus yang tersusun atas sel-sel berbentuk nodular, dengan struktur yang padat dan mengandung cukup banyak air (Manuhara, 2011 dalam Hayati, 2010). Kalus remah merupakan kalus yang tersusun atas sel-sel yang panjang berbentuk tubular dimana struktur sel-selnya renggang, tidak teratur dan mudah rapuh. Struktur kalus remah sangat berkorelasi dengan kecepatan daya tumbuh kalus sehingga

produksi metabolit sekunder tertentu yang ingin diperoleh lebih cepat dicapai (Syahid, 2010).

Warna kalus juga merupakan indikator pertumbuhan eksplan pada budidaya *in vitro* yang menggambarkan penampilan visual kalus sehingga dapat diketahui apakah suatu kalus masih memiliki sel-sel yang aktif membelah atau telah mati. Jaringan kalus yang dihasilkan dari suatu eksplan biasanya memunculkan warna yang berbeda-beda, seperti warna kekuning-kuningan, putih, dan hijau. Warna kalus mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan, semakin hijau warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofilnya. Warna terang atau putih dapat mengindikasikan bahwa kondisi kalus masih cukup baik (Fatmawati, 2008 *dalam* Dwi, 2012), sedangkan kalus yang berwarna coklat merupakan kalus yang mengalami proses penuaan.

Berdasarkan perubahan ukuran sel, metabolisme dan penampakan kalus, proses perubahan dari eksplan menjadi kalus dapat dibagi menjadi tiga tahap yaitu tahapan induksi, proliferasi, dan diferensiasi. Tahapan induksi sel pada eksplan yang mengalami dediferensiasi dan memulai pembelahan. Pada tahapan proliferasi pembelahan sel terjadi secara cepat, sedangkan pada tahapan diferensiasi terjadinya proses metabolisme atau organogenesis. (Aitchison, 1977 *dalam* Shoaib, 1999)

Tingkat pertumbuhan dari kalus dapat digambarkan sebagai kurva pertumbuhan yang memiliki lima tahapan (fase). Kondisi kalus berbeda pada tiap tahapan pertumbuhan, yaitu (1) fase lag, dimana sel dalam persiapan membelah; (2) fase eksponen, merupakan pembelahan sel maksimal; (3) fase

linear, pembelahan melambat dan sel membesar; (4) fase pertumbuhan menurun; (5) fase stasioner atau tidak ada pertumbuhan, jumlah sel konstan (Hos, 2008). Metabolit sekunder pada umumnya meningkat pada fase stasioner. Hal ini dimungkinkan karena adanya peningkatan vakuola sel atau akumulasi. Menurut Darmawati (2007), Pada fase stasioner pertumbuhan terhenti dan terjadi kematian sel, hal ini karena sejumlah nutrisi telah berkurang atau terjadi senyawa toksik yang dikeluarkan ke dalam medium. Pada fase ini harus dilakukan subkultur pada kalus agar tetap hidup.

Kultur kalus bermanfaat untuk mempelajari beberapa aspek dalam metabolisme tumbuhan dan diferensiasinya, misalnya (1) mempelajari aspek nutrisi tanaman, (2) diferensiasi dan morfogenesis sel dan organ tanaman, (3) variasi somaklonal, (4) transformasi genetik menggunakan teknik biolistik, (5) produksi metabolit sekunder dan regulasinya (Yuwono, 2006).

2.11 Pemanfaatan Tumbuhan dalam Islam

Tumbuhan merupakan sumber utama senyawa-senyawa kimia yang digunakan untuk industri farmasi, kosmetika, wangi-wangian, industri makanan dan minuman (Santoso dan Nursandi, 2004). Manfaat tumbuhan sebagai bagian dari isi alam adalah fenomena yang harus dikaji. Keunikan tumbuhan sebagai salah satu tanda kekuasaan Allah swt terdapat dalam Alquran surat As-syu'ara' ayat 7, yang menjelaskan agar kita memperhatikan tumbuhan yang ditumbuhkannya:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٥٣﴾

Artinya: “ Dan Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik? “

Dalam Tafsir Al-Misbah dikatakan bahwa, kata (إِلَى) pada firmanNya diawal ayat ini (أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ) merupakan kata yang mengandung makna *batas akhir*. Ia berfungsi memperluas arah pandangan hingga batas akhir, dengan demikian ayat ini mengundang manusia untuk mengarahkan pandangan hingga batas kemampuannya memandang sampai mencakup seantero bumi, dengan aneka tanah dan tumbuhannya dan aneka keajaiban yang terhampar pada tumbuh-tumbuhannya.

Kata (زَوْجٍ) berarti pasangan. Pasangan yang dimaksud ayat ini adalah pasangan tumbuh-tumbuhan. Karena tumbuhan muncul di celah-celah tanah yang terhampar di bumi, dengan demikian ayat ini mengisyaratkan bahwa tumbuh-tumbuhan pun memiliki pasang-pasangan guna petumbuhan dan perkembangannya. Sedangkan kata (كَرِيمٍ) antara lain digunakan untuk menggambarkan segala sesuatu yang baik bagi setiap objek yang disifatinya. Tumbuhan yang baik, paling tidak adalah yang subur dan bermanfaat (Shihab, 2002).

Alquran tidak hanya memberi isyarat tentang keanekaragaman tumbuhan sebatas informasi bahwa tumbuhan itu bermacam-macam. Tetapi, juga memberi isyarat agar memperhatikan dan mempelajari bagaimana tumbuhan itu dibedakan dan dicipta. Sebagaimana firman Allah dalam Alquran surah At-Thahaa ayat 53:

وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّنْ نَّبَاتٍ شَتَّىٰ ﴿٥٢﴾

Artinya: “ Maka Kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam”.

Menurut Asy-Syanqithi (2007), firman Allah, شَتَّىٰ “bermacam-macam”, ia adalah sifat (*na'at*). Untuk lafadz أَزْوَاجًا “berjenis-jenis”. Pengertian dari firman Allah نَبَاتٍ شَتَّىٰ adalah jenis yang bermacam-macam bentuk, ukuran, manfaat, bau dan rasanya. Ada yang bermanfaat bagi manusia, dan ada pula yang bermanfaat bagi hewan (Ash-Shiddiqiey, 2000). Lain halnya dengan Ghaffar (2004) dalam menafsirkan ayat diatas bahwa jenis tumbuhan yang bermacam-macam mengandung makna yakni, berbagai macam tumbuh-tumbuhan berupa tanam-tanaman dan buah-buahan, baik yang asam, manis, maupun pahit, dan berbagai macam lainnya. Maha besar Allah yang telah menciptakan keanekaragaman tumbuhan (Rossidy, 2008).

Dalam kehidupannya makhluk hidup, organisme baik hewan ataupun tumbuhan akan mengalami pertumbuhan dan perkembangan. Pertumbuhan dan perkembangan merupakan suatu koordinasi yang baik dari banyak peristiwa pada tahap yang berbeda, yaitu dari tahap biofisika dan biokimia ke tahap organisme yang utuh dan lengkap.

Menurut Sasmitamihardja (1990), pertumbuhan dapat diukur sebagai pertambahan panjang, lebar atau luas, tetapi dapat pula diukur berdasarkan pertambahan volume, massa atau berat (segar atau kering). Sedangkan perkembangan tanaman dapat didefinisikan sebagai suatu

perubahan teratur dan berkembang, seringkali menuju suatu keadaan yang lebih tinggi, lebih teratur atau lebih kompleks. Artinya, peristiwa ini terlihat dari proses pembentukan jaringan dan bentuk morfologi yang khas.

Setiap fenomena yang terjadi tidak mungkin terjadi secara kebetulan termasuk pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan. Dalam Alquran surah Al-An'am ayat 95 dibawah ini telah dijelaskan kekuasaan Allah dalam menciptakan sesuatu yang Dia kehendaki:

﴿ إِنَّ اللَّهَ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَىٰ ۚ يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَمُخْرِجُ الْمَيِّتِ مِنَ الْحَيِّ ۚ ذَٰلِكُمْ اللَّهُ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَىٰ ۚ فَأَنَّىٰ تُؤْفَكُونَ ﴾

Artinya: “*Sesungguhnya Allah menumbuhkan butir tumbuh-tumbuhan dan biji buah-buahan. Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup. (yang memiliki sifat-sifat) demikian ialah Allah, Maka mengapa kamu masih berpaling?*”.

Tafsir Al-Maraghi (1992) menjelaskan ayat diatas menjelaskan bahwa “Allah menumbuhkan apa yang kita tanam, berupa benih tanaman yang dituai, dan biji buah; serta membelah dengan kekuasaan dan perhitungannya, dengan menghubungkan sebab musabab, seperti menjadikan benih dan biji dalam tanah serta menyirami tanah dengan air”. Ayat ini menunjukkan kepada kesempurnaan kekuasaan, kehalusan buatan, dan keindahan kebijaksanaan Allah. Dia mengeluarkan tumbuh-tumbuhan yang tidak berbatang atau yang berbatang, sedang ia makan dan tumbuh, dari yang mati, yakni tidak makan dan tidak tumbuh, seperti tanah, biji, benih, dan lain-lain dari jenis biji-bijian. Para ahli genetika mengungkapkan

bahwa “ pada asal makhluk hidup ada kehidupan, setiap yang tumbuh, dari jenis biji maupun benih, mempunyai kehidupan yang tersimpan. Sebab, kalau saja ia dimandulkan dengan buatan, maka ia tidak akan tumbuh. Ia tidak menjadikan makhluk hidup, kecuali tubuh yang tumbuh dan makan dengan sendirinya”. Martabat kehidupan ini, menurut mereka, paling rendah. Dia mengeluarkan yang mati dari yang hidup, seperti mengeluarkan biji dan benih dari tumbuh-tumbuhan, telur dan *nutfah* dari hewan. Az-Zajaj mengatakan, Dia (Allah) mengeluarkan tumbuh-tumbuhan yang hijau segar dari biji yang kering, dan mengeluarkan yang kering dari tumbuh-tumbuhan yang hidup dan tumbuh.

Penafsiran yang hakiki terhadap ayat: “ *Mengeluarkan yang hidup dari yang mati*” adalah sebagaimana yang tampak sekarang. Bahwa yang hidup itu, tumbuh dengan memekar, benda-benda yang mati. Itulah, Tuhan yang bersifat dengan kekuasaan dan kebijaksanaan yang sempurna adalah Allah yang menciptakan segala sesuatu, dan hanya Dia yang berhak diibadahi, tidak ada sekutu bagiNya. Kemudian mengapa kalian bisa dipalingkan dari ibadah kepadaNya, lalu kalian mempersatukanNya dengan yang tidak mempunyai kekuasaan sedikitpun untuk melakukan semua itu, seperti menumbuhkan biji dan benih.

Pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan tidaklah lepas dari peran serta air sebagaimana ayat diatas yang menerangkan bahwa dengan Allah menumbuhkan biji dengan perantara air. Firman Allah dalam Surah Al-Mu'minuun ayat 18:

وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً بِقَدَرٍ فَأَسْكَنَتْهُ فِي الْأَرْضِ وَإِنَّا عَلَىٰ ذَهَابٍ بِهِ

لَقَدِيرُونَ ﴿١٨﴾

Artinya: “ Dan Kami turunkan air dari langit menurut suatu ukuran; lalu Kami jadikan air itu menetap di bumi, dan Sesungguhnya Kami benar-benar berkuasa menghilangkannya ”.

Tafsir Alquranul Majid An-Nuur (Ash-Shiddiqiey, 2000) ayat diatas mengandung makna bahwa Dialah Allah yang menurunkan hujan dari awan kepada siapa yang Dia kehendaki menurut kadar yang ditentukan sesuai dengan kemaslahatan. Allah berkuasa menghilangkan air itu, sebagaimana Dia berkuasa menurunkannya. Dialah (Allah) yang dapat menahan hujan dari langit atau memindahkannya ke tempat lain, ke tempat yang tidak memerlukan air hujan. Dia juga bisa membenamkan air itu kedalam perut bumi, sehingga orang tak mampu mengambil kemanfaatannya. Tetapi karena kelembutanNya, Dia menurunkan air tawar dan menempatkannya di bagian permukaan bumi, selain menjadikannya berbagai mata air yang terpencah, sehingga dapat dimanfaatkan untuk memenuhi kebutuhan hidup sehari-hari, baik untuk air minum ataupun untuk menyiram tumbuh-tumbuhan.

Peran air terlihat jelas dalam menumbuhkan segala sesuatu adalah peran yang jelas yang diketahui oleh orang primitiv maupun orang modern. Namun, peran itu pada dasarnya lebih penting dan lebih jauh skopnya daripada peran yang tampak yang digunakan oleh Alquran untuk berbicara kepada manusia secara umum.

Menurut Quth (2002), peran air sejak pertama, dengan takdir Allah telah terlibat dalam permukaan tanah bagian atas menjadi tanah yang dapat ditumbuhi. Setelah itu, air terus berperan dalam penyuburan tanah ini yaitu, dengan menurunkan nitrogen ozote dari langit, setiap kali ada petir. Sehingga kilatan listrik dari petir itu, yang terjadi di udara, akan menghasilkan nitrogen yang dapat larut dalam air yang kemudian jatuh bersama air, sehingga membuat tanah menjadi subur kembali. Sebagaimana firman Allah dalam surah An-Nahl ayat 11:

يُنَبِّتُ لَكُمْ بِهِ الزَّرْعَ وَالزَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالْأَعْنَابَ وَمِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ
 إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ ﴿١١﴾

Artinya: “Dia menumbuhkan bagi kamu dengan air hujan itu tanam-tanaman; zaitun, korma, anggur dan segala macam buah-buahan. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar ada tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang memikirkannya”.

Makna ayat diatas pada Tafsir Alquranul Majid An-Nuur adalah bahwa dalam kejadian hujan yang berasal dari air laut yang asin, yang menguap ke udara dan kembali turun sebagaimana yang dikehendaki oleh Allah yang kemudian tumbuhlah berbagai macam tanaman dan pohon-pohon yang bermacam-macam bentuk dan rupanya itu terdapat tanda-tanda dan dalil yang menunjuk pada keesaan Allah bagi kaum yang suka memikirkannya (Ash-Shiddiqiey, 2000).

Keteraturan fenomena alam merupakan tanda-tanda atau bukti yang nyata bagi kaum yang mempergunakan akal untuk memahami hakikat

alam yang mereka diami. Karena makhluk hidup yang hidup di dunia ini dibawah kadar dan kodrat Allah.

Pada ayat yang lain, Allah juga telah menjelaskan bahwa dengan air hujan menyebabkan tumbuh subur dan berkembangnya tumbuh-tumbuhan. Firman Allah dalam surah Al-Kahfi ayat 45:

وَأَضْرَبَ لَهُمْ مَثَلًا الْحَيَاةَ الدُّنْيَا كَمَا أَنْزَلْنَاهُ مِنَ السَّمَاءِ فَاخْتَلَطَ بِهِ نَبَاتُ الْأَرْضِ فَأَصْبَحَ هَشِيمًا تَذْرُوهُ الرِّيحُ ۗ وَكَانَ اللَّهُ عَلَىٰ كُلِّ شَيْءٍ مُّقْتَدِرًا ﴿٤٥﴾

Artinya: “Dan berilah perumpamaan kepada mereka (manusia), kehidupan dunia sebagai air hujan yang Kami turunkan dari langit, Maka menjadi subur karenanya tumbuh-tumbuhan di muka bumi, kemudian tumbuh-tumbuhan itu menjadi kering yang diterbangkan oleh angin. Dan adalah Allah, Maha Kuasa atas segala sesuatu”.

Tafsir Al-Misbah (Shihab, 2002) menafsirkan ayat diatas bahwa, kehidupan dunia adalah sebagai air hujan yang diturunkan dari langit, dan menyirami tumbuh-tumbuhan maka bercampurlah dengannya, yakni bercampurlah air itu dengan tanah yang mengandung benih tumbuh-tumbuhan yang berada di bumi yakni dalam tanah sehingga benih itu tumbuh subur menghiijau dan matang, lalu dengan amat cepat ia yakni tumbuh-tumbuhan menjadi kering kerontang, yang diterbangkan oleh angin. Demikian Allah Maha Kuasa menghidupkan dan mematikan, menyuburkan tumbuhan dan melayukannya, dan demikian juga sifat dan kesudahan kenikmatan hidup duniawi dan adalah Allah Maha Kuasa atas segala

sesuatu. Dengan demikian pada yang disebutkan tadi itu terdapat peringatan bagin orang-orang berakal. Firman Allah dalam surah Az-Zumar ayat 21:

أَلَمْ تَرَ أَنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَسَلَكَهُ يَنْبِيعَ فِي الْأَرْضِ ثُمَّ نُخْرِجُ
 بِهِ زَرْعًا مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ ثُمَّ يَهِيَجُ فَتَرَاهُ مُصْفَرًّا ثُمَّ يَجْعَلُهُ حُطَمًا إِنَّ فِي
 ذَلِكَ لَذِكْرَى لِأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿٢١﴾

Artinya: “Apakah kamu tidak memperhatikan, bahwa Sesungguhnya Allah menurunkan air dari langit, Maka diaturnya menjadi sumber-sumber air di bumi kemudian ditumbuhkan-Nya dengan air itu tanam-tanaman yang bermacam-macam warnanya, lalu menjadi kering lalu kamu melihatnya kekuning-kuningan, kemudian dijadikan-Nya hancur berderai-derai. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat pelajaran bagi orang-orang yang mempunyai akal”.

Kata (يُخْرِجُ زَرْعًا)/kemudian sebelum firmanNya (ثُمَّ)/Dia mengeluarkan dengannya tanam-tanaman, berfungsi menggambarkan betapa jauh dan hebat penciptaan Allah yang kuasa menumbuhkan tumbuhan dari air serta betapa ia memberi kesan yang dalam. Apalagi proses penumbuhan itu dapat terlihat dengan mata kepala dari saat ke saat.

FirmanNya: (إِنَّ فِي ذَلِكَ لَذِكْرَى لَأُولِ الْأَلْبَابِ) sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat pelajaran bagi Ulil Albab. “pelajaran tersebut antara lain berupa kuasa Allah membangkitkan yang telah mati. Turunnya hujan dari langit serta tumbuhnya aneka tumbuhan terlihat setiap saat. Tumbuhan itu hidup, berkembang, kemudian layu dan mati.

AlQuran dapat menerangkan pada kita bahwa segala sesuatu dapat terjadi hanya dengan ketetapan Allah yang Maha Kuasa dan tidak ada yang

dapat menentang ataupun menolaknya. Dialah yang Maha Mengetahui segala sesuatu, sehingga tidak ada sebesar atompun baik dilangit maupun di bumi yang luput dari pengetahuannya. Dengan demikian, sudah selayaknya kita mentadabburi tanda-tanda kekuasaan Allah dan keagungan ciptaannya dalam lingkup kehidupan disekitar kita sebagai rasa syukur bahwa Allahlah Maha Pengatur dan Pencipta pada tiap-tiap bentuk kejadian sehingga kita mendapat petunjuk. *Alhamdulillah.*

