

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pengaruh Konsentrasi 2,4-D dan PEG 6000 terhadap pertumbuhan dan Perkembangan Kalus Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.)

4.1.1. Pembentukan Kalus Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.)

Data hari muncul kalus yang diperoleh dari hasil uji analisis variansi (ANOVA) untuk mengetahui adanya pengaruh konsentrasi 2,4-D dan PEG 6000 terhadap pembentukan kalus Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.), dari hasil ANOVA menunjukkan bahwa konsentrasi 2,4-D menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan terhadap hari munculnya kalus Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.), sebab ditunjukkan bahwa signifikansi $< 0,05$ (Lampiran 5), sehingga dilanjutkan dengan uji DMRT 5% (tabel 4.1). Sedangkan PEG 6000 tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap hari munculnya kalus Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.), sebab signifikansi $> 0,05$. Begitu juga dengan hasil ANOVA interaksi antar 2,4-D dan PEG 6000, menunjukkan tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap hari munculnya kalus Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.), sebab signifikansi $> 0,05$. Sehingga tidak dilakukan uji lanjut DMRT 5% (Lampiran 5).

Tabel 4.1: Pengaruh Konsentrasi 2,4-D terhadap hari munculnya kalus *Stevia (Stevia rebaudiana Bert.)*

Konsentrasi 2,4-D (mg/L)	Hari Muncul Kalus (HST)
(K1) 1 mg/L	17,08 b
(K2) 2 mg/L	15,58 a
(K3) 3 mg/L	15,08 a

Keterangan: angka yang didampingi oleh huruf yang sama pada kolom yang bersesuaian tidak berbeda nyata pada uji DMRT α : 0,05

Salah satu indikator adanya pertumbuhan dalam kultur *in vitro* adalah munculnya kalus pada eksplan. Pada penelitian ini, pembentukan kalus dari bagian daun tanaman yang dipotong pada awalnya terjadi pada permukaan daun yang dipotong kemudian akan mengalami pertumbuhan hingga menutupi seluruh permukaan eksplan. Kalus merupakan proliferasi massa sel yang belum terdiferensiasi dan terdiri dari sel yang tidak teratur. Kultur kalus merupakan kultur sekumpulan sel yang tidak terorganisir yang berasal dari berbagai jaringan tumbuhan. Kultur kalus digunakan untuk memperoleh kalus dari eksplan yang diisolasi dan ditumbuhkan dalam lingkungan terkendali. Pembentukan kalus adalah menginduksi dari bagian tanaman tertentu dengan memberikan zat pengatur tumbuh.

Menurut Andaryani (2010), kalus merupakan sekumpulan masa sel yang terdeferensiasi menjadi organ dari tanaman. Proses terjadinya kalus tergantung bagian yang dipakai sebagai eksplan dan zat tanam yang ditambahkan pada media dasar. Sedang Zulkarnain (2009) juga menambahkan bahwa bahwa kalus merupakan masa parenkimatis yang belum terdeferensiasi. Pembentukan kalus pada teknik kultur

jaringan sendiri dipengaruhi oleh berbagai faktor yaitu komposisi zat pengatur tumbuh (ZPT) ataupun senyawa-senyawa organik yang ditambahkan kedalam media kultur.

Berdasarkan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi 2,4-D yang memicu munculnya kalus lebih cepat adalah 2,4-D dengan konsentrasi 3 mg/L (Tabel 4.1) tetapi hasil DMRT 5% konsentrasi 2,4-D 2 mg/L (Tabel 4.1) tidak berbeda nyata dengan 3 mg/L sehingga penggunaan ZPT yang efektif adalah 2,4-D 2 mg/L pada hari ke-15. Menurut Indah (2013), kalus pertama kali terbentuk pada sayatan eksplan yang kontak dengan media. Diawali dengan pembengkakan pada eksplan kemudian sayatan eksplan bergelombang (*swelling*). Kalus yang dihasilkan melalui kultur secara *in vitro* terbentuk karena adanya perlukaan pada jaringan dan respon terhadap hormon (ZPT). Munculnya kalus pada bagian yang terluka diduga karena adanya rangsangan dari jaringan pada eksplan untuk menutupi lukanya.

Pengamatan hari pertama setelah tanam menunjukkan eksplan belum mengalami perubahan. Ekplan dengan perlakuan K1P1, K1P2, K1P3, K1P4, K2P1, K2P4, K3P1, dan K3P3, mulai menunjukkan perubahan pada hari ke-9 yaitu dengan pembengkakan eksplan dan menggulungnya daun, pada hari ke-10 ekplan mulai bertambah besar. Sedangkan untuk perlakuan K2P2, K3P2, K3P3, dan

K3P4 mulai menunjukkan perubahan eksplan antara hari ke 11 hingga hari ke-13.

Waktu inisiasi terbentuknya kalus pada tiap perlakuan menunjukkan hari yang berbeda-beda. Kalus terbentuk dimulai dari 14 hst (2 minggu) hingga hari ke-20 hst. Pembentukan kalus diawali dengan pembengkakan (penambahan volume) eksplan kemudian eksplan akan menggulung dan daun akan terbentuk kalus dari bagian ujung eksplan yang mengalami perlakuan.

Proses pembesaran sel terjadi karena pengaruh auksin. Auksin eksogen dalam hal ini 2,4-D yang terlarut dalam media, akan berdifusi masuk ke dalam sel-sel eksplan melalui luka pada ujung-ujung eksplan. Auksin akan memacu pelunakkan dinding sel dengan cara mengaktifasi pompa proton (ion H^+) yang terletak pada membran plasma, sehingga menyebabkan derajat keasaman (pH) pada bagian dinding sel lebih rendah, yaitu mendekati pH pada membran plasma (sekitar pH 4,5). Aktifnya pompa proton tersebut dapat memutuskan ikatan hidrogen diantara mikrofibril selulosa dinding sel. Putusnya ikatan hidrogen menyebabkan dinding sel mudah merenggang sehingga tekanan dinding sel akan menurun dan mengakibatkan pelenturan sel. Derajat keasaman yang rendah juga dapat mengaktifasi enzim tertentu pada dinding sel yang dapat mendegradasi bermacam-macam protein atau polisakarida yang menyebar pada dinding sel yang lunak dan

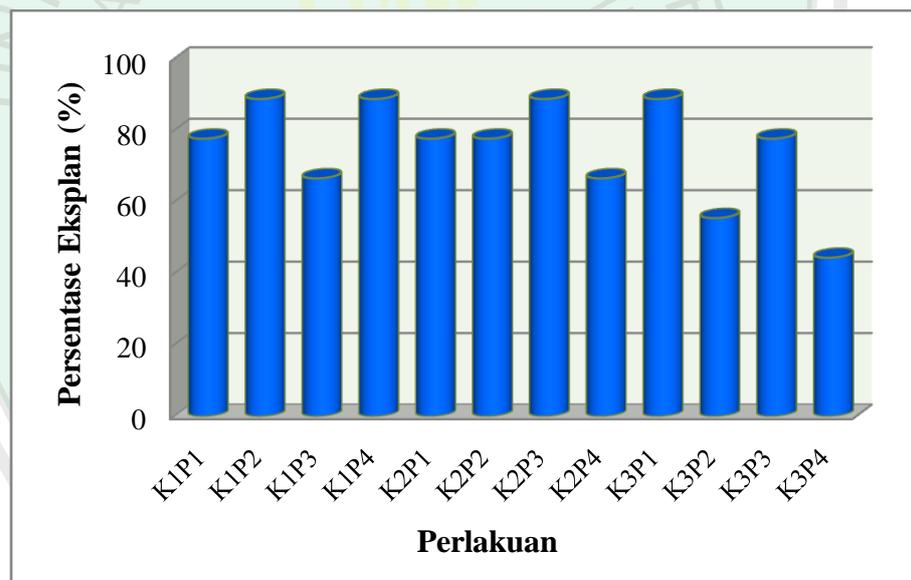
lentur, sehingga pembesaran sel dapat terjadi (Catala *et al.*, 2000 dalam Haryati, 2010).

Berdasarkan hasil yang telah diamati maka penambahan beberapa konsentrasi 2,4-D memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan kalus (hari muncul kalus) stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.). Sedangkan penambahan beberapa konsentrasi PEG 6000 serta interaksi beberapa konsentrasi 2,4-D dan PEG 6000 tidak memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan kalus (hari muncul kalus) stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.). Hal ini dimungkinkan pemberian beberapa konsentrasi PEG 6000 terlalu kecil sehingga tidak berpengaruh nyata terhadap hari muncul kalus.

4.1.2. Persentase Eksplan Berkalus Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.)

Hasil analisis of varian (ANAVA) pada taraf kepercayaan 95% menunjukkan bahwa perlakuan beberapa konsentrasi 2,4-D dan PEG 6000 terhadap persentase pertumbuhan kalus tidak menunjukkan hasil yang signifikansi, hal ini terlihat dari hasil ANAVA bahwa signifikansi $> 0,05$ (Lampiran 8). Sedangkan hasil interaksi 2,4-D dan PEG 6000 juga tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap persentase pertumbuhan kalus. Hal ini terlihat dari hasil uji variansi ANAVA bahwa signifikansi $> 0,05$ (Lampiran 8), sehingga tidak diperlukan uji DMRT 5%.

Ekplan yang ditanam pada perlakuan K1P2, K1P4, K2P3, dan K3P1 dapat membentuk kalus dengan persentase pertumbuhan kalus 88,89%. Sedangkan pada perlakuan K1P1, K2P1, K2P2, dan K3P3 dapat membentuk persentase pertumbuhan kalus 77,78%. Dan pada perlakuan K1P3, K2P4, K3P2, dan K3P4 membentuk prosentase berkalus yang masing-masing berurutan yaitu 66,67%, 55,56%, dan 44,44%. (Gambar 4.1). Berikut merupakan grafik dari persentase eksplan berkalus:



Gambar 4.1: Grafik Persentase Eksplan Berkalus Stevia (*Stevia rebaudiana*) pada minggu ke-4

Meskipun pada ANAVA didapatkan hasil yang tidak signifikan, tetapi berdasarkan gambar 4.1 maka dapat dikatakan bahwa persentase eksplan berkalus yang lebih tinggi yaitu pada eksplan yang di tanam pada media K1P2 (1 mg/L 2,4-D + 5 mg/L PEG 6000), K1P4

(1 mg/L 2,4-D + 25 mg/L PEG 6000), K2P3 (2 mg/L 2,4-D + 15 mg/L PEG 6000), dan K3P1 (3 mg/L 2,4-D + 0 mg/L PEG 6000) dengan rata-rata persentase eksplan 88,89%, dan persentase eksplan berkalus yang rendah yaitu pada eksplan yang di tanam pada media K3P4 (3 mg/L 2,4-D + 25 mg/L PEG 6000) dengan rata-rata persentase eksplan 44,44%. Hal ini diduga karena adanya pengaruh jenis eksplan dan konsentrasi 2,4-D + PEG 6000. Komatsuda (1991) dalam Dian (2005) membahas bahwa kondisi fisiologis jaringan eksplan yang digunakan dan perbedaan kompetisi regenerasi.

Menurut Thomas dan Davey (1975) dan George dan Sherington, bahwa pembelahan sel yang mengarah pada terbentuknya kalus terjadi dari adanya respon terhadap luka dan suplay hormon alamiah atau buatan dari luar kedalam eksplan. Hal ini membuktikan bahwa terbentuknya kalus sangat dipengaruhi oleh peran ZPT. Menurut Zulfiqar (2009) kondisi tersebut membuktikan bahwa pertumbuhan dan morfogenesis tanaman secara invitro dikendalikan oleh keseimbangan dan interaksi dari hormon (ZPT) dalam eksplan baik endogen maupun eksogen yang diserap dari media.

Selain dari ZPT keseimbangan nutrisi dan kondisi lingkunganpun juga patut untuk diperhatikan. Sebab semuanya akan saling berkesinambungan. Jika salah satu dari faktor tersebut tidak terpenuhi maka hasil pertumbuhan eksplan pun tidak optimal.

4.1.3. Berat Kalus Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.)

Pertumbuhan adalah peningkatan permanen ukuran organisme atau bagian dari tumbuhan yang merupakan hasil dari peningkatan jumlah dan ukuran sel. Pertumbuhan dicirikan dengan bertambahnya berat yang *irreversible*. Berdasarkan data yang diperoleh dari hasil analisis of varian (ANOVA) pada taraf kepercayaan 95% menunjukkan bahwa 2,4-D tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap berat kalus Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.), sebab signifikansi $> 0,05$. Berbeda dengan perlakuan beberapa konsentrasi PEG 6000, setelah dilakukan analisis dengan ANOVA menunjukkan hasil yang signifikan, dimana signifikansi $< 0,05$ (Lampiran 10), sehingga perlu adanya uji lanjut menggunakan DMRT 5% (tabel 4.2). Sedangkan hasil ANOVA interaksi antar 2,4-D dan PEG 6000, menunjukkan tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap berat kalus Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.), sebab signifikansi $> 0,05$. Sehingga tidak dilakukan uji lanjut DMRT 5% (Lampiran 10).

Tabel 4.2: Pengaruh beberapa konsentrasi PEG 6000 terhadap berat kalus pada minggu ke-4

Konsentrasi PEG 6000 mg/L	Berat kalus (gram)
(P1) 0 mg/L	0,2700 b
(P2) 5 mg/L	0,2511 b
(P3) 15 mg/L	0,1211 a
(P3) 25 mg/L	0,1233 a

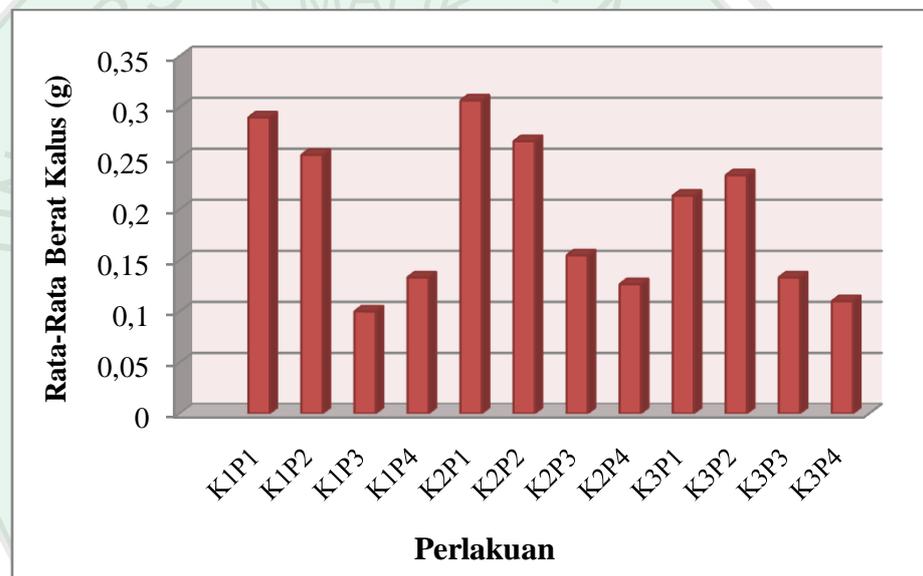
Keterangan: angka yang didampingi oleh huruf yang sama pada kolom yang bersesuaian tidak berbeda nyata pada uji DMRT $\alpha: 0,05$

Berdasarkan Tabel 4.2 dapat dilihat bahwa perlakuan yang diberikan memberikan pengaruh terhadap penurunan berat basah kalus. Pemberian PEG 5 mg/L mampu mempertahankan berat basa kalus dibandingkan perlakuan PEG yang lain. Pemberian PEG 15 mg/L dan 25 mg/L memberikan pengaruh yang signifikan terhadap penurunan berat basah kalus dapat dilihat dari uji ANAVA pada tabel 4.2. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi PEG 15 mg/L dan 25 mg/L memberikan efek cekaman osmosis pada medium sehingga menghambat pertumbuhan kalus.

Berdasarkan hasil penelitian berat kalus dari kalus stevia ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Zulhildi (2012) pada kalus gantang, bahwa pemberian PEG 5% memberikan pengaruh yang signifikan terhadap penurunan berat basah kalus dibandingkan dengan PEG 0% (kontrol), 1%, 2%, dan 3%. Pemberian PEG 5% mampu menurunkan berat rata-rata kalus dari 120 mg (kontrol) menjadi 86,67 mg atau menurun 27,78% dibandingkan dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi PEG 5 % memberikan efek cekaman kekeringan pada medium sehingga menghambat pertumbuhan kalus.

Berat kalus merupakan suatu indikator untuk mengetahui adanya proses pertumbuhan dan perkembangan dari eksplan. Dimana kalus mengalami pembelahan sel yang mengakibatkan masa sel akan bertambah. Penimbangan berat kalus ini dilakukan pada minggu ke-4 setelah tanam.

Ekplan yang ditanam pada perlakuan K1P1, K1P2, K1P3, dan K1P4 mempunyai rata-rata berat kalus yang berurutan 0,29 gram; 0,2533 gram; 0,1 gram; dan 0,133 gram. Kemudian perlakuan K2P1, K2P2, K2P3, dan K2P4 mempunyai rata-rata berat kalus 0,307 gram; 0,267 gram; 0,155 gram; dan 0,127 gram. Sedangkan pada perlakuan K3P1, K3P2, K3P3 dan K3P4 mempunyai rata-rata berat kalus 0,2137 gram; 0,233 gram; 0,133 gram; dan 0,11 gram (Gambar 4.2).



Gambar 4.2: Grafik Berat Eksplan Berkalus Stevia (*Stevia rebaudiana*)

Berdasarkan gambar diatas maka dapat dikatakan bahwa berat eksplan berkalus yang lebih tinggi yaitu eksplan yang di tanam pada media K2P1 (2 mg/L 2,4-D + 0 mg/L PEG 6000) dengan rata-rata berat kalus 0,307 gram, dan berat kalus yang rendah yaitu pada media K1P3 (1 mg/L 2,4-D + 15 mg/L PEG 6000) dengan rata-rata berat kalus 0,1 gram.

Menurut Ruswaningsih dalam Indah (2013), bahwa berat segar secara fisiologis terdiri dari dua kandungan yaitu air dan karbohidrat. Berat segar kalus yang besar ini disebabkan karena kandungan airnya yang tinggi. Berat basah yang dihasilkan sangat tergantung pada kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus.

Berdasarkan penelitian Pristanto (2013) pada tanaman *Helianthus annuus* yang dilakukan selama 6 minggu didapatkan hasil bahwa rerata berat basah kalus pada akhir pengamatan dari tahap perlakuan dengan menggunakan PEG 6000. Dapat dijelaskan bahwa adanya perbedaan berat basah kalus pada tiap perlakuan termasuk kontrol. Pada konsentrasi 0 (kontrol) tanpa perlakuan dengan menggunakan PEG nilai rerata berat basah kalus sebesar 1,2632 g, PEG 5g/ 100 mL rerata nilai berat basah kalus sebesar 0,9726 g, PEG 10 g/ 100mL rerata nilai berat basah kalus sebesar 0,9307 g, PEG 15 g/ 100 mL rerata nilai berat basah kalus sebesar 0,5373 g, dan PEG 20 g/ 100 mL rerata nilai berat basah kalus sebesar 0,4269 g. Melihat nilai masing-masing perlakuan tersebut maka dapat diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi PEG maka nilai rerata berat basah kalus akan semakin kecil.

4.1.4. Morfologi Kalus Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.)

Indikator pertumbuhan eksplan pada kultur *in vitro* berupa warna dan tekstur kalus menggambarkan penampilan *visual* kalus sehingga dapat diketahui kalus yang masih memiliki sel-sel yang aktif membelah atau telah mati. Jaringan kalus yang dihasilkan dari suatu eksplan biasanya memunculkan warna yang berbeda-beda. Kualitas kalus yang baik sebagai penghasil senyawa metabolit sekunder yaitu mempunyai ciri-ciri warna dan tekstur yang sesuai dengan metabolit sekunder yang diinginkan.

4.1.4.1. Warna Kalus

Berdasarkan pengamatan selama 4 minggu didapatkan hasil bahwa ekplan daun yang ditanam pada media 2,4-D dan PEG 6000 memberikan hasil warna yang bervariasi (tabel 4.3).

Tabel 4.3: Perubahan warna kalus pada minggu ke-2 dan ke-8

No	Perlakuan	Warna Kalus	
		Minggu ke-2	Minggu ke-4
1	K1P1	H	HK
2	K1P2	-	HK
3	K1P3	-	HK
4	K1P4	HK	KK
5	K2P1	H	HK
6	K2P2	HK	KK
7	K2P3	-	C
8	K2P4	HK	C
9	K3P1	H	HK
10	K3P2	-	C
11	K3P3	HK	C
12	K3P4	HK	C

Keterangan: H: Hijau

HK: Hijau Kekuningan

KK: Kuning Kecoklatan

C: Coklat

Berdasarkan tabel 4.3 bahwasannya eksplan pada perlakuan K1P1, K2P1, dan K3P1 menghasilkan kalus yang berwarna hijau ketika kalus berumur 2 minggu. Perubahan warna kalus yang terjadi setelah kalus berumur 4 minggu adalah hijau kekuningan (Gambar 4.3 A, E, I). Kalus yang berwarna hijau diduga kalus tersebut mengandung klorofil, menurut Mulyani (2006) dalam Desriyatin (2013), plastid yang mengandung pigmen klorofil adalah kloroplas.

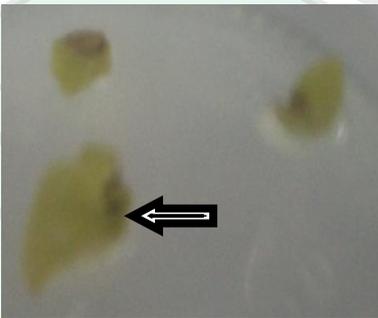
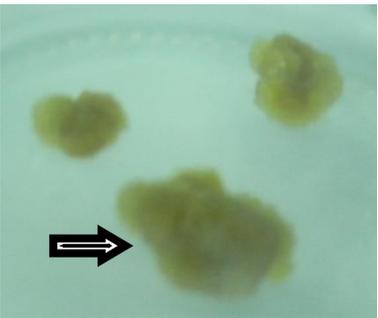
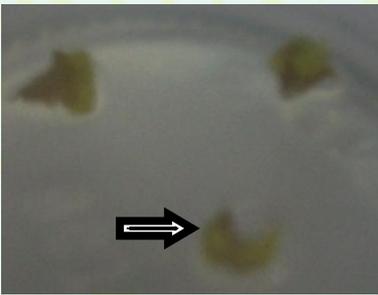
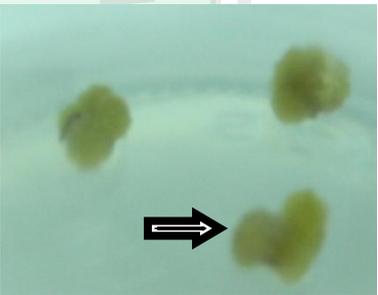
Menurut Lestari (2013) melaporkan warna hijau disebabkan kalus mengandung klorofil, akibat interaksi ZPT yang berperan dalam pembentukan klorofil pada kalus serta faktor lingkungan yaitu paparan cahaya lampu. George & Sherrington (1993) menyatakan, cahaya putih dapat merangsang pembentukan kalus dan organogenesis kultur jaringan tumbuhan.

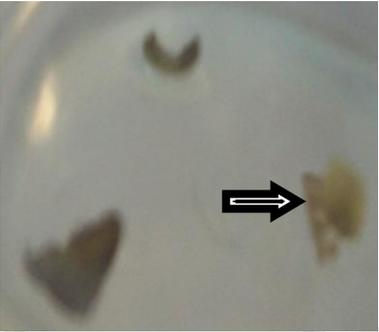
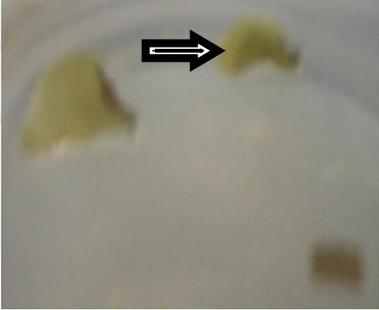
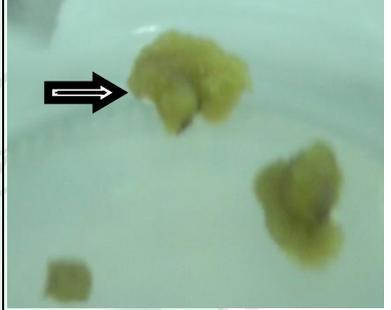
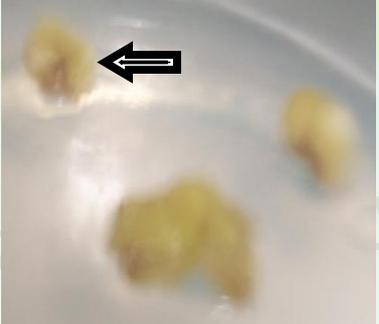
Ekplan yang ditanam pada media K1P4, dan K2P2 menghasilkan warna hijau kekuningan setelah ekplan berumur 2 minggu, dan setelah eksplan berumur 4 minggu perubahan warna kalus menjadi kuning kecoklatan (Gambar 4.3 D, F). Warna kalus hijau kekuningan ini diduga karena sel-sel pada kalus mengalami proliferasi. Hal ini sesuai dengan Leupin (2000) menyatakan perubahan warna kalus menjadi kehijauan disebabkan mulai terbentuk klorofil, semakin lama warna kalus menjadi hijau kekuningan atau keputihan disebabkan terjadinya proliferasi sel.

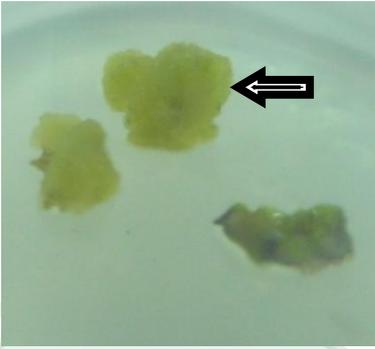
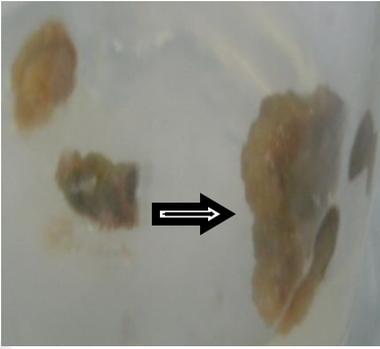
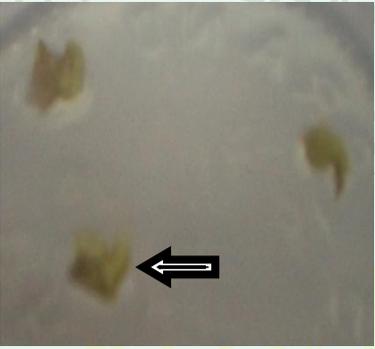
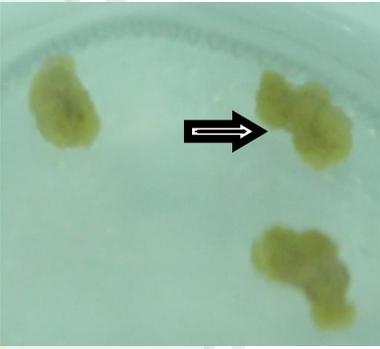
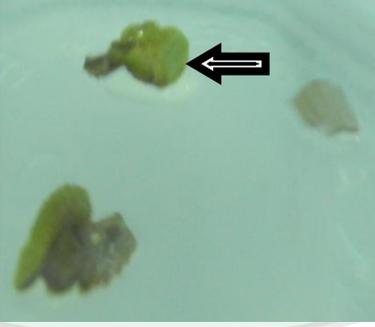
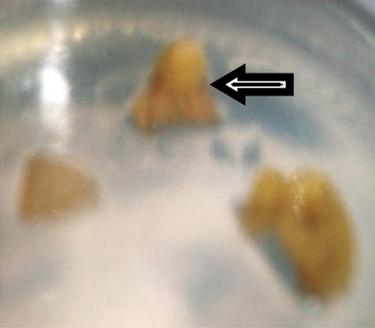
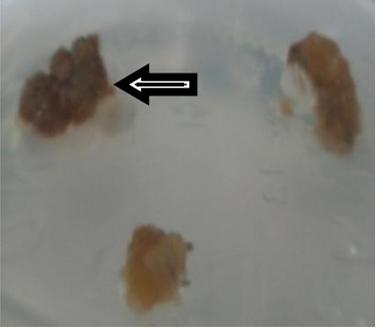
Ekplan yang ditanam pada media K2P4, K3P3, dan media K3P4 menghasilkan warna hijau kekuningan ketika berumur 2 minggu dan mengalami perubahan pada minggu ke 4 menjadi coklat (Gambar 4.3 H, K, L). Kalus yang berwarna coklat diduga karena adanya reaksi oksidatif akibat pelukaan ataupun karena kalus merasa tercekam. Warna kecoklatan pada kalus (*browning*) ini akibat adanya metabolisme senyawa fenol bersifat berlebihan, yang sering terangsang akibat proses sterilisasi eksplan (Andaryani, 2010). Peristiwa pencoklatan tersebut sesungguhnya merupakan suatu peristiwa alamiah dan proses perubahan adaptif bagian tanaman akibat adanya pengaruh fisik seperti pengupasan, dan pemotongan. Gejala pencoklatan merupakan tanda-tanda terjadinya kemunduran fisiologis eksplan (Syahid, 2010 dalam Indah, 2013). Namun dari hasil pengamatan eksplan *Stevia rebaudiana* Bert. memiliki daya tahan terhadap *browning* yang tinggi, dapat terlihat dari kalus yang terus berkembang walaupun eksplan berwarna coklat. Hal ini dikarenakan kalus dari daun *Stevia rebaudiana* Bert. mempunyai kandungan metabolit sekunder yang dimilikinya, khususnya senyawa *steviosida*.

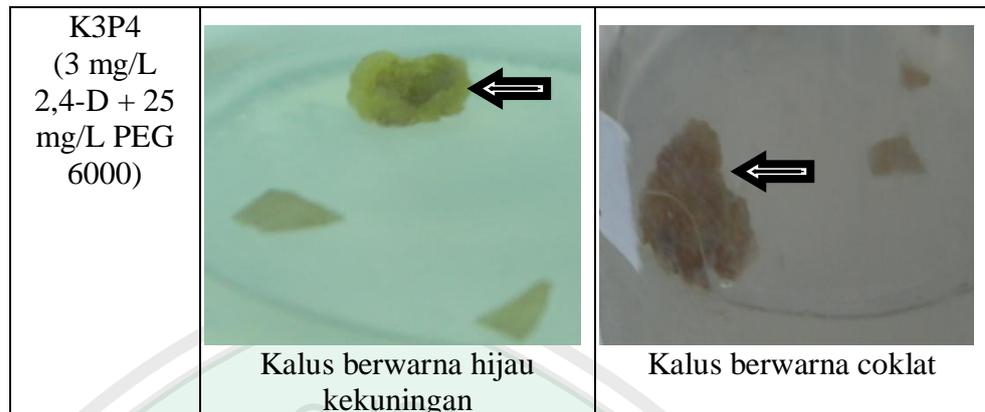
Ekplan daun yang ditanam pada media K1P2, dan media K1P3 pada umur eksplan 2 minggu kalus masih belum terlihat, hanya nampak menggulung dan mengalami pengembangan. Ketika eksplan berumur 4 minggu kalus menghasilkan warna hijau kekuningan (Gambar 4.3 B, C), sedangkan pada media K2P3, dan media K3P2 kalus berubah

warna menjadi coklat (Gambar 4.3 G, J). Berikut merupakan gambar perubahan warna kalus dari minggu ke-2 hingga minggu ke-4 (Gambar 4.3):

Konsentrasi	2 Minggu	4 Minggu
K1P1 (1 mg/L 2,4-D + 0 mg/L PEG 6000)	 Kalus berwarna hijau	 Kalus berwarna hijau kekuningan
K1P2 (1 mg/L 2,4-D + 5 mg/L PEG 6000)	 Belum terbentuk kalus	 Kalus berwarna hijau kekuningan
K1P3 (1 mg/L 2,4-D + 15 mg/L PEG 6000)	 Belum terbentuk kalus	 Kalus berwarna hijau kekuningan

<p>K1P4 (1 mg/L 2,4-D + 25 mg/L PEG 6000)</p>	 <p>Kalus berwarna hijau kekuningan</p>	 <p>Kalus berwarna kuning kecoklatan</p>
<p>K2P1 (2 mg/L 2,4-D + 0 mg/L PEG 6000)</p>	 <p>Kalus berwarna hijau</p>	 <p>Kalus berwarna hijau kekuningan</p>
<p>K2P2 (2 mg/L 2,4-D + 5 mg/L PEG 6000)</p>	 <p>Kalus berwarna hijau kekuningan</p>	 <p>Kalus berwarna kuning kecoklatan</p>
<p>K2P3 (2 mg/L 2,4-D + 15 mg/L PEG 6000)</p>	 <p>Belum terbentuk kalus</p>	 <p>Kalus berwarna coklat</p>

<p>K2P4 (2 mg/L 2,4-D + 25 mg/L PEG 6000)</p>	 <p>Kalus berwarna hijau kekuningan</p>	 <p>Kalus berwarna coklat</p>
<p>K3P1 (3 mg/L 2,4-D + 0 mg/L PEG 6000)</p>	 <p>Kalus berwarna hijau</p>	 <p>Kalus berwarna hijau kekuningan</p>
<p>K3P2 (3 mg/L 2,4-D + 5 mg/L PEG 6000)</p>	 <p>Belum terbentuk kalus</p>	 <p>Kalus berwarna coklat</p>
<p>K3P3 (3 mg/L 2,4-D + 15 mg/L PEG 6000)</p>	 <p>Kalus berwarna hijau kekuningan</p>	 <p>Kalus berwarna coklat</p>



Gambar 4.3: Perubahan warna kalus dari pengamatan 2 minggu setelah tanam sampai dengan 4 minggu setelah tanam

Gati dan Mariska (1992) dalam Manurung (2007) menyatakan bahwa 2,4-D merupakan ZPT yang paling sering digunakan pada kultur kalus karena aktivitasnya yang kuat untuk memacu proses dediferensiasi sel, menekan organogenesis serta menjaga pertumbuhan kalus. Dan jika dibandingkan dengan auksin lainnya seperti IAA, 2,4-D menunjukkan aktivitas yang lebih kuat.

Penelitian Janarthanam (2010) tentang kultur kalus untuk biosintesis steviosida menggunakan eksplan daun stevia yang menggunakan medium MS dengan penambahan 2,4-D, NAA yang dikombinasikan dengan BA menghasilkan kalus berwarna hijau kekuningan dengan struktur kalus kompak dan keras. Sedangkan pada penelitian ini warna kalus yang dominan adalah coklat, warna coklat ini diperoleh karena adanya penambahan zat kimia berupa PEG 6000 sebagai osmotikum pada media induksi kalus. Berdasarkan analisis HPLC untuk uji kadar steviosida yang tertinggi didapatkan pada kalus berwarna coklat.

Perubahan warna kalus menjadi kecoklatan atau coklat menunjukkan terjadinya senyawa fenolik. Menurut Naz (2008) fenol yang teroksidasi akan membentuk kuinon dan kuinon adalah senyawa yang menyebabkan warna coklat pada kultur kalus. Intensitas warna coklat berkorelasi positif dengan hiperaktivitas enzim oksidatif. Peningkatan enzim tersebut terkait dengan reaksi pertahanan jaringan dari stres oksidatif. Menurut Matheka *et al.*, (2008) dalam Zulhimi (2012) pada kalus gantang untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder dengan PEG, menyatakan bahwa pencoklatan eksplan merupakan efek dari hilangnya air akibat sel mengalami cekaman osmotik.

Menurut Ariningsih (2003) perubahan warna pada kalus juga tergantung pada media perkembangannya. Cekaman yang diberikan oleh media pada kalus mengindikasikan kalus akan berubah warna lebih tua dari kalus segar. Dengan demikian semakin tua perubahan warna kalus pada suatu media menunjukkan adanya aktifitas biosintesis metabolit sekunder lebih tinggi dan lebih besar.

Menurut Hendaryono (1994) menyatakan bahwa warna kalus yang bervariasi disebabkan oleh adanya pigmentasi, pengaruh cahaya dan bagian tanaman yang dijadikan sebagai sumber eksplan. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini, dimana awal terbentuknya kalus berwarna hijau atau hijau kekuningan yang lama kelamaan berubah menjadi kuning kecoklatan atau coklat yang disebabkan oleh cekaman

osmosis dari PEG 6000 dalam media tumbuh. Berdasarkan penelitian Zuhilmi (2012) pada kalus gantang didapatkan hasil dari segi warna, kalus yang diberi perlakuan PEG 0-3% berwarna kuning kecoklatan pada bagian bawah dan putih pada bagian atas. Bagian putih menunjukkan sel-sel yang baru terbentuk. Sedangkan kalus yang diberi perlakuan PEG 4-5% berwarna coklat.

4.1.4.2. Tekstur Kalus

Tekstur kalus merupakan salah satu indikator yang digunakan untuk menilai kualitas suatu kalus. Menurut Abidin (1990) 2,4-D (Auksin) memberikan pengaruh terhadap perkembangan sel karena auksin dapat menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan permeabilitas sel, meningkatkan sintesis protein, meningkatkan plastisitas dan pengembangan dinding sel, oleh karena itu kalus yang kompak mengandung banyak air karena belum mengalami lignifikasi dinding sel.

Ekplan yang di tanam dalam berbagai konsentrasi 2,4-D dan PEG 6000 setelah berumur 4 minggu semua dapat membentuk kalus dengan tekstur yang kompak (Gambar 4.4). Kalus bertekstur kompak yang terbentuk ini dikarenakan adanya cekaman dari PEG 6000, dimana kalus yang mengalami cekaman osmosis akan bertekstur kompak akibat dari senyawa metabolit sekunder yang dikeluarkan tanaman tersebut sebagai bentuk perlindungan diri. Dibawah ini

merupakan tabel tekstur kalus yang telah berumur 4 minggu (Tabel 4.4).

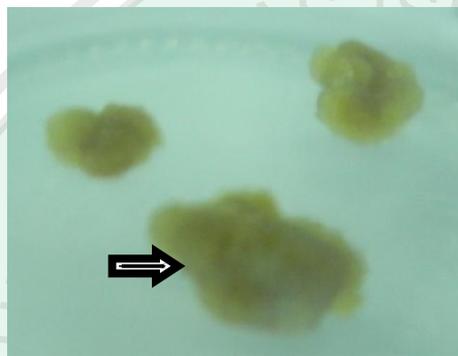
Tabel 4.4: Tekstur Kalus yang Terbentuk Setelah berumur 4 Minggu

No	Perlakuan	Tekstur kalus
1	K1P1	Kompak
2	K1P2	Kompak
3	K1P3	Kompak
4	K1P4	Kompak
5	K2P1	Kompak
6	K2P2	Kompak
7	K2P3	Kompak
8	K2P4	Kompak
9	K3P1	Kompak
10	K3P2	Kompak
11	K3P3	Kompak
12	K3P4	Kompak

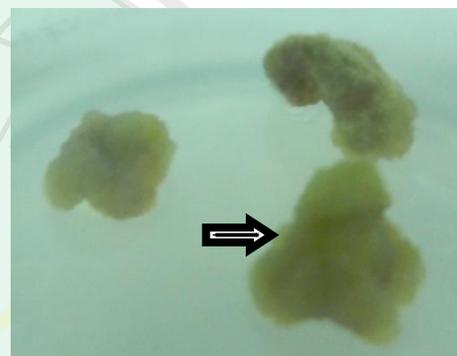
Keterangan: K : Kompak

Tekstur kalus merupakan salah satu penanda yang dipergunakan untuk menilai pertumbuhan suatu kalus. Kalus yang baik untuk digunakan sebagai bahan penghasil metabolit sekunder yaitu memiliki tekstur kompak (*non friable*). Tekstur kalus yang kompak dianggap baik karena dapat mengakumulasi metabolit sekunder lebih banyak. Menurut Aisyah (2007) yang mengatakan bahwa kalus akan menghasilkan senyawa metabolit sekunder ketika sel-sel kalus mengalami penurunan aktifitas pembelahan dan penurunan sel. Tekstur kalus yang kompak merupakan tekstur kalus yang mengalami pembelahan menuju fase stasioner sehingga kalus yang kompak cenderung mengalami pertumbuhan yang lambat jika dibandingkan

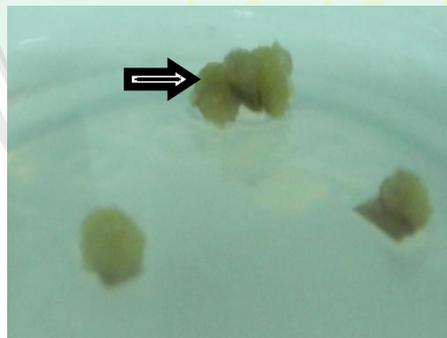
dengan kalus remah yang memiliki sel-sel yang memiliki daya untuk proliferasi atau melakukan pembelahan sel lebih cepat. Sehingga pada kalus kompak dapat dihasilkan produksi metabolit sekunder lebih tinggi dari pada kalus remah, dan kalus remah merupakan kalus yang baik untuk upaya dilakukannya subkultur dalam perbanyak tanaman.



K1P1
(1 mg/L 2,4-D + 0 mg/L
PEG 6000)



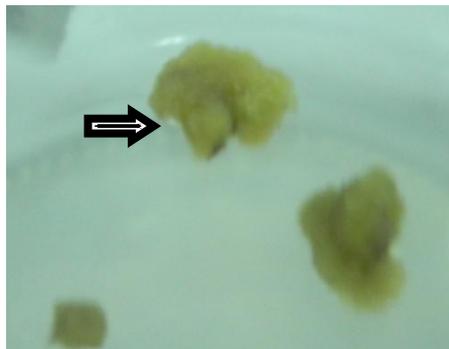
K1P2
(1 mg/L 2,4-D + 5 mg/L
PEG 6000)



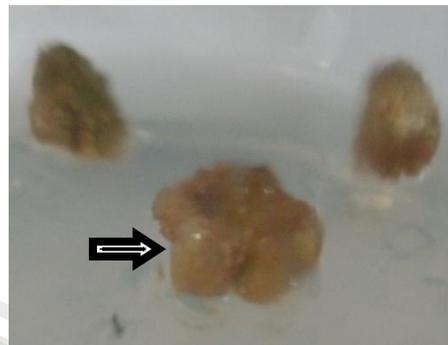
K1P3
(1 mg/L 2,4-D + 15 mg/L
PEG 6000)



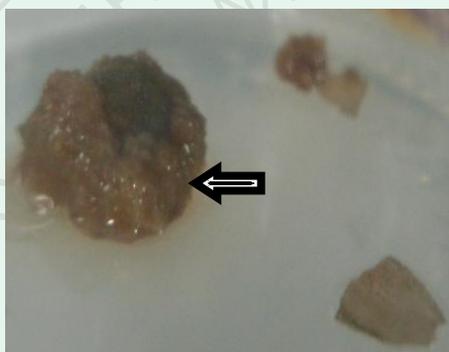
K1P4
(1 mg/L 2,4-D + 25 mg/L
PEG 6000)



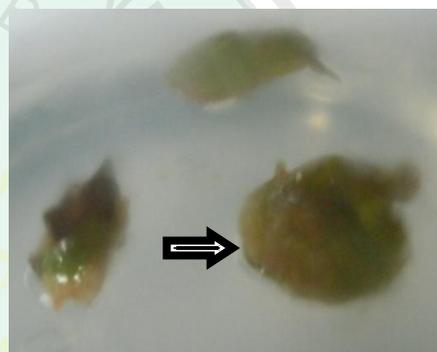
K2P1
(2 mg/L 2,4-D + 0 mg/L
PEG 6000)



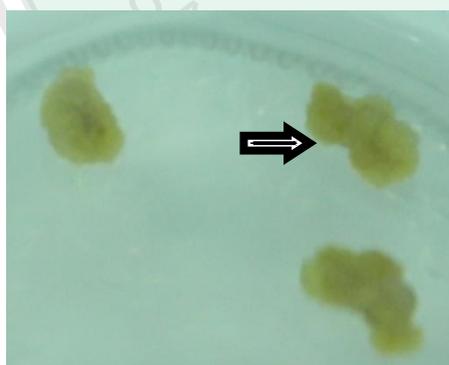
K2P2
(2 mg/L 2,4-D + 5 mg/L
PEG 6000)



K2P3
(2 mg/L 2,4-D + 15 mg/L
PEG 6000)



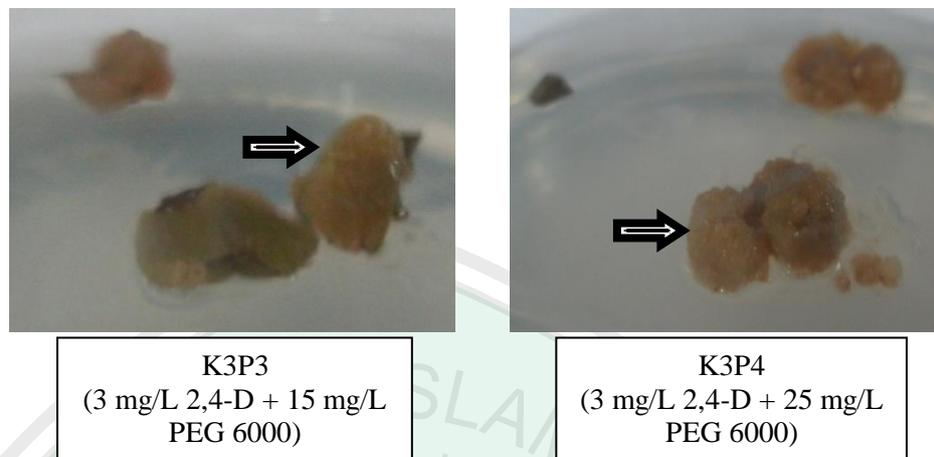
K2P4
(2 mg/L 2,4-D + 25 mg/L
PEG 6000)



K3P1
(3 mg/L 2,4-D + 0 mg/L
PEG 6000)



K3P2
(3 mg/L 2,4-D + 5 mg/L
PEG 6000)



Gambar 4.3: Tekstur Kalus pada Pengamatan 4 Minggu Setelah Tanam pada Beberapa Perlakuan

4.2. Pengaruh Konsentrasi 2,4-D dan PEG 6000 terhadap Kadar Steviosida Kalus Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.)

Metabolit sekunder adalah salah satu tujuan dalam teknik kultur jaringan tanaman, dimana diharapkan dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder lebih tinggi dari pada yang diperoleh secara langsung dari alam. Dalam hal ini terdapat suatu cara yang dinamakan elisitasi untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder. Dimana menurut Mattel dan Smith (1993) dalam Pandiangan (2011), agar produksi metabolit sekunder tinggi maka perlu optimasi faktor-faktor internal dan eksternal. Optimasi faktor tersebut dapat dilakukan dalam dua tahap yaitu tahap pertumbuhan dan tahap produksi. Pada tahap pertumbuhan, kondisi kultur diarahkan untuk memproduksi biomassa sel dalam waktu dekat, sedangkan tahap produksi dilakukan pemindahan biomassa sel ke dalam

medium produksi dengan tujuan pengkondisian kultur untuk produksi metabolit sekunder.

Berdasarkan keterangan tersebut, penelitian ini untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder menggunakan metode cekaman abiotik (osmotikum) yang mengakibatkan kalus mengalami stres abiotik dengan PEG 6000 yang ditambahkan pada media MS induksi kalus stevia. Dalam hal ini, untuk mengetahui pengaruh konsentrasi 2,4-D dan PEG 6000 terhadap kandungan metabolit sekunder steviosida kalus stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) dilakukan dengan menggunakan metode HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Adapun hasil analisa Kandungan Metabolit Sekunder pada Kalus stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) dengan penambahan 2,4-D dan PEG 6000 dapat dilihat pada tabel dibawah ini (Tabel 4.5):

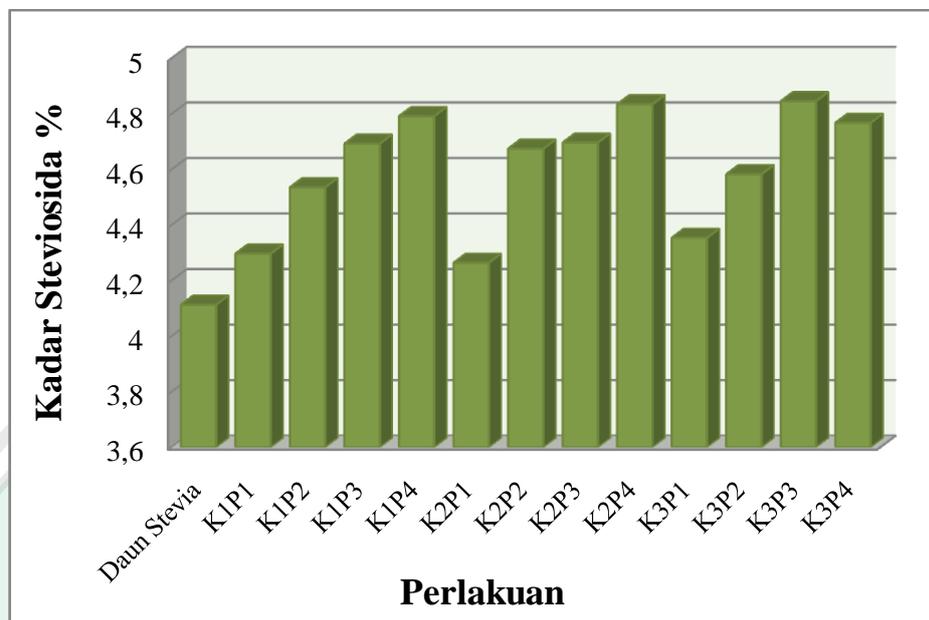
Tabel 4.5: Kadar Steviosida pada kalus (*Stevia rebaudiana* Bert.) setelah Pengamatan Selama 4 Minggu

No	Perlakuan	Kadar steviosida pada kalus (<i>Stevia rebaudiana</i> Bert.)	Berat Sample
1	Daun Stevia	4,113 mg/g	0,5 g
2	K1P1	4,297 mg/g	0,2 g
3	K1P2	4,536 mg/g	0,2 g
4	K1P3	4,693 mg/g	0,2 g
5	K1P4	4,792 mg/g	0,2 g
6	K2P1	4,264 mg/g	0,2 g
7	K2P2	4,675 mg/g	0,2 g
8	K2P3	4,697 mg/g	0,2 g
9	K2P4	4,835 mg/g	0,2 g
10	K3P1	4,354 mg/g	0,2 g
11	K3P2	4,583 mg/g	0,2 g
12	K3P3	4,846 mg/g	0,2 g
13	K3P4	4,768 mg/g	0,2 g

Data yang diperoleh pada tabel 4.5 diatas memperlihatkan bahwa pemberian ZPT 2,4-D dan PEG 6000 ke dalam media tumbuh kalus dapat meningkatkan konsentrasi metabolit sekunder secara umum. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian PEG 6000 menyebabkan kalus mengalami stress sehingga memacu pembentukan metabolit sekunder. Menurut Rahayu (2005) dalam Zuhilmi (2012) kehadiran PEG pada medium dapat menurunkan potensial osmotik larutan sehingga ketersediaan air bagi tanaman akan berkurang. Berkurangnya ketersediaan air bagi tanaman ini mengganggu berbagai proses metabolisme.

Berdasarkan hasil penelitian terbukti bahwa dengan metode teknik kultur jaringan mampu meningkatkan kandungan metabolit sekunder steviosida pada kalus stevia, dimana berdasarkan hasil uji HPLC (Tabel 4.5) kandungan steviosida pada daun stevia (0,5 g) didapatkan hasil 4,113 mg/g, sedangkan kandungan steviosida kalus (0,2 g) pada media yang perlakuan kultur kalus didapatkan kisaran 4,297 mg/g hingga 4,846 mg/g.

Menurut penelitian Shirwaikar (2011) dari hasil uji HPLC dengan menggunakan sampel bubuk stevia (5 mg/ml) dan ekstrak daun stevia (5 mg/ml) ditemukan kandungan steviosida ditemukan 8,859 % dan 3,703 %. Sedangkan menurut Madan (2010) menyatakan bahwa dalam daun stevia terkandung steviosida (6-18 % bobot segar dalam daun) yang merupakan glikosida manis dan telah diuji tingkat kemanisannya 300 kali lebih manis dari sukrosa. Dibawah ini merupakan grafik kadar steviosida:



Gambar 4.4: Grafik kadar steviosida pada kalus *Stevia rebaudiana*

Berdasarkan grafik kadar steviosida pada kalus *Stevia rebaudiana* Bert. (Gambar 4.4) dapat diketahui bahwa kandungan metabolit sekunder steviosida pada kalus stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) yang lebih tinggi dihasilkan oleh perlakuan K3P3 (3 mg/L 2,4-D + 15 mg/L PEG 6000) yaitu sebesar 4,846 mg/g, dan K2P4 (2 mg/L 2,4-D + 25 mg/L PEG 6000) yaitu sebesar 4,835 mg/g, tetapi jika dilihat dari perlakuan K1P4 (1 mg/L 2,4-D + 25 mg/L PEG 6000) di dapatkan hasil yang tidak berbeda jauh yaitu 4,792 mg/g, sehingga penggunaan konsentrasi 2,4-D dan PEG 6000 yang lebih efisien didapatkan pada perlakuan K1P4 (1 mg/L 2,4-D + 25 mg/L PEG 6000), hal ini didasarkan pada penggunaan dari 2,4-D mengingat harga 2,4-D lebih mahal dari pada PEG 6000. Sedangkan kandungan metabolit sekunder steviosida yang terendah didapatkan dari

perlakuan K2P1 (2 mg/L 2,4-D + 0 mg/L PEG 6000) yaitu sebesar 4,264 mg/g. Maka berdasarkan gambar 4.4 dapat diamati bahwa kandungan steviosida meningkat seiring dengan peningkatan 2,4-D yang dikombinasikan dengan PEG 6000 dan menunjukkan kandungan steviosida yang lebih rendah seiring dengan rendahnya konsentrasi 2,4-D tanpa PEG 6000.

PEG merupakan kimia organik yang digunakan sebagai osmotikum dan menyebabkan stres air pada tanaman. Senyawa kimia tersebut mempunyai sifat tidak aktif, tidak bermuatan ion, kelarutan dalam air tinggi walaupun mempunyai cincin rantai tinggi lebih dari 4000 dapat menginduksi stres air pada tanaman dengan menurunkan potensial larutan nutrien, polietilen glikol tidak terserap dan tidak mengakibatkan keracunan pada tanaman (Dami dan Hughes, 1997).

Penggunaan PEG 6000 dalam jangka panjang pada tanaman relatif aman, karena PEG 6000 tidak dapat masuk ke dalam jaringan tanaman atau dinding selulosa. Senyawa PEG dengan berat molekul 6000 dipilih karena mampu bekerja lebih baik pada tanaman daripada PEG dengan berat molekul yang lebih rendah dan yang lebih tinggi. PEG di bawah 6000 diduga kurang efektif karena kemampuan dalam mengikat air terlalu kecil. Besarnya kemampuan larutan PEG dalam mengikat air bergantung pada berat molekul dan konsentrasinya, akan tetapi PEG dengan berat molekul lebih tinggi dari 6000 akan mengikat air yang terlalu besar sehingga tanaman semakin sulit menyerap air mengakibatkan stres

osmosis yang berlebihan dan tanaman bisa mati. 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). Sehingga diharapkan dengan terikatnya molekul air dalam media oleh PEG 6000 ketersediaan air untuk diserap kalus stevia semakin sedikit. PEG juga bersifat tidak toksik dan dengan berat molekul yang besar, yaitu 6000 g/mol, maka PEG 6000 tidak akan mudah melakukan penetrasi ke dalam jaringan tanaman.

Secara garis besar diduga bahwa PEG 6000 akan mengaktifkan signal yang berfungsi menginduksi gen-gen yang berperan dalam produksi senyawa steviosida yang terjadi melalui jalur biosintesis yaitu jalur asam mevalonat (Gambar 2.3). Menurut Sulastri (2010) dalam penelitiannya pada kalus alfalfa menuliskan bahwa tanaman memiliki respon yang berbeda untuk beradaptasi pada kondisi stress osmotik. Mekanisme ini salah satunya dikendalikan oleh osmoregulator. Hal ini mungkin terjadi pada kalus yang ditumbuhkan pada media dengan penambahan PEG. Pada beberapa tanaman ditemukan glycine betain dan prolin sebagai osmoprotektan. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa molekul-molekul terakumulasi dalam sel tanaman selama mengalami kondisi stres osmotik akan mencegah kerusakan sel karena dehidrasi

seluler dengan menjaga keseimbangan tekanan osmotik dalam sitoplasma dan lingkungan.

Pemberian PEG akan mempengaruhi penyerapan air sehingga kalus mengalami stres. Kekurangan air menurunkan tekanan turgor pada dinding sel. Kehilangan tekanan turgor pada sel yang dikulturkan di medium perlakuan diindikasikan pula sebagai *signal* bagi membran plasma untuk mengaktifkan protein tertentu yang mendorong sintesis ABA (Asam absisat). Keberadaan ABA pada akhirnya akan merangsang terbentuknya protein yang berperan sebagai mekanisme toleransi terhadap cekaman kekeringan (protein osmoprotektan) (Hartanti, 2013). Protein osmoprotektan dapat berinteraksi dengan reseptor sistem membran plasma (Konstantinova, 2002 dalam Hardiawan, 2013) menyebabkan peningkatan Ca^{2+} interseluler yang bertindak sebagai *second messenger* untuk menginduksi transkripsi dan translasi enzim-enzim yang terlibat dalam jalur metabolit sekunder (Dmitrev, 1996 dan Silalahi, 1999).

Penambahan zat kimia (PEG 6000) sebagai osmotikum mampu meningkatkan aktivitas enzim yang berperan dalam biosintesis (Mathius, 2006). 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 pula. Diduga enzim yang dapat memacu pembentukan senyawa terpenoid antara lain adalah enzim

asetil CoA asetiltransferase, HMG-CoA reeduktase, enzim mevalonat kinase dan enzim fosfomevalonat kinase (gambar 2.3). Enzim lain yang berperan dalam memacu pembentukan senyawa terpenoid khususnya steviosida adalah CPP synthase, kaurene sintase, ent kaurene oxidase, ent-Kaurenoic Acid 13-Hydroxylase (gambar 2.3).

Menurut Larcher dalam Salisbury dan Ross (1995), tumbuhan yang mulai mendapatkan faktor cekaman mengalami reaksi tanda bahaya yang ditandai dengan mulai terganggunya fungsi fisiologis dari biasanya. Kemudian berlangsung tahap resistensi yaitu organisme beradaptasi pada faktor cekaman. Tahap selanjutnya akan terjadi kematian jika faktor cekaman meningkat atau terus berlangsung.

Meningkatnya kandungan steviosida selain dipengaruhi oleh PEG 6000, juga dipengaruhi oleh ZPT dalam hal ini adalah 2,4-D. Menurut Salisbury dan Ross (1995) dijelaskan bahwa zat pengatur tumbuh (2,4-D) terikat pada membran protein penerima di membran plasma sel. Kompleks ikatan ini mengaktifkan enzim fosfolipase C (PLC). Enzim PLC ini menghidrolisis fosfatidil inositol 4,5-bifosfat (P_1P_2) menghasilkan inositol 1,4,5-trifosfat (IP_3) dan diasil gliserol (DAG). IP_3 bergerak menuju vakuola sehingga menyebabkan terlepasnya Ca^{2+} simpanan masuk ke dalam sitosol. Meningkatnya konsentrasi Ca^{2+} di sitosol menyebabkan empat buah Ca^{2+} bergabung membentuk kompleks dengan kalmodulin tidak aktif menjadi kalmodulin aktif, hal ini mengaktifkan beberapa enzim yang berperan dalam sintesis saponin seperti enzim kinase. Skualen sintase

dan enzim NADH⁺ kinase. Sedangkan DAG yang tidak larut dalam air berfungsi dalam membran plasma. DAG mengaktifkan enzim pada membran yaitu protein kinase C (PKC). Enzim ini menggunakan ATP untuk memfosforilasi beberapa enzim tertentu yang mengatur pada tahap-tahap metabolisme.

Berdasarkan penelitian kadar steviosida kalus stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) dilakukan dengan menggunakan metode HPLC (High Performance Liquid Chromatography) maka dapat disimpulkan bahwa pemberian konsentrasi ZPT 2,4-D yang lebih rendah tanpa adanya kombinasi dengan PEG 6000 menunjukkan hasil metabolit sekunder steviosida yang rendah, tetapi seiring dengan pemberian peningkatan konsentrasi ZPT 2,4-D yang dikombinasikan dengan PEG 6000 dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder steviosida dari induksi kalus stevia (*Stevia rebaudiana*).

Perlu diingat juga, pemberian konsentrasi PEG 6000 yang terlalu tinggi pada kalus menyebabkan kalus sulit menyerap air mengakibatkan stres osmosis yang berlebihan dan tanaman bisa mati. Dimana Kemampuan kalus dapat bertahan hidup pada media selektif PEG tergantung dari konsentrasi PEG, jenis tanaman dan lamanya kalus mengalami tekanan seleksi dalam media yang diberi cekaman osmosis.

4.3. Manfaat Stevia Perspektif Islam

Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) merupakan salah satu dari sekian banyak tanaman yang dapat ditumbuhkan secara vegetatif, yaitu dengan teknik kultur jaringan. Teknik kultur jaringan merupakan suatu metode yang dilakukan untuk menumbuhkan suatu tanaman dengan mengambil sebagian dari bagian tanaman seperti daun, akar, atau batang agar terbentuk individu baru yang di tanam dalam media buatan yang steril. Setiap tanaman memiliki syarat atau kriteria tertentu agar tanaman tersebut dapat tumbuh dengan baik dan subur pada suatu media kultur tanam. Dalam firman Allah SWT di jelaskan dalam surat Al-A'raaf ayat 58:

وَالْبَلَدُ الطَّيِّبُ يَخْرُجُ نَبَاتُهُ بِإِذْنِ رَبِّهِ ۗ وَالَّذِي خَبثَ لَا يَخْرُجُ إِلَّا نَكْدًا ۗ كَذَٰلِكَ نُصَرِّفُ الْآيَاتِ لِقَوْمٍ يَشْكُرُونَ ﴿٥٨﴾

Artinya:

“Dan tanah yang baik, tanaman-tanamannya tumbuh subur dengan seizin Allah; dan tanah yang tidak subur, tanaman-tanamannya hanya tumbuh merana. Demikianlah Kami mengulangi tanda-tanda kebesaran (Kami) bagi orang-orang yang bersyukur” (QS. -A'raaf ayat 58).

Ayat tersebut menjelaskan bahwa segala macam tumbuhan dapat tumbuh baik apabila tanahnya subur (والبلد الطيب), Tanah yang buruk (والذي خبث) yakni tanah yang tidak subur. Allah tidak memberinya potensi untuk menumbuhkan buah yang baik, karena itu tanaman-tanamannya tumbuh merana (إلا نکدا), hasilnya sedikit dan kualitasnya rendah. Tanah tidak subur yaitu tanah yang kurang mempunyai kemampuan

menyediakan semua elemen-elemen esensial bagi tanaman agar dapat berproduksi dengan optimal. Sedangkan dalam kalimat (كَذَلِكَ نَصْرَفُ الْأَيْتِ (لقوم يشكرون) menjelaskan tentang tanda-tanda kebesaran-Nya itu satu demi satu. Tanda-tanda tersebut merupakan perintah kepada manusia untuk mengelola tanah tersebut sehingga nantinya bisa menghasilkan hasil yang melimpah ketika bercocok tanam (Muhammad, 2008).

Sama halnya dalam kultur jaringan, tanah tersebut bagaikan media kultur untuk eksplan. Dimana dalam media kultur harus terdapat unsur-unsur esensial yang diperlukan tanaman, seperti zat pengatur tumbuh, vitamin, unsur mikro-makro, dan lain sebagainya. Jika salah satu tidak terpenuhi berakibat eksplan tidak tumbuh sempurna atau bahkan mati. Keadaan ini berlaku pada perkembangan stevia, dimana tanaman stevia yang ditanam pada semua perlakuan (kombinasi ZPT 2,4-D (1,2, dan 3) + PEG 6000 (0,5,15, dan 25) tumbuh membentuk kalus.

Firman Allah surat At-Thaha ayat 53:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّنْ نَّبَاتٍ شَتَّى ﴿٥٣﴾

Artinya:

“Yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka Kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam” (QS. At-Thaha ayat 53).

Ayat tersebut ditafsirkan dalam tafsir Al-Muyassar bahwa hanya Allah semata yang telah menjadikan bumi terbentang dan terhampar agar dapat dimanfaatkan dan didiami. Dia SWT menjadikan jalan yang mudah untuk dilalui makhluk-makhluk di muka bumi. Dia juga menurunkan hujan dari langit yang dapat menumbuhkan beragam tumbuhan sebagai rezeki manusia dan hewan (Al-Qarni, 2007).

Berdasarkan ayat diatas menunjukkan bahwa kebesaran dan keagungan Allah SWT yang telah menciptakan bumi sebagai tempat hunian manusia, dimana di bumi pula manusia dapat mengembangkan ilmu pengetahuannya untuk meningkatkan kandungan metabolit sekunder yang lebih tinggi pada tanaman yaitu dengan metode kultur jaringan. Dalam ayat tersebut juga dijelaskan bahwa Allah menumbuhkan tumbuhan-tumbuhan yang beraneka ragam. Tumbuhan tersusun dari ribuan sel, nantinya akan membentuk suatu jaringan yang memiliki suatu struktur dan fungsi yang berbeda-beda. Dalam teknik kultur jaringan awalnya hanya sebuah eksplan yang ditanam dalam media kultur, kemudian sel eksplan akan mengalami diferensiasi dan terbentuk kalus, diman kalus dapat dimanfaatkan untuk memperbanyak ataupun untuk metabolit sekunder.

Metabolit sekunder adalah senyawa yang tidak esensial bagi pertumbuhan organisme dan ditemukan dalam bentuk yang unik atau berbeda-beda antar spesies. Senyawa ini tidak selalu dihasilkan, hanya pada saat tertentu saja. Misalnya ketika tumbuhan mengalami cekaman atau gangguan dari mikroorganisme. Hal ini merupakan salah satu manfaat

metabolit skunder bagi tumbuhan itu sendiri. Sedangkan manfaat bagi manusia adalah sebagai bahan pangan maupun digunakan sebagai obat-obatan pada bidang farmasi. Berbagai senyawa metabolit sekunder telah digunakan sebagai bahan pangan. Salah satunya yaitu steviosida yang dihasilkan dari metabolit sekunder tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) yang banyak digunakan sebagai pengganti pemanis sintetis. Tanaman stevia mengandung zat steviosida yang dapat menghasilkan rasa manis sehingga dapat menggantikan gula sintetis. Steviosida merupakan bahan pemanis alami yang tidak berkalori sehingga tidak menaikkan kadar gula dalam darah dan tidak memungkinkan pertumbuhan bakteri dan ragi pada produk pangan yang menggunakan stevia sebagai pemanis.

Steviosida, dapat diperoleh dengan cara mengisolasi dari tanaman stevia yang memiliki 100-300 kali lebih manis dari pada gula. *Stevia rebaudiana* dapat digunakan sebagai obat untuk berbagai macam kondisi seperti kanker, diabetes, obesitas, hipertensi, depresi, dan kelelahan. stevia memiliki beberapa keunggulan diantaranya sebagai pemanis alami, tidak menimbulkan toksik, tidak menyebabkan kecanduan, tidak bersifat karsinogenik, tidak menimbulkan mutagen, bukan teratogenik, dan sama sekali bukan efek genotoksik. Dengan demikian, tidak mempengaruhi tingkatan gula darah sehingga sangat cocok bagi penderita diabetes (Alan, 2002).

Firman Allah dalam surat Al-Insyirah ayat 5-6:

فَإِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا ﴿٥﴾ إِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا ﴿٦﴾

Artinya:

“Karena Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan (Q.S. Al-Insyirah ayat 5-6).

Berdasarkan ayat diatas kata “يسرا” yang artinya mudah (tanpa alif laam) maknanya kemudahan yang tiada terhingga, sementara kata “العسر” yang artinya sulit (dengan alif laam) menunjukkan kesulitannya spesifik ke satu objek. Kata ini diulang sampai dua kali, yang dapat diambil makna bahwa Allah ingin memberi penekanan atau penegasan tentang janji-Nya, bahwa setiap ada kesulitan Allah memberikan kemudahan setelahnya, dan kemudahan yang tiada terhingga. Keadaan tersebut sesuai dengan penelitian ini, dimana kalus yang ditanam pada media yang ditambahkan dengan PEG 6000 mengalami cekaman osmosis hingga kalus sulit untuk menyerap air yang mengakibatkan kalus stress dan tekanan turgornya pun menurun. Tetapi setelah hal itu terjadi kalus mampu menginduksi 2 kali dari metabolit sekundernya (steviosida) untuk mempertahankan hidupnya. Terbentuknya metabolit sekunder inilah yang merupakan kemudahan jalan, atau solusi yang dijanjikan Allah setelah adanya kesulitan.

Allah SWT menciptakan segala sesuatu yang ada di bumi ini tidaklah sia-sia. Oleh karena itu manusia sebagai kholifah di bumi haruslah menjaga serta melestarikan bumi dimana ia huni. Dalm firman Allah SWT surat Huud ayat 61 dijelaskan:

وَإِلَى ثَمُودَ أَخَاهُمْ صَالِحًا قَالَ يَا قَوْمِ اعْبُدُوا اللَّهَ مَا لَكُمْ مِنْ إِلَهٍ غَيْرُهُ هُوَ أَنْشَأَكُمْ
 مِنَ الْأَرْضِ وَأَسْتَعْمَرَكُمْ فِيهَا فَاسْتَغْفِرُوهُ ثُمَّ تَوْبُوا إِلَيْهِ إِنَّ رَبِّي قَرِيبٌ مُجِيبٌ ﴿٦١﴾

Artinya:

“Dan kepada Tsamud (kami utus) saudara mereka shaleh. Shaleh berkata: “Hai kaumku, sembahlah Allah, sekali-kali tidak ada bagimu Tuhan selain Dia. Dia telah menciptakan kamu dari bumi (tanah) dan menjadikan kamu pemakmurny, karena itu mohonlah ampunan-Nya, kemudian bertobatlah kepada-Nya, Sesungguhnya Tuhanku Amat dekat (rahmat-Nya) lagi memperkenankan (doa hamba-Nya)” (QS. Huud ayat 61).

Berdasarkan tafsir Al-Miashbah ayat tersebut mengandung perintah kepada manusia (langsung atau tidak langsung) untuk membangun bumi dalam kedudukannya sebagai kholifah salah satunya dengan menjaga kelestarian tumbuh-tumbuhannya, sekaligus menjadi alasan mengapa manusia harus menyembah Allah SWT semata-mata. Penggalan ayat tersebut bermakna bahwa Allah SWT telah mewujudkan melalui bahan bumi ini, manusia yang Dia sempurnakan dengan mendidiknya tahap demi tahap dan menganugrahkannya fitrah berupa potensi yang menjadikan ia mampu mengolah bumi dengan mengalihkannya kesuatu kondisi dimana ia dapat memanfaatkannya untuk kepentingan hidupnya. Sehingga ia dapat terlepas dari segala macam kebutuhan dan hal lain kecuali kepada Allah SWT. Seperti halnya mencari alternatif penghasil dan meningkatkan kandungan steviosida pada kalus stevia (Shihab, 2002).