

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tumbuhan merupakan salah satu makhluk hidup ciptaan Allah SWT yang banyak memberikan manfaat bagi makhluk hidup yang lainnya, baik manusia maupun hewan. Allah SWT menganugrahkan makhluknya dengan berbagai macam tanaman, salah satunya adalah tanaman stevia (*Stevia rebaudiana*) yang dapat dimanfaatkan sebagai tanaman obat maupun sebagai pemanis untuk makanan. Allah SWT berfirman dalam surat Asy-Syu'ara (26) ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمَا أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

Artinya:

“Dan Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam (tumbuh-tumbuhan) yang baik?” (QS. Asy-Syu'ara ayat 7).

Shihab (2002) memberikan tafsiran bahwa ayat ini mengundang manusia untuk mengarahkan pandangan hingga batas kemampuannya memandang sampai mencakup seantero bumi, dengan aneka tanah dan tumbuhannya dan aneka keajaiban yang terhambat pada tumbuh-tumbuhannya.

Berdasarkan ayat diatas, dijelaskan bahwa pada dasarnya islam tidak pernah menghambat kemajuan sains dan teknologi. Bahkan cenderung

untuk mendorong kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi demi kemaslahatan umat. Terkait dengan ayat diatas, menunjukkan bahwa Allah SWT memerintahkan untuk memperhatikan bumi agar mereka dapat belajar dan berfikir untuk meneliti dan mengembangkan ilmu pengetahuan, salah satunya dengan teknologi kultur jaringan tanaman. Selain itu pada ayat di atas juga disebutkan bahwa Allah SWT telah menumbuhkan berbagai macam tumbuh-tumbuhan, salah satunya tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) yang ditumbuhkan oleh Allah dengan berbagai manfaat. Tanaman ini biasanya digunakan oleh masyarakat sebagai pengganti gula sintetis sebab pada daun stevia terdapat glikosida dengan tingkat kemanisan kurang lebih 200-300 kali lebih manis dibandingkan gula tebu atau sukrosa serta sifatnya yang non-kalori sehingga aman jika dikonsumsi oleh penderita diabetes atau orang yang sedang melakukan program diet.

Beberapa negara termasuk indonesia stevia sedang dikembangkan sebagai pemanis alami alternatif sebagai pengganti sakarin dan siklamat yang diduga beresiko bagi kesehatan, menurut hasil penelitian kedua pemanis sintetis tersebut dapat menyebabkan kanker sehingga penggunaannya mulai dikurangi. Menurut Cahyadi (2008) dijelaskan bahwa pemanis sintetis merupakan bahan tambahan yang dapat menyebabkan rasa manis pada pangan, tetapi tidak memiliki nilai gizi. Bahan sintetis ini memiliki sifat yang karsinogenik yaitu penyebab kanker. Beberapa pemanis sintetis yang telah dikenal dan banyak digunakan adalah sakarin, siklamat dan aspartam. Berdasarkan penjelasan tersebut keberadaan stevia sangat sesuai dengan

harapan yang diinginkan oleh masyarakat, mengingat gula merupakan salah satu kebutuhan pokok masyarakat di Indonesia.

Stevia rebaudiana Bertonni (Famili-Asteraceae) adalah satu dari 154 jenis stevia dan satu dari dua spesies yang menghasilkan pemanis steviol glikosida (Madan, 2010 dan Jitendra, 2012). Stevia merupakan tanaman asli dari Paraguay Amerika selatan (Banerjee, 2008; Jitendra, 2012; Madan, 2010). Glikosida dalam daun stevia terdiri dari steviosida, beberapa rebaudiosida termasuk rebaudiosida A (reb-A), dulkosida, dan beberapa senyawa lainnya (Geuns, 2003). Glikosida tidak mengandung kalori dan mempunyai indeks glikemik hampir nol sehingga sesuai untuk penderita diabetes dan seseorang yang sedang melakukan diet makanan untuk menurunkan berat badan. Stevia digunakan pada minuman ringan rendah-kalori, bahan makanan, pasta gigi, bahan kosmetika, antioksidan, antihipertensi, dan berbagai produk lain (Sumaryono dkk, 2011). Menurut (Chatsudthipong, 2009) steviosida adalah glikosida diterpenoid, yang terdiri dari aglikon (steviol) dan tiga molekul glukosa. Fatima (2010) menambahkan senyawa pemanis diisolasi dari daun Stevia. Senyawa ini disebut sebagai "stevioside" yang terdiri dari tiga molekul kompleks glukosa dan satu molekul aglikon steviol, alkohol karboksilat diterpenik.

Sebagaimana kita lihat, manfaat tanaman stevia adalah sebagai pengganti gula sintetis atau pemanis buatan, sehingga lebih aman mengkonsumsi gula stevia karena sifatnya yang tidak karsinogenik, selain itu stevia juga berpotensi sebagai tanaman obat. Berdasarkan banyaknya manfaat

dari tanaman stevia inilah yang mendorong untuk dilakukannya kultur jaringan yaitu kalus. Kultur kalus juga menjadi suatu alternatif untuk meningkatkan sintesa metabolit sekunder yang mempunyai nilai komersial tinggi. Teknik *In Vitro* mempunyai keuntungan antara lain produksi metabolit sekunder dapat dilakukan sepanjang tahun dan tanpa dipengaruhi oleh cuaca, serta dapat dikembangkan untuk produksi biomassa metabolit secara besar-besaran. Sehingga kultur merupakan cara yang dapat digunakan dalam meningkatkan sintesis metabolit sekunder.

Kultur jaringan telah lama digunakan sebagai metode untuk produksi senyawa bioaktif dari tumbuhan. Kelebihan penggunaan kultur jaringan dalam produksi senyawa bioaktif dibanding dengan budidaya tanaman secara utuh antara lain adalah tidak adanya keterbatasan iklim, tidak memerlukan lahan yang luas, dan senyawa bioaktif dapat dihasilkan secara terus menerus dalam keadaan yang terkontrol (Habibah, 2009).

Produktivitas tumbuhan dalam menghasilkan metabolit sekunder dapat ditingkatkan dengan beberapa cara, yaitu mengoptimasi faktor fisiologi lingkungan hidup sel diantaranya memanipulasi nutrisi media tumbuh, zat pengatur tumbuh, prekursor dan elisitor untuk sintesis metabolit sekunder (Zhao, 2005 dalam Yulinda 2010). Pada penelitian ini menggunakan cara manipulasi nutrisi media tumbuh untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder.

Media merupakan hal yang penting dalam kultur kalus. Media sering ditambahkan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT). ZPT yang sering digunakan adalah

2,4-D. Dimana kelebihan dari 2,4-D adalah sifatnya yang lebih stabil dari pada auksin lainnya. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) menyebutkan bahwa 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 pemanasan pada proses sterilisasi.

Menurut penelitian Sadeak (2009) melaporkan bahwa kehadiran 2, 4-D (3,0 mg/l) dalam media MS menunjukkan pengaruh lebih baik pada induksi kalus daun. Penelitian Janarthanam (2010) disebutkan bahwa 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 penelitian Ali (2010) juga menggunakan 2,4-D sebagai ZPT untuk perbanyakkan stevia, 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.

Eksplan yang ditumbuhkan pada media MS tanpa ZPT tidak dapat menginduksi kalus. Manurung (2007) melaporkan bahwa kalus tumbuh pada semua media perlakuan ZPT kecuali media kontrol MS₀ (0 mg/L 2,4-D). Eksplan pada media MS yang mengandung ZPT 2,4-D, terinduksi seluruhnya menjadi kalus. Berdasarkan penjelasan tersebut dapat diduga bahwa eksplan yang ditumbuhkan pada media MS yang hanya ditambahkan PEG saja tanpa ZPT akan mengalami cekaman osmosis sehingga akan menghambat pertumbuhan kalus (tidak dapat menginduksi kalus).

Kalus yang ditumbuhkan pada media kombinasi auksin (2,4-D) dan PEG 6000 sering mengalami browning (pencoklatan) akibat dari stres osmotik. Ketahanan kalus untuk tetap hidup tergantung dari konsentrasi PEG yang diberikan. Mahmood (2012) melaporkan, Kalus yang ditumbuhkan pada media M1 (4 mg/L 2,4-D + 0 MPa PEG 6000) terlihat sangat baik dan tumbuh dengan sehat dibandingkan kalus yang ditumbuhkan pada media dengan cekaman. Kalus pada media M1 dan M2 (4 mg/L 2,4-D + -0,3 MPa PEG 6000) setelah 2 minggu tidak mempengaruhi pertumbuhan kalus, kalus tampak berwarna kuning keputihan. Semua kalus mengalami pencoklatan pada media M4 (4 mg/L 2,4-D + -0,9 MPa PEG 6000) setelah 3 minggu dan pada media M5 (4 mg/L 2,4-D + -1,2 MPa PEG 6000) setelah 2 minggu.

Berdasarkan penjelasan tersebut maka dipilih hormon 2,4-D yang dikombinasi dengan PEG 6000 untuk manipulasi nutrisi media tumbuh induksi kalus. Dimana kalus yang tumbuh akan di arahkan untuk sintesis metabolit sekunder. Perlakuan manipulasi media tumbuh ini ada dua macam, yaitu secara fisik dan kimia. Perlakuan secara fisik dapat berupa pemberian sinar UV, suhu ekstim dan lain sebagainya, sedangkan perlakuan kimia dapat berupa pemberian ZPT 2,4-D atau senyawa osmotikum berupa PEG 6000.

Penelitian ini menggunakan PEG dengan berat molekul (BM) 6000 sebab PEG 6000 memiliki gugus etilen yang luas, sehingga kemampuan mengikat molekul air juga besar, yang nantinya bisa mengakibatkan penurunan tekanan osmosis pada sel sehingga mengalami stres osmosis. Sedangkan PEG dibawah 6000 memiliki gugus etilen oksida lebih sedikit

sehingga kemampuan mengikat molekul air juga sedikit, hal itu menyebabkan air yang diikat terlalu sedikit sehingga tidak dapat membantu dalam proses stres osmosis. Hal ini sesuai dengan yang ditulis oleh Sulastri (2010) pada penelitiannya tentang tanaman alfalfa, yaitu alasan digunakan PEG 6000 MW karena sifatnya sebagai polimer yang non ionik dapat berikatan dengan molekul air melalui dua ikatan: ikatan hidrogen dan ikatan van der Waals (menurunkan nilai potensial air).

Menurut Rahayu (2005) dalam Yulinda (2010) melaporkan PEG adalah senyawa yang dapat menurunkan potensial osmotik larutan melalui aktivitas matriks sub-unit etilena oksida yang mampu mengikat molekul air dengan ikatan hidrogen. Karena turunnya potensial osmotik larutan, air yang ada pada medium tidak dapat diserap oleh tanaman, sehingga tanaman mengalami stress osmosis.

Pemberian PEG akan menyebabkan kekurangan air sehingga akan menginduksi protein, mengkode gen-gen pembentuk enzim yang terlibat dalam biosintesis metabolisme sekunder. Dengan meningkatnya kandungan enzim dalam jaringan tanaman maka diharapkan kandungan metabolit sekunder dapat meningkat. Aktivitas enzim dipengaruhi antara lain oleh adanya prekursor, senyawa yang bersangkutan dan akumulasi produk metabolisme sekunder tersebut (Ernawati, 1992).

Terdapat dua macam cara teknik kultur kalus untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder dengan penambahan PEG 6000, yaitu baik dengan cara PEG 6000 ditambahkan langsung pada media induksi kalus atau

PEG 6000 ditambahkan pada media subkultur. Hal ini sesuai dengan penelitian dari Hartanti (2013) pada tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* var. *Prancak 95*) melaporkan bahwa tekstur kalus yang dibentuk oleh eksplan pada medium (induksi kalus) yang ditambahkan *polyethylene glycol* (PEG) berbeda dengan tekstur kalus yang dibentuk oleh eksplan pada kontrol. Tekstur kalus pada perlakuan dengan *polyethylene glycol* (PEG) adalah remah. Sedangkan penambahan PEG 6000 pada media subkultur menyebabkan kalus bertekstur kompak. Hal ini sesuai dengan penelitian Zuhilmi (2012) pada Kalus Gatang (*Spilanthus acmella* Murr.) melaporkan bahwa semua kalus yang diperlakukan (ditambahkan PEG 6000 pada media subkultur) berstruktur kompak dan berwarna putih kekuningan.

Konsentrasi PEG 6000 yang digunakan pada penelitian ini yaitu 0 mg/L, 5 mg/L, 15 mg/L, dan 25 mg/L. Penetapan konsentrasi tersebut berdasarkan pada penelitian Hartanti (2013) pada tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* var. *Prancak 95*), yaitu dengan konsentrasi 0 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L, dan 30 mg/L. Berdasarkan hasil penelitiannya dapat disimpulkan bahwa konsentrasi PEG yang ditoleransi eksplan untuk membentuk kalus adalah 25 mg/L dengan kalus yang terbentuk berwarna coklat dan tekstur remah. Pada penelitian Hartanti penambahan PEG ditambahkan secara langsung pada media induksi kalus (bukan subkultur). Sedangkan penggunaan konsentrasi dalam persentase (%) tidak digunakan karena ditakutkan konsentrasi PEG terlalu besar sehingga dapat menyebabkan

kalus tidak tumbuh dan mati. Penggunaan konsentrasi dalam bentuk persentase (%) sering digunakan pada media subkultur.

Berdasarkan penelitian Zulhilmi (2012) pada Kalus Gatang (*Spilanthes acmella* Murr.) menunjukkan perlakuan PEG 2% dan 5% meningkatkan sintesis alkaloid sedangkan kandungan terpenoid meningkat pada perlakuan 3 % dan 4 % PEG. Adapun senyawa fenolik hanya muncul pada perlakuan PEG 4%. Yulinda (2010) melaporkan bahwa kandungan metabolit sekunder triterpenoid pada tanaman *Centella asiatica* meningkat dengan penambahan 1 dan 2 % PEG. Sedangkan penelitian Fakhri (2010) pada tanaman *Theobroma cacao* menunjukkan kandungan metabolit sekunder katekin terbanyak dihasilkan pada penambahan PEG 1%.

Berdasarkan uraian diatas, penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder (steviosida) pada tanaman *Stevia rebaudiana* dengan menginduksi kalus pada media MS yang ditambahkan berbagai konsentrasi ZPT 2,4-D dan PEG 6000.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana respon pembentukan kalus *Steviosida rebaudiana* terhadap pemberian kombinasi ZPT 2,4-D dan PEG 6000 pada media MS secara in vitro?
2. Bagaimana pengaruh pemberian kombinasi ZPT 2,4-D dan PEG 6000 pada media MS terhadap kandungan metabolit sekunder pada kalus *Stevia rebaudiana* secara in vitro?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui respon pembentukan kalus *Steviosida rebaudiana* terhadap pemberian kombinasi ZPT 2,4-D dan PEG 6000 pada media MS secara in vitro.
2. Mengetahui pengaruh pemberian kombinasi ZPT 2,4-D dan PEG 6000 pada media MS terhadap kandungan metabolit sekunder pada kalus *Stevia rebaudiana* secara in vitro.

1.4 Hipotesis

1. Terdapat pengaruh pemberian kombinasi beberapa konsentrasi ZPT 2,4-D dan PEG 6000 terhadap perkembangan kalus *Stevia rebaudiana* secara in vitro.
2. Terdapat pengaruh pemberian kombinasi beberapa konsentrasi ZPT 2,4-D dan PEG 6000 terhadap kandungan metabolit sekunder pada kalus *Stevia rebaudiana* secara in vitro.

1.5 Manfaat

- a. Hasil penelitian ini bermanfaat untuk pengembangan teknologi dalam kultur *in vitro* tanaman berkaitan dengan kultur kalus tanaman *Stevia rebaudiana* Bertoni.

- b. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi gambaran untuk penelitian lanjutan kultur *in vitro* pada tanaman *Stevia rebaudiana* Bertoni, khususnya untuk memproduksi senyawa metabolit sekunder.

1.6 Batasan Masalah

1. Media yang digunakan yaitu MS (Murashige & Skoog).
2. Zat pengatur tumbuh menggunakan 2,4-D.
3. Manipulasi media tumbuh untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder menggunakan PEG 6000 dengan konsentrasi 0 mg/L, 5 mg/L, 15 mg/L, dan 25 mg/L.
4. Bagian *Stevia rebaudiana* yang digunakan sebagai eksplan adalah daun muda dari ujung tunas (tunas apikal dan aksial) hingga tiga daun dibawahnya dengan ciri-ciri daun berwarna hijau (tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda).
5. Perkembangan kalus yang diamati terdiri dari warna kalus, tekstur kalus sebagai data kualitatif dan berat kalus sebagai data kuantitatif serta pengukuran kadar metabolit sekunder.
6. Pengukuran kadar metabolit sekunder terdiri dari pengukuran kadar senyawa steviosida secara kuantitatif dengan menggunakan metode High Performance Liquid Chromatography (HPLC).