

**INDUKSI KALUS STEVIA (*Stevia rebaudiana* Bertoni) DAN PRODUKSI
METABOLIT SEKUNDER STEVIOSIDA MENGGUNAKAN ELISITOR
 Cu^{2+} SECARA IN VITRO**

TESIS

**Oleh:
WASHEILATUS SHOLEHAH
NIM. 230602210006**



**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2025**

**INDUKSI KALUS STEVIA (*Stevia rebaudiana* Bertoni) DAN PRODUKSI METABOLIT
SEKUNDER STEVIOSIDA MENGGUNAKAN ELISITOR Cu^{2+} SECARA IN VITRO**

TESIS

**Oleh:
WASHEILATUS SHOLEHAH
NIM. 230602210006**

**diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Magister Sains (M.Si)**

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2025**

**INDUKSI KALUS STEVIA (*Stevia rebaudiana* Bertoni) DAN PRODUKSI
METABOLIT SEKUNDER STEVIOSIDA MENGGUNAKAN ELISITOR
 Cu^{2+} SECARA IN VITRO**

TESIS

**Oleh:
WASHEILATUS SHOLEHAH
NIM. 230602210006**

**telah diperiksa dan disetujui untuk diuji
tanggal:**

Pembimbing I



Prof. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P

NIP. 19741018 200312 2 002

Pembimbing II

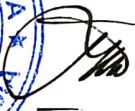


Dr. Muhammad Saefi, M.Pd

NIP. 19920101 202203 1 002



**Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Biologi**



Prof. Dr. Erh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si

NIP. 19710919 2000 03 2 001

**INDUKSI KALUS STEVIA (*Stevia rebaudiana* Bertoni) DAN PRODUKSI
METABOLIT SEKUNDER STEVIOSIDA MENGGUNAKAN ELISITOR
 Cu^{2+} SECARA IN VITRO**

TESIS

Oleh:
WASHEILATUS SHOLEHAH
NIM. 230602210006

telah dipertahankan
Di depan Dewan Penguji Tesis dan dinyatakan diterima sebagai salah satu
persyaratan untuk memperoleh gelar Magister Sains (M.Si)
Tanggal

Ketua Penguji	: Dr. H. Sulisetijono, M.Si NIP. 19670125 199103 1 003
Anggota Penguji I	: Dr. Hj. Akyunul Jannah, M.Si NIP. 19750410 200501 2 009
Anggota Penguji II	: Prof. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P NIP. 19741018 200312 2 002
Anggota Penguji III	: Dr. Muhammad Saefi, M.Pd NIP. 19920101 202203 1 002


(.....)

(..)....

(A.S.)



Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Biologi


Prof. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si
NIP. 19710919 2000 03 2 001

MOTTO

وَعَسَىٰ أَنْ تَكْرَهُوا شَيْئًا وَهُوَ خَيْرٌ لَّكُمْ ۚ وَعَسَىٰ أَنْ تُحِبُّوا شَيْئًا وَهُوَ شَرٌّ لَّكُمْ ۗ وَاللَّهُ يَعْلَمُ وَأَنْتُمْ لَا تَعْلَمُونَ ۚ

Artinya: “Boleh jadi kamu membenci sesuatu, padahal itu baik bagimu dan boleh jadi kamu menyukai sesuatu, padahal itu buruk bagimu. Allah mengetahui, sedangkan kamu tidak mengetahui.” (QS. Al-Baqarah [2]:216)

مَا وَدَّعَكَ رَبُّكَ وَمَا قَلَىٰ

Artinya: “Tuhanmu (Nabi Muhammad) tidak meninggalkan dan tidak (pula) membencimu.” (QS. Ad-Duha [93]:3)

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah, dengan rahmat dan ridho Allah SWT tesis ini dipersembahkan kepada seluruh pihak yang telah mendoakan, memotivasi, dan membantu penulis dalam proses penelitian hingga penyusunannya, khususnya kepada:

1. Kedua orang tua penulis, Bapak Ali Akbar dan Almh. Ibu Muzayyadah serta kakak-kakak tercinta, Zainul Arifin Fatahillah, Moh. Nurul Alam, Indah Rahayu Putri, dan Husnul Khotimah yang telah memberikan dukungan, motivasi, serta selalu mendoakan sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini dengan baik.
2. Diri sendiri, Washeilatus Sholehah. Terimakasih untuk tidak pernah menyerah atas segala kesulitan selama masa perkuliahan, penelitian, dan penyusunan tesis berlangsung.
3. Teman baik, Siwi Putri Mumpuni, S.Si dan Safina Oktafia, S.Si yang telah bersedia memberikan afirmasi positif dan membantu penulis selama pelaksanaan penelitian dan penyusunan tesis.
4. Seluruh keluarga besar PP. Imam Ad-DamANHuri, khususnya pada Syafaatur Rahmah, Nita Sari, dan Tsaniyatus Sholihah yang telah bersedia memberikan dukungan serta mendengarkan keluh kesah penulis selama penyusunan tesis.
5. Prof. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P dan Dr. Muhammad Saefi, M.Pd selaku dosen pembimbing yang telah bersedia memberikan arahan dan masukan dalam penyusunan tesis.
6. Seluruh dosen Magister Biologi dan laboran serta staff UIN Maulana Malik Ibrahim yang telah dengan ikhlas membagikan ilmunya dan menyediakan sarana/prasarana yang baik selama penulis menuntut ilmu.
7. Seluruh pihak yang telah mendoakan, memotivasi, mendukung, dan membantu kelancaran penelitian dan penyusunan tesis yang tidak bisa penulis sebutkan namanya satu persatu.

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Washeilatus Sholehah

NIM : 230602210006

Program Studi : Magister Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Induksi Kalus Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Dan
Produksi Metabolit Sekunder Steviosida Menggunakan
Elisitor Cu²⁺ Secara In Vitro

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan, dan/atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan dan/atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan tesis ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 1 Juli 2025



Washeilatus Sholehah
NIM. 230602210006

PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS

Tesis ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan atas seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

Induksi Kalus Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Dan Produksi Metabolit Sekunder Steviosida Menggunakan Elisitor Cu^{2+} Secara In Vitro

Washeilatus Sholehah, Evika Sandi Savitri, Muhammad Saefi

Program Studi Magister Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRAK

Tanaman stevia mengandung senyawa metabolit sekunder steviosida yang memiliki rasa manis 300 kali lebih manis dibandingkan gula tebu dengan kalori yang lebih rendah. Senyawa metabolit sekunder dalam stevia perlu ditingkatkan untuk memenuhi permintaan pasar yang terus meningkat seiring dengan tren permintaan pemanis rendah kalori. Peningkatan steviosida dapat dilakukan dengan pemberian elisitor Cu^{2+} melalui teknik in vitro. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengeksplorasi pengaruh pemberian elisitor ion Cu^{2+} terhadap induksi kalus stevia dan produksi metabolit sekunder steviosida pada tanaman stevia. Teknik in vitro dipilih sebab memiliki keunggulan dalam produksi metabolit sekunder dengan kondisi terkontrol. Ion Cu^{2+} digunakan sebagai elisitor untuk merangsang stres pada tanaman yang dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder pada kalus stevia. Penelitian ini berupa penelitian eksperimental bersifat deskriptif kualitatif dengan perlakuan konsentrasi ion Cu^{2+} menggunakan lima variasi konsentrasi (0, 1, 2, 5, dan 10 mg/L) yang diulang sebanyak lima kali. Parameter penelitian ini meliputi berat basah kalus, tekstur, warna, dan kadar steviosida. Data kuantitatif berupa berat basah kalus dianalisis menggunakan *One way anova*, uji lanjut menggunakan *Duncan Multiple Range Test* dengan taraf signifikansi 5%. Data kualitatif berupa warna, tekstur, dan kadar steviosida dijelaskan secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ion Cu^{2+} berpengaruh terhadap berat basah kalus, warna, dan peningkatan kadar steviosida dengan perlakuan optimal terdapat pada konsentrasi 2 mg/L ion Cu^{2+} yaitu 0,142 g dengan kadar steviosida 639,760 $\mu\text{g/ml}$, 12795,20 $\mu\text{g/ml}$ untuk kadar ekstrak, dan kadar sampel sebesar 12,80%. Ion Cu^{2+} berpengaruh terhadap perubahan warna kalus yang ditandai dengan semakin gelap warna yang dihasilkan seiring dengan peningkatan konsentrasi ion Cu^{2+} . Berdasarkan hasil penelitian maka perlakuan optimal terdapat pada konsentrasi 2 mg/L ion Cu^{2+} untuk berat basah, kualitas, dan peningkatan kadar steviosida.

Kata kunci: kalus stevia, metabolit sekunder steviosida, elisitor ion Cu^{2+} , in vitro

The Induction of Stevia Callus (*Stevia Rebaudiana* Bertoni) and The Production a Secondary Metabolite of Stevioside Using In Vitro Cu²⁺ Elicitor

Washeilatus Sholehah, Evika Sandi Savitri, Muhammad Saefi

Master of Biology Program Study, Faculty of Science and Technology,
The State Islamic University Of Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRACT

Stevia plants contain the secondary metabolite stevioside, which is 300 times sweeter than cane sugar with fewer calories. The secondary metabolites in stevia need to be increased to meet the growing market demand for low-calorie sweeteners. Stevioside production can be increased by applying Cu²⁺ elicitors through in vitro techniques. The objective of this study is to explore the effect of Cu²⁺ ion elicitor application on stevia callus induction and secondary metabolite stevioside production in stevia plants. In vitro techniques were chosen because they offer advantages in secondary metabolite production under controlled conditions. Cu²⁺ ions were used as elicitors to induce stress in plants, which can increase secondary metabolite production in stevia callus. This study is an experimental, descriptive qualitative study with Cu²⁺ ion concentration treatments using five concentration variations (0, 1, 2, 5, and 10 mg/L) repeated five times. The study parameters include fresh weight of callus, texture, colour, and stevioside content. Quantitative data on fresh weight of callus were analysed using one-way ANOVA, followed by *Duncan's Multiple Range Test* at a 5% significance level. Qualitative data on colour, texture, and stevioside content were described descriptively. The results showed that Cu²⁺ ion application influenced the wet weight of the callus, colour, and stevioside content, with the optimal treatment occurring at a Cu²⁺ ion concentration of 2 mg/L, yielding a wet weight of 0.142 g and a stevioside content of 639.760 µg/ml, 12,795.20 µg/ml for the extract content, and a sample content of 12.80%. Cu²⁺ ions influenced changes in callus colour, characterised by increasingly darker colours as Cu²⁺ ion concentration increased. Based on the research results, the optimal treatment was found at a concentration of 2 mg/L Cu²⁺ ions for wet weight, quality, and stevioside content increase.

Keywords: stevia callus, stevioside secondary metabolite, Cu²⁺ ion elicitor, in vitro

تحفيز نمو الكالس في نبات ستيفيا (*Stevia rebaudiana Bertoni*) وإنتاج المستقلبات الثانوية ستيفيوسيد باستخدام محفز Cu^{2+} في المختبر

وصيلة الصليحة، إفيكا ساندي سافيتري، محمد سيف

برنامج دراسات الماجستير في علم الأحياء، كلية العلوم والتكنولوجيا
جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية، مالانج

ملخص البحث

نبات الستيفيا يحتوي على مركب ثانوي استيفوسيد الذي يتميز بطعم حلو يزيد عن السكر القصب بـ 300 مرة مع أسعار حرارية أقل. يجب زيادة مركب الاستيفوسيد في الستيفيا لتلبية الطلب المتزايد في السوق مع اتجاه الطلب على استخدام تقنية المختبر. Cu^{2+} المحليات منخفضة السعرات الحرارية. يمكن زيادة الاستيفوسيد عن طريق إضافة محفز على تحفيز نمو الكالس في نبات الستيفيا وإنتاج Cu^{2+} الهدف من هذا البحث هو استكشاف تأثير إضافة محفز أيونات مركب ستيفيوسيد الثانوي. تم اختيار تقنية المختبر لأنها تتميز بإنتاج مركبات ثانوية في ظروف خاضعة للرقابة. يتم كمحفز لتحفيز الإجهاد في النباتات مما يؤدي إلى زيادة إنتاج المركبات الثانوية في الكالس في Cu^{2+} استخدام أيونات باستخدام خمسة تركيزات Cu^{2+} نبات الستيفيا. هذه الدراسة هي دراسة تجريبية وصفية نوعية مع معالجة تركيز أيونات مختلفة (0، 1، 2، 5، و 10 مجم/لتر) تم تكرارها خمس مرات. تشمل معايير الدراسة وزن الكالس الرطب، والملمس، *Anova one way*، واللون، ومستوى ستيفيوسيد. تم تحليل البيانات الكمية المتمثلة في الوزن الرطب للكالس باستخدام بمستوى دلالة 5%. تم شرح البيانات النوعية المتمثلة *Duncan Multiple Range Test* واختبار متابعة باستخدام يؤثر على الوزن Cu^{2+} في اللون والملمس ومستوى ستيفيوسيد بشكل وصفي. أظهرت نتائج البحث أن إعطاء أيونات Cu^{2+} الرطب للكالس واللون وزيادة محتوى ستيفيوسيد، حيث كانت المعالجة المثلى عند تركيز 2 ملغ/لتر من أيونات أي 0.142 غرام مع محتوى ستيفيوسيد 639.760 ميكروغرام/مل، و 12795.20 ميكروغرام/مل لمحتوى على تغير لون الكالس، حيث يزداد لونه قتامة مع Cu^{2+} المستخلص، ومستوى العينة بنسبة 12,80%. تؤثر أيونات Cu^{2+} بناءً على نتائج البحث، فإن المعالجة المثلى توجد عند تركيز 2 ملغ/لتر من أيونات Cu^{2+} زيادة تركيز أيونات بالنسبة للوزن الرطب والجودة وزيادة مستوى ستيفيوسيد.

الكلمات المفتاحية: كالوس ستيفيا، مستقلب ثانوي ستيفيوسيد، محفز أيون Cu^{2+} ، في المختبر

KATA PENGANTAR

Assalamu 'alaikum Wr. Wb.

Bismillahirrohmanirrohim, segala puji bagi Allah Tuhan semesta alam karena atas berkat dan rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “Induksi Kalus Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Dan Produksi Metabolit Sekunder Steviosida Menggunakan Elisitor Cu^{2+} Secara In Vitro”. Shalawat serta salam semoga tercurahkan kepada junjungan Nabi Besar Muhammad SAW yang membimbing umat muslim dari jalan kegelapan ke jalan cahaya kebenaran. Aamiin.

Penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada bapak/ibu sebagai berikut, karena atas peran serta beliau, penulis dapat menyelesaikan studi:

1. Prof. Dr. H.M. Zainuddin, M.A selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Prof. Dr. Hj. Sri Hariani, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Prof. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si selaku Ketua Program Studi Magister Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Prof. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P dan Dr. Muhammad Saefi, M.Pd selaku Pembimbing I dan II yang telah membimbing penulis dengan penuh kesabaran dan keikhlasan.
5. Seluruh bapak/ibu dosen dan laboran di Program Studi Magister Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah dengan penuh keikhlasan membagikan ilmunya dan memberikan fasilitas terbaik sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis.
6. Ayahanda (Bapak Ali Akbar) dan Ibunda (almh. Ibu Muzayyadah) serta keluarga tercinta yang tidak pernah putus memberikan do'a, dukungan moril dan materil sehingga penulis dapat menuntaskan masa perkuliahan dan penelitian ini dengan baik.
7. Keluarga besar PP. Imam Ad-Damanhuri yang telah menjadi tempat penulis pulang selama menuntut ilmu.
8. Teman baik Siwi Putri Mumpuni dan Safina Oktafia yang dengan suka rela membantu penulis selama menjalani penelitian.
9. Teman-teman Program Studi Magister Biologi yang telah berjuang bersama untuk menyelesaikan studi Magister Biologi.

Semoga amal baik yang telah bapak/ibu berikan kepada penulis mendapatkan balasan dari Allah SWT. Penulis berharap semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi penulis dan pembaca.

Wassalamu 'alaikum, Wr. Wb

Malang, 1 Juli 2025

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERSETUJUAN.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
MOTTO.....	v
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	Error! Bookmark not defined.i
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN.....	Error! Bookmark not defined.
PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS.....	viii
ABSTRAK.....	ix
ABSTRACT.....	x
ملخص البحث.....	xi
KATA PENGANTAR	xii
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
DAFTAR SINGKATAN.....	xviii
 BAB I PENDAHULUAN.....	 1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	9
1.3 Tujuan Penelitian	10
1.4 Hipotesis Penelitian.....	10
1.5 Manfaat Penelitian	11
1.6 Batasan Masalah	11
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	 13
2.1 Tinjauan Tanaman Stevia (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) dalam Perspektif Al-Qur`an.....	13
2.2 Botani Tanaman Stevia (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni)	15
2.3 Teknik Kultur In Vitro	19
2.4 Kultur Kalus	21
2.5 Metabolit Sekunder	28
2.6 Elisitor	32
2.7 Teknik Analisis <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC).....	36
2.8 Kerangka Konseptual	37
 BAB III METODE PENELITIAN	 41
3.1 Rancangan Penelitian.....	41
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	42
3.3 Variabel Penelitian.....	42
3.4 Alat dan Bahan.....	42
3.4.1 Alat	42
3.4.2 Bahan	43
3.5 Prosedur Penelitian.....	44
3.5.1 Pembuatan Media Induksi Kalus	44
3.5.2 Pembuatan Media Elisitasi	45
3.5.3 Persiapan Bahan Tanam	45
3.5.4 Inisiasi Bahan Tanam	45

3.5.5 Penanaman Kalus Pada Media Elisitasi.....	46
3.5.6 Pemeliharaan Selama Perlakuan.....	46
3.6 Parameter Pengamatan.....	47
3.6.1. Parameter Kuantitas.....	47
3.6.2. Parameter Kualitas.....	47
3.6.3. Analisis Kandungan Steviosida	47
3.7 Analisis Data.....	50
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	51
4.1 Pengaruh Media Elisitasi Cu ²⁺ Terhadap Berat Basah Kalus Stevia (<i>Stevia rebaudiana Bertoni</i>).....	51
4.2 Pengaruh Media Elisitasi Cu ²⁺ Terhadap Warna dan Tekstur Kalus Stevia (<i>Stevia rebaudiana Bertoni</i>).....	56
4.3 Pengaruh Media Elisitasi Cu ²⁺ Terhadap Kandungan Metabolit Sekunder Steviosida Kalus Stevia (<i>Stevia rebaudiana Bertoni</i>).....	60
4.4 Tinjauan Hasil Penelitian dalam Perspektif Al-Qur`an.....	70
BAB V PENUTUP.....	73
5.1 Kesimpulan	73
5.2 Saran.....	73
DAFTAR PUSTAKA.....	75
LAMPIRAN.....	88

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1 Denah Percobaan.....	41
4.1 Berat Kalus Dari Eksplan Daun Stevia (<i>Stevia Rebaudiana</i> Bertoni) Yang Ditumbuhkan Pada Media Ion Cu ²⁺	51
4.2 Warna Dan Tekstur Kalus Dari Eksplan Daun Stevia (<i>Stevia Rebaudiana</i> Bertoni) Yang Ditumbuhkan Pada Media Ion Cu ²⁺	58
4.3 Hasil Analisis Ekstrak Kalus Stevia Menggunakan HPLC.....	62

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Akar Stevia.....	16
2.2 Batang Stevia.....	17
2.3 Daun Stevia.....	17
2.4 Bunga Stevia.....	18
2.5 Buah Dan Biji Stevia.....	18
2.6 Jalur Pembentukan Metabolit Sekunder.....	28
2.7 Struktur Molekul Steviosida.....	30
2.8 Jalur Biosintesis Steviosida.....	31
2.9 Jenis-Jenis Elisitor.....	33
2.10 Elisitor Logam Berat Menginduksi Pembentukan Metabolit Sekunder.....	35
2.11 Kerangka Konseptual.....	40
4.1 Tekstur Kalus Daun Stevia Yang Ditumbuhkan Di Media Elisitasi Cu^{2+}	57
4.2 Grafik Kromatografi Senyawa Steviosida.....	61
4.3 Kadar Steviosida Pada Setiap Perlakuan Konsentrasi Ion Cu^{2+}	63
4.4 Kadar Ekstrak Steviosida Pada Setiap Perlakuan Konsentrasi Ion Cu^{2+}	64
4.5 Kadar Sampel Steviosida Pada Setiap Perlakuan Konsentrasi Ion Cu^{2+}	65

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Uji SPSS <i>One Way Anova</i> Dan Uji Lanjut DMRT 5%.....	89
Lampiran 2. Perhitungan Kadar Steviosida.....	90
Lampiran 3. Persentase Peningkatan Berat Basah Kalus (%).....	91

DAFTAR SINGKATAN

Simbol/Singkat	Keterangan
Ag	Ion perak
b/b	Berat/berat
Ca ⁺	Ion kalsium
CDPS	<i>Copalyl diphosphate syntase</i>
Co	Ion kobalt
Cr	Ion krom
Cu	Ion tembaga
CuO	Tembaga(II) oksida
CuSO ₄	Tembaga(II) sulfat
DW	<i>Dry weight</i>
Fe	Ion besi
G	gram
GGDPS	<i>Geranylgeranyl diphosphate synthase</i>
Hal	Halaman
HCl	Asam klorida
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
K ⁺	Ion kalium
kHz	Kilohertz
KO	<i>ent-Kaurene oxidase</i>
KS	<i>ent-Kaurene synthase</i>
L	Liter
Mg ²⁺	Ion magnesium
ml	Mililiter
mm	Milimeter
MS	Murashige and Skoog
NaOH	Natrium Hidroksida
Ni	Ion nikel
PAL	<i>Phenylalanine ammonia-lyase</i>
Pb	Ion timbal
pH	<i>Potential of hydrogen</i>
ppm	<i>Part per million</i>
QE	Quercetin equivalent
ROS	<i>Reaction oxygen species</i>
v/v	Volume/volume
Zn	Ion seng
µg	mikrogram
µM	mikroMolar

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tumbuhan memiliki peranan penting dalam kehidupan manusia dan masyarakat. Tumbuhan memainkan peranan penting dalam menyediakan nutrisi penting seperti vitamin, mineral, dan serat yang penting untuk fungsi tubuh (Azizi, dkk., 2023). Keberadaan tumbuhan yang bermanfaat bagi manusia telah Allah SWT sebutkan secara implisit dalam surah Asy-Syu'ara ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya : “Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami telah menumbuhkan di sana segala jenis (tanaman) yang tumbuh baik?” (QS. Asy-Syu'ara [26]:7).

Tafsir Al-Mishbah karangan Shihab (2002) menafsirkan kata **إِلَى** yang mengandung makna *batas akhir*. Kata ini bermaksud menyuruh manusia untuk mengarahkan pandangannya hingga batas akhir kemampuan mata memandang, meliputi bumi dan seisinya, beserta beragam tanah dan tumbuhannya, serta keajaiban-keajaiban yang terdapat dalam tumbuhan yang Allah ciptakan. Shihab juga mempertegas maksud keajaiban di dalam tumbuhan melalui tafsir kata **كَرِيمٍ** yang digunakan untuk memberikan gambaran yang baik bagi objek yang disifatkan. Sifat baik pada tanaman digambarkan dengan tanaman tersebut dapat tumbuh subur dan bermanfaat bagi manusia.

Ayat diatas menjelaskan terkait dengan sifat Maha Esa Allah yang mampu menciptakan tumbuhan yang baik lagi bermanfaat bagi manusia. Allah SWT menciptakan tumbuhan yang bermanfaat bertujuan sebagai alat manusia dalam mempermudah kehidupannya di dunia. Selain itu, penciptaan ini disertai dengan

perintah untuk memperhatikan dan mempelajari bumi beserta isinya termasuk pula keajaiban dalam tumbuhan yang Allah SWT ciptakan. Hal ini bertujuan agar manusia senantiasa selalu berpikir, mempelajari, dan mensyukuri segala nikmat yang telah Allah SWT berikan. Salah satu jenis tanaman yang sejak lama telah dimanfaatkan manusia oleh manusia adalah tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni).

Stevia adalah tanaman asli dari Paraguay, Amerika Selatan (Adabiyah, dkk., 2019). Tanaman ini berasal dari famili Asteraceae, berhabitus semak, dan memiliki genus sekitar 240 spesies. Namun hanya *Stevia rebaudiana* yang digunakan sebagai pemanis (Agus, 2019). Stevia dapat digunakan sebagai pemanis alami sebab adanya kandungan glikosida steviol. Senyawa pemanis yang telah ditemukan dalam daun stevia diantaranya steviosida, rebaudiosida (A, B, C, D, E, F, M, dan N), steviolbiosida, rubusosida, dan dulkosida (A-B) (Chiew, dkk., 2016). Steviosida dan rebaudiosida-A adalah glikosida steviol utama yang ditemukan pada daun stevia dengan tingkat kemanisan 300 kali lebih manis dibandingkan dengan sukrosa (Yadav, dkk., 2013;Javed, dkk., 2018). Senyawa steviosida banyak digunakan sebagai pemanis alami yang disintesis dari daun stevia. Hal ini disebabkan oleh kandungan steviosida dalam daun stevia merupakan pemanis alami dengan kandungan terbesar diantara senyawa pemanis lainnya yang terkandung dalam daun stevia yaitu sebesar 9,1% (Orellana-Paucar, 2023).

Tanaman stevia merupakan tanaman obat yang juga dimanfaatkan sebagai bahan tambahan pangan sebab memiliki rasa manis yang diperoleh dari kandungan senyawa glikosida steviol (Chiew, dkk., 2016). Senyawa steviosida pada daun stevia dianggap sebagai pengganti gula yang alami dan aman, sebab berupa pemanis

alami yang rendah kalori, tidak beracun, memiliki aktivitas antimikroba, dan tidak bersifat karsinogenik (Dey, dkk., 2013; Darmawan, 2023). Keunggulan kandungan metabolit sekunder pada stevia membuat stevia menjadi salah satu tanaman pemanis yang masih terus dikembangkan hingga saat ini.

Pemanfaatan stevia di Indonesia terus mengalami peningkatan (Sulandari, dkk., 2024). Hal ini didasarkan kepada permintaan terhadap pemanis nol kalori dan berasal dari bahan alam telah meningkat drastis, isu kesehatan yang berkembang saat ini membuat masyarakat lebih tertarik untuk mengonsumsi bahan pangan alami yang menyehatkan (Tappy, 2018), menyebabkan permintaan akan produk stevia dan turunannya semakin meningkat (Zulhamdi, 2020). Selain itu, faktor lain yang menyebabkan Indonesia mulai mengembangkan stevia sebagai tanaman pemanis pendamping gula tebu yaitu keterbatasan pemerintah dalam memenuhi kebutuhan gula nasional menyebabkan tingginya nilai impor gula tebu (Zulhamdi, 2020). Indonesia mengalami penurunan produksi gula tebu pada tahun 2020 sebanyak 2, 12 juta ton dan kembali meningkat menjadi 2, 42 juta ton pada tahun 2021. Meskipun telah mengalami peningkatan produksi, jumlah tersebut belum bisa mencukupi kebutuhan nasional gula tebu sehingga menyebabkan Indonesia mengimpor sebanyak 14,4% produk gula mentah dunia pada tahun 2019 (Artono, dkk., 2024).

Stevia yang dimanfaatkan sebagai pemanis alami di Indonesia mengalami tantangan dari sisi pemenuhan produksi yang masih fluktuatif. Temperatur tinggi dan kelembaban rendah merupakan faktor yang mempengaruhi stevia jarang dibudidayakan di Indonesia (Husna, dkk., 2018). Selain itu, pengembangan stevia di Indonesia dibatasi oleh keragaman genetiknya yang sempit (Adabiyah, dkk.,

2023). Stevia memiliki potensi yang besar sebagai tanaman pendamping gula tebu jika dilihat dari kebutuhan gula nasional, sehingga untuk mengoptimalkan pemanfaatan stevia dibutuhkan pengembangan dalam bentuk perakitan varietas stevia yang sesuai dengan iklim di Indonesia (Sinta & Sumaryono, 2019).

Penanaman tanaman stevia secara konvensional juga mengalami tantangan yaitu tanaman stevia memiliki daya kecambah benih yang rendah berkisar antara 27,5%-57,5% (Parnidi, dkk., 2022). Benih dengan kualitas tinggi memiliki daya kecambah lebih dari 90 %, dengan daya kecambah mencapai lebih dari 90% maka tanaman mampu tumbuh secara normal dalam kondisi lingkungan suboptimum dan dapat bereproduksi dengan maksimal (Ningsih, dkk., 2018;Parnidi, dkk., 2022). Penanaman yang dilakukan secara konvensional di lahan akan mengalami kesulitan sebab pertumbuhannya tidak optimal. Oleh karena itu, dibutuhkan suatu metode alternatif untuk memperbanyak tanaman stevia sehingga kebutuhan akan senyawa glikosida steviol dapat terpenuhi.

Salah satu metode alternatif yang dapat digunakan dalam memproduksi senyawa metabolit sekunder adalah dengan menggunakan teknik kultur in vitro. Teknik kultur in vitro memiliki keunggulan diantaranya dapat dilakukan dalam kondisi steril dan terkontrol, sehingga pengaruh faktor iklim dapat dihilangkan (Kadapi, dkk., 2024). Teknik kultur in vitro juga dapat menghasilkan tanaman dalam kuantitas besar dan waktu yang singkat, dengan tingkat keseragaman tinggi, dan produksi metabolit sekunder yang meningkat (Cardoso, dkk., 2019). Kultur kalus merupakan salah satu teknik yang biasa digunakan dalam kultur in vitro metabolit sekunder sebab berpotensi tinggi dalam menyediakan metabolit sekunder (Purwaningrum, 2018).

Kultur kalus memiliki kelebihan jika dibandingkan dengan penggunaan tanaman utuh diantaranya tidak membutuhkan lahan yang luas, tidak dibatasi faktor iklim, dan metabolit sekunder yang dihasilkan memiliki sifat kesinambungan dalam keadaan yang terkontrol (Setiawati, dkk., 2020). Kultur kalus juga dapat menghasilkan lebih banyak metabolit sekunder jika dibandingkan dengan mengambilnya langsung dari tanaman (Dabuwat, dkk., 2019). Hal ini ditunjukkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Ghose, dkk., (2022) yang membuktikan bahwa daun stevia yang ditanam pada konsentrasi 0,75 MS mampu menghasilkan kadar steviosida tertinggi sekitar 39,76% dibandingkan dengan daun stevia yang ditanam pada media tanpa tambahan media MS. Penelitian lainnya dilakukan oleh Iqbal, dkk (2022) pada tanaman *Vigna radiata* L. yang dikulturkan dengan kultur pucuk, kultur akar adventif, dan kultur kalus dengan hasil kandungan biokimia tertinggi terdapat pada kultur kalus. Kebutuhan akan metabolit sekunder yang tinggi untuk keperluan industri mengakibatkan peningkatan senyawa metabolit sekunder menjadi penting untuk dilakukan (Ozyigit, dkk., 2023).

Peningkatan senyawa metabolit sekunder dapat dilakukan dengan menggunakan metode elisitasi (Pono, dkk., 2021). Elisitasi merupakan teknik penambahan zat atau molekul dalam media pertumbuhan untuk merangsang respon stress sehingga terjadi peningkatan metabolit sekunder pada tanaman (Narayani & Srivastava, 2017). Elisitor adalah agen aktif yang dapat merangsang terbentuknya metabolit sekunder sebagai respon perlindungan diri dari tanaman, elisitor yang digunakan dapat berupa elisitor biotik dan abiotik (Retnaningati, dkk., 2021; Pono, dkk., 2021). Salah satu jenis elisitor abiotik yang biasa digunakan untuk

merangsang pembentukan metabolit sekunder adalah ion tembaga (Cu^{2+}) (Heinisch, dkk., 2019).

Ion tembaga (Cu^{2+}) adalah mikronutrien yang berperan penting dalam perkembangan tanaman dan turut menjadi kofaktor enzim pada proses fisiologi tanaman (Heinisch, dkk., 2019). Ion Cu^{2+} berperan dalam transpor elektron, reaksi reduksi-oksidasi, dan berbagai jalur metabolisme lainnya. Ion Cu^{2+} juga berperan dalam respons pertahanan tanaman dengan menginduksi gen-gen tertentu untuk meningkatkan pembentukan metabolit sekunder (Jannah, 2016). Penggunaan ion Cu^{2+} sebagai elisitor berperan dalam mengaktifkan protein mitogen-activated protein kinase dan saluran ion, menghasilkan produksi spesies oksigen reaktif (ROS) dan menghasilkan lebih banyak metabolit sekunder seperti senyawa glikosida pada tanaman (Iqbal, dkk., 2022).

Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa penggunaan ion Cu^{2+} sebagai elisitor telah berhasil meningkatkan kandungan senyawa metabolit sekunder pada tanaman yang dikembangkan secara in vitro, seperti pada tunas stevia yang berhasil meningkatkan kandungan steviosida menjadi 2.06% dan 1,96% dengan pemberian ion Cu konsentrasi 10 dan 20 mg/L (Javed, dkk., 2017; Ahmad, dkk., 2020). Penelitian lainnya dilakukan oleh Elateeq, dkk (2020) pada tanaman *Silybum marianum* L. yang diberikan konsentrasi 5 mg/L ion Cu mampu meningkatkan produksi senyawa aktif pada tanaman tersebut. Penggunaan kultur kalus mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder lebih banyak dibandingkan dengan kultur organ dengan menggunakan konsentrasi ion yang lebih rendah, seperti penelitian yang dilakukan oleh Numba, dkk (2024) pada kalus tanaman

Catharanthus roseus L. yang diberikan konsentrasi 6 mg/L ion Cu^{2+} berhasil meningkatkan senyawa metabolit sekunder sebesar 3,615 mg QE/g DW.

Penggunaan ion Cu^{2+} dirasa lebih aman jika dibandingkan dengan penggunaan jenis logam berat yang lain. Penelitian yang dilakukan oleh Kumari, dkk (2022) pada tanaman *Solanum lycopersicum* yang diberikan perlakuan ion Pb, Ni, dan Cu menunjukkan bahwa kalus yang diberikan ion Pb dan Ni menghasilkan penurunan parameter pertumbuhan jika dibandingkan dengan kalus yang diberikan perlakuan ion Cu dengan konsentrasi yang sama. Penelitian serupa dilakukan oleh Al-Mayahi (2013) pada kalus *Phoenix dactylifera* L. yang diberikan perlakuan ion Co dan Cu dengan dosis yang sama menunjukkan proliferasi kalus yang diberikan ion Cu menghasilkan tingkat proliferasi yang lebih tinggi. Hal ini menandakan bahwa pemberian ion Cu lebih aman digunakan untuk meningkatkan pertumbuhan kalus.

Ion Cu^{2+} dapat mempengaruhi hasil metabolit sekunder dengan menyebabkan peningkatan spesies oksigen reaktif (ROS) yang dapat memicu respons stress pada tanaman. Keadaan mencekam atau stress pada tanaman dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder seperti flavonoid, fenol, dan terpenoid yang memiliki peran sebagai mekanisme pertahanan tanaman. Senyawa steviosida yang terkandung pada daun stevia merupakan senyawa turunan dari senyawa kimia yang dikenal sebagai diterpena (Libik-Konieczny, dkk., 2021), sehingga pemberian ion Cu^{2+} diharapkan dapat meningkatkan kandungan steviosida. Ion Cu^{2+} diketahui dapat merangsang ekspresi gen yang terkait dengan produksi senyawa metabolit sekunder penting (Al-Khayri, dkk., 2023).

Pemberian ion Cu^{2+} dalam konsentrasi tinggi juga dapat menyebabkan penurunan produksi metabolit sekunder pada tanaman. Pada tanaman stevia penurunan produksi steviosida disebabkan oleh pemberian konsentrasi yang terlalu tinggi sekitar 2000 mg/L dan 1000 mg/L menghasilkan kadar steviosida sebesar 2000 mg/L ion Cu dapat menurunkan kadar steviosida menjadi 0,25% dan 0,13% (Javed, dkk., 2017; Ahmad, dkk., 2020).

Peningkatan senyawa steviosida dapat diketahui dengan dilakukannya teknik analisis menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) atau *high performance liquid chromatography* (HPLC). HPLC merupakan metode yang dapat digunakan untuk menganalisis senyawa metabolit secara kualitatif, kuantitatif, isolasi, serta pemurnian. Parameter kualitatif pada metode HPLC yaitu waktu retensi setiap senyawa sebab waktu retensi satu senyawa dengan senyawa lainnya berbeda. Sedangkan untuk parameter kuantitatif metode HPLC membutuhkan data berupa luas puncak atau tinggi puncak yang ditentukan oleh konsentrasi solute (Salamah & Guntarti, 2023).

Pemilihan metode HPLC sebagai instrument analisis senyawa metabolit didasarkan pada beberapa keunggulan yang dimiliki metode ini, antara lain; waktu analisis yang singkat, membutuhkan volume sampel yang minim, memiliki kemampuan untuk menganalisis senyawa organik dan anorganik, serta mampu untuk menggunakan kolom kembali (Amin, dkk., 2016). HPLC banyak digunakan dalam bidang kimia bahan alami sebab dapat mengukur kandungan senyawa bioaktif dalam ekstrak tanaman secara kualitatif dan kuantitatif (Unique, 2016).

Penggunaan ion Cu^{2+} sebagai elisitor telah banyak dilakukan sebelumnya pada berbagai jenis tanaman dan terbukti mampu untuk meningkatkan kandungan

senyawa metabolit sekunder di dalam kalus. Namun penelitian terkait peningkatan kandungan senyawa steviosida yang terdapat pada daun stevia dengan pemberian elisitor ion Cu^{2+} masih jarang dilakukan. Oleh sebab itu, pada penelitian ini akan dilakukan pemberian variasi konsentrasi elisitor ion Cu^{2+} untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder steviosida pada tanaman stevia.

Adapun konsentrasi ion Cu^{2+} yang digunakan mengacu pada hasil penelitian yang dilakukan oleh Zarad, dkk (2021) pada bahan tanam daun *Artemisia annua* yang menggunakan konsentrasi ion Cu^{2+} 1, 2, 5, dan 10 mg/L ion Cu^{2+} . Penelitian ini berhasil meningkatkan metabolit sekunder pada tanaman *Artemisia annua* dengan pemberian 2 mg/L CuSO_4 . Tanaman *Artemisia annua* masih berasal dari satu famili yang sama dengan stevia yaitu berasal dari famili *Asteraceae* (Septembre-Malaterre, dkk., 2020). Oleh karena itu, diharapkan penerapan konsentrasi ion Cu^{2+} ini dapat meningkatkan pembentukan senyawa steviosida pada kalus stevia.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apakah pemberian variasi konsentrasi ion Cu^{2+} berpengaruh terhadap berat basah kalus tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni)?
2. Apakah pemberian variasi konsentrasi ion Cu^{2+} berpengaruh terhadap kualitas kalus tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni)?
3. Apakah pemberian variasi konsentrasi ion Cu^{2+} berpengaruh terhadap produksi kandungan steviosida pada kultur kalus tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni)?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk mengidentifikasi pengaruh pemberian variasi konsentrasi ion Cu^{2+} terhadap berat basah dan kualitas kalus tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni).
2. Untuk mengidentifikasi variasi konsentrasi ion Cu^{2+} yang berpengaruh terhadap peningkatan produksi kandungan steviosida pada kultur kalus tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni).
3. Untuk mengidentifikasi konsentrasi ion Cu^{2+} yang tepat untuk meningkatkan produksi kandungan steviosida pada kultur kalus tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni).

1.4 Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pemberian variasi konsentrasi ion Cu^{2+} berpengaruh terhadap berat basah kalus tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni).
2. Pemberian variasi konsentrasi ion Cu^{2+} berpengaruh terhadap kualitas kalus tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni).
3. Pemberian variasi konsentrasi ion Cu^{2+} berpengaruh terhadap produksi kandungan steviosida pada kultur kalus tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni).

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memberikan informasi terkait konsentrasi ion Cu^{2+} sebagai elisitor yang tepat untuk menginduksi berat basah kalus dan meningkatkan kualitas kalus tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni).
2. Memberikan informasi terkait pengaruh pemberian ion Cu^{2+} dalam meningkatkan produksi metabolit sekunder steviosida yang terdapat dalam kalus stevia.
3. Hasil produksi metabolit sekunder dapat dimanfaatkan dalam bidang kesehatan untuk menjadi bahan obat-obatan atau lain sebagainya.

1.6 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bahan tanam yang digunakan pada penelitian ini adalah daun muda tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) yang tumbuh di daerah Batu, Malang. Daun stevia yang digunakan memiliki ciri morfologi daun berwarna hijau cerah dan memiliki bentuk yang sempurna.
2. Media tanam yang digunakan adalah media *Murashige and Skoog* (MS) dengan pH 5,8-6,1.
3. Zat pengatur tumbuh yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2,4-D dengan konsentrasi 2 mg/L.
4. Konsentrasi ion tembaga (Cu^{2+}) yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1mg/L, 2 mg/L, 5 mg/L, dan 10 mg/L.
5. Parameter kalus stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) yang diamati meliputi berat basah kalus, tekstur, dan warna kalus.

6. Metabolit sekunder yang dianalisis pada penelitian ini adalah kadar steviosida pada kalus kontrol dan kalus yang diberikan perlakuan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tanaman Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) dalam Perspektif

Al-Qur`an

Tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) merupakan salah satu tanaman penghasil gula selain tanaman tebu. Stevia adalah tanaman obat yang berasal dari famili Asteraceae (Kazmi, dkk., 2019). Rasa manis pada stevia disebabkan oleh kandungan glikosida steviol pada daun stevia (Chiew, dkk., 2016). Penjelasan terkait dengan tanaman yang bermnafaat telah Allah SWT sebutkan secara implisit dalam QS. Al-An`am ayat 99:

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا...

Artinya : “Dan Dialah yang menurunkan air dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan, maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau...” (QS. Al-An’am [6]:99)

Tafsir Mishbah karangan Shihab (2002) menafsirkan ayat diatas sebagai salah satu ayat yang menjelaskan kekuasaan Allah SWT dengan menyebutkan bukti-bukti kemahakuasaan Allah SWT. Turunnya air hujan yang dapat menumbuhkan *segala macam tumbuh-tumbuhan* yang dari tumbuh-tumbuhan tersebut bermunculan *tanaman yang menghijau* merupakan salah satu bukti kekuasaan Allah SWT yang sangat bermanfaat bagi manusia.

Tanaman hijau adalah salah satu ciptaan Allah SWT yang banyak dimanfaatkan oleh manusia. Tanaman hijau mengandung klorofil yang dengan bantuan cahaya matahari dapat mengolah bahan organik menjadi bahan makanan bagi manusia dan hewan. Zat hijau daun pada tanaman menurut dunia kedokteran ketika bercampur dengan sel-sel dalam tubuh manusia akan memberikan tenaga dan

perlindungan dari berbagai penyakit. Dengan kata lain, tanaman hijau dapat menjadi obat bagi manusia yang mengonsumsinya. Stevia merupakan salah satu jenis tanaman hijau yang dimanfaatkan daunnya untuk bahan obat (Asmono, dkk., 2017). Kandungan senyawa aktif pada stevia yang memiliki rasa manis atau dikenal dengan nama steviosida. Sintesis awal steviosida terjadi di dalam klorofil (Agus, 2019). Hal ini semakin menguatkan bahwa betapa kuasanya Allah SWT dalam menciptakan tanaman hijau beserta manfaat yang terkandung didalamnya.

Daun stevia juga mengandung berbagai vitamin dan mineral seperti niacin, thiamin, rutin, kalsium, magnesium, fosfor, zinc, dan lain sebagainya (Marcinek & Krejpcio, 2015). Stevia memiliki kandungan metabolit sekunder berjenis steviosida yang memiliki rasa manis 100-300 kali lebih manis daripada gula tebu (Cahyono & Riani Ningsih, 2023). Hal ini menyebabkan daun stevia dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat-obatan dan bahan pemanis alami. Hal ini sesuai dengan firman Allah SWT dalam Q.S. Ar-Rahman ayat 12

وَالْحَبُّ ذُو الْعَصْفِ وَالرَّيْحَانُ

Artinya : “*dan biji-bijian yang berkulit dan bunga-bunga yang harum baunya*” (QS Ar-Rahman [55]:12).

Shihab (2002) dalam Tafsir Al-Mishbah menafsirkan kata الْحَبُّ yang dipahami sebagai tumbuhan yang menjadi makanan pokok. Kata الْعَصْفِ ditafsirkan sebagai *daun* atau *daun kering* yang *digerakkan* oleh angin. Sementara kata الرَّيْحَانُ dimaknai sebagai bunga yang memiliki *aroma* yang harum. Maka dapat disimpulkan terkait dengan penafsiran ayat diatas yaitu Allah menciptakan tanaman yang daunnya beraroma wangi dan dapat dikonsumsi oleh manusia.

Pemanfaatan daun stevia sebagai bahan obat-obatan telah banyak dilakukan. Hal ini berkaitan erat dengan kandungan senyawa aktif dalam daun stevia yang memiliki berbagai manfaat diantaranya memiliki sifat antikanker, antidiabetes, antimikroba, sebagai sumber antioksidan, dan rendah kalori (Siringoringo, dkk., 2022). Kandungan senyawa aktif dalam daun stevia tidak lepas dari kuasa Allah SWT yang dengan karuniaNya telah menciptakan tanaman hijau yang daunnya dapat dimanfaatkan sedemikian rupa oleh manusia. Sudah sepatutnya manusia sebagai makhluk yang memiliki pikiran luas selalu berpikir akan segala nikmat yang telah Allah SWT berikan.

2.2 Botani Tanaman Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) merupakan tanaman tahunan berhabitus semak yang berasal dari famili Asteraceae (Pandey, 2018). Memiliki genus sekitar 200 genus, diantara spesies dari famili Asteraceae yang berpotensi sebagai pemanis, hanya *S. rebaudiana* yang menunjukkan tingkat kemanisan tertinggi (Marcinek & Krejpcio, 2015). Tanaman stevia merupakan tanaman yang berasal dari Amerika selatan, tepatnya berasal dari Brasil dan Paraguay (Javed, dkk., 2018). Saat ini, stevia telah dibudidayakan di banyak negara seperti Jepang, Taiwan, Malaysia, Filipina, Hawaii, dan Amerika Serikat (Kazmi, dkk., 2019).

Tanaman stevia dapat ditemukan di padang rumput dan di tepi rawa dengan tanah berpasir atau berawa yang tidak subur dengan permukaan air tanah yang dangkal. Suhu yang cocok untuk mendukung pertumbuhan stevia berkisar antara 6-43°C dengan rata-rata suhu tahunan 23°C dan curah hujan sekitar 1500-1800 mm/tahun (Libik-Konieczny, dkk., 2021). Kelembaban udara yang baik untuk stevia sekitar 80% dengan derajat keasaman tanah sekitar 6,5-7,5 (Pandey, 2018).

Stevia memiliki struktur morfologis yang terdiri dari akar, batang, daun, bunga, buah, dan biji. Stevia memiliki akar tunggang (Gambar 2.1) (Sharma, dkk., 2023) yang terbagi menjadi dua sistem perakaran yaitu perakaran halus yang dekat dengan permukaan tanah serta perakaran tebal, rapat, dan kasar menembus ke dalam tanah (Busono & Dini., 2015). Akar stevia biasanya membentuk sistem perakaran yang luas dan relatif dangkal (Libik-Konieczny, dkk., 2021).



Gambar 2.1 Akar Stevia (Dokumentasi pribadi, 2025)

Tanaman stevia memiliki batang berkayu tegak (Gambar 2.2), kecil, ramping dan berbulu halus dengan percabangan yang terus tumbuh saat pertumbuhan tanaman berlangsung (Busono & Dini., 2015; Libik-Konieczny, dkk., 2021). Pada tanaman yang sudah tua, pangkal batang akan menjadi lunak (Djajadi, 2014). Tanaman stevia dapat mencapai tinggi sekitar 30 cm atau bahkan dapat mencapai tinggi sekitar 65-80 cm (Pandey, 2018).

Stevia memiliki daun tunggal (Gambar 2.3), panjang daun sekitar 2-3 cm dan lebar 0,6-1 cm (Sharma, dkk., 2023) berbentuk lanset hingga lonjong dengan tangkai yang pendek. Permukaan daunnya sedikit berkayu dan memiliki dua ukuran

trikoma yang berbeda (Pandey, 2018). Tersusun berhadapan pada batangnya dengan ujung daun yang bergerigi (Libik-Konieczny, dkk., 2021).



Gambar 2.2 Batang Stevia (B: Dokumentasi pribadi, 2025)

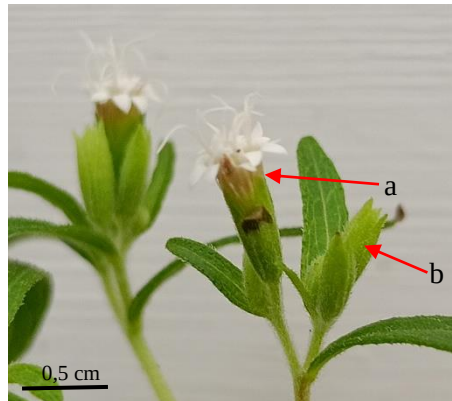
Stevia memiliki daun tunggal (Gambar 2.3), panjang daun sekitar 2-3 cm dan lebar 0,6-1 cm (Sharma, dkk., 2023) berbentuk lanset hingga lonjong dengan tangkai yang pendek. Permukaan daunnya sedikit berkayu dan memiliki dua ukuran trikoma yang berbeda (Pandey, 2018). Tersusun berhadapan pada batangnya dengan ujung daun yang bergerigi (Libik-Konieczny, dkk., 2021).



Gambar 2.3 Daun Stevia (Dokumentasi pribadi, 2025)

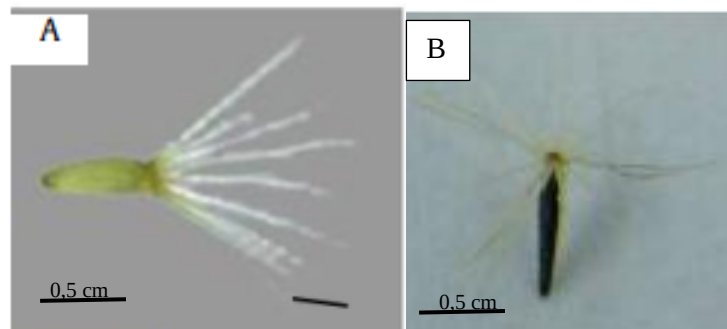
Bunga stevia merupakan bunga hemaforit berukuran kecil kecil berwarna putih (Gambar 2.4) yang memiliki morfologi yang khas dari famili Aceracea yaitu

tersusun dalam jumlah 2-6 di kapitula kecil yang tersusun dalam malai longgar (Libik-Konieczny, dkk., 2021; Sharma, dkk., 2023).



Gambar 2.4 Bunga Stevia, a: bunga mekar, b: bunga kuncup (B: Dokumentasi pribadi, 2025)

Buah stevia berupa buah archene (Gambar 2.5) yang memiliki satu biji dengan pappus berbulu (gambar 2.5) (Pandey, 2018). Bentuknya ramping dengan panjang sekitar 3 mm (Libik-Konieczny, dkk., 2021). Bewarna pucat atau kecoklatan (Sharma, dkk., 2023).



Gambar 2.5 Buah dan Biji Stevia (A: Yadav, dkk., 2010 (hal. 5); B: Adabiyah, dkk., 2023 (hal. 327))

Taksonomi stevia menurut Kazmi, dkk (2019) diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Division : Magnoliophyta
 Class : Magnoliopsida
 Subclass : Asteridae
 Order : Asterales
 Family : Asteraceae/Compositae
 Genus : *Stevia*
 Species : *Stevia rebaudiana* Bertoni M.

2.3 Teknik Kultur In Vitro

Kultur jaringan atau kultur in vitro adalah salah satu metode perbanyakan tanaman secara vegetatif. Teknik ini melibatkan isolasi bagian tanaman seperti daun, mata tunas, sel, atau protoplasma untuk kemudian ditumbuhkan dalam media buatan yang kaya akan nutrisi dan zat pengatur tumbuh. Proses ini dilakukan secara aseptik di dalam wadah transparan, sehingga bagian tanaman tersebut dapat berkembang dan tumbuh menjadi tanaman utuh (Kurnianingsih, dkk., 2020). Teknik kultur in vitro ini didasarkan pada teori yang dikemukakan oleh Schawann dan Scheleiden yang mengungkapkan bahwa setiap sel tanaman memiliki informasi genetik dan mekanisme fisiologis yang menyebabkan tanaman dapat tumbuh dan berkembang menjadi tanaman utuh apabila berada pada lingkungan yang sesuai. Teori ini dikenal dengan teori totipotensi sel tumbuhan (Yusnita, 2015).

Kultur in vitro memiliki banyak sekali manfaat diantaranya dapat menghasilkan tanaman dengan sifat sama dengan induknya dan seragam, menghasilkan tanaman bebas virus, berperan dalam melestarikan plasma nutfah, teknik yang dapat digunakan untuk menghasilkan metabolit sekunder, dan salah satu cara yang dapat dipakai untuk menghasilkan varietas tanaman baru melalui

rekayasa genetika (Kurnianingsih, dkk., 2020). Adapun kelebihan yang diperoleh ketika menerapkan teknik ini diantaranya dapat dilakukan tanpa terhalang musim, dapat memproduksi bibit dalam skala besar dan waktu yang relative singkat, menghasilkan bibit bebas penyakit dan bersifat seragam dengan sifat-sifat yang dikehendaki, produksi metabolit sekunder dapat dilakukan saat tanaman masih dalam usia muda, serta menjadi sarana untuk mempelajari sitologi, fisiologi, genetika, dan biokimia tanaman. Teknik ini juga telah banyak diterapkan pada kegiatan bioteknologi pertanian (Yusnita, 2015).

Tahapan kultur jaringan terdiri dari tahapan persiapan, pembuatan media, dan inokulasi eksplan. Pada tahap persiapan, bertujuan untuk memastikan bahwa alat dan bahan yang dibutuhkan telah siap. Salah satu syarat penting dalam kultur in vitro adalah menciptakan kondisi aseptis, sehingga semua alat dan bahan harus disterilkan terlebih dahulu sebelum digunakan. Tahapan berikutnya adalah pembuatan media tanam, yang merupakan media buatan berisi unsur hara makro dan mikro, vitamin, sumber energi, dan zat pengatur tumbuh. Pada tahapan inokulasi eksplan dilakukan penanaman bahan tanam atau eksplan pada media yang sudah disiapkan (Kurnianingsih, dkk., 2020).

Umumnya media tanam yang digunakan pada teknik kultur in vitro adalah media *Murashige & Skoog* (MS). Hal ini didasarkan pada kandungan MS yang lengkap terdiri dari nitrat, kalium, dan ammonium dengan konsentrasi tinggi (Tia, dkk., 2018). Media MS juga mengandung sukrosa yang berperan sebagai sumber karbon dan energi yang digunakan dalam tahapan induksi dan perkembangan bahan tanam (Samanhudi, dkk., 2021).

Bahan tanam atau eksplan yang digunakan dalam kultur in vitro juga memegang peran penting untuk mendukung pertumbuhan tanaman. Bahan tanam yang dapat digunakan dalam kultur in vitro antaranya dapat berupa potongan daun, potongan batang, potongan akar, kotiledon, biji, aksis embrio pada biji, bagian bunga, dan lain sebagainya (Piter, 2021). Dengan syarat antara lain potongan bagian tanaman berukuran sekitar 0,5-1 cm, menggunakan bagian tanaman yang masih muda, dan memperhatikan genetik tanaman (Apriliyani & Wahidah, 2021).

Pertumbuhan tanaman pada teknik in vitro juga dibantu oleh zat pengatur tumbuh (ZPT). ZPT adalah fitohormon buatan yang dalam jumlah kecil dapat meningkatkan atau menghambat pertumbuhan dan perkembangan bahan tanam. Tanpa kehadiran ZPT maka pertumbuhan dan perkembangan bahan tanam akan terhambat atau malah tidak tumbuh sama sekali (Habibah, dkk., 2021). ZPT yang sering digunakan dalam kultur in vitro adalah dari golongan auksin dan sitokinin (Dwiyani, 2015).

2.4 Kultur Kalus

Kultur kalus merupakan salah satu metode yang digunakan untuk menghasilkan metabolit sekunder. Kalus yang dihasilkan mengandung semua informasi genetik sel tumbuhan yang digunakan sehingga kalus mampu untuk melakukan biosintesis metabolit sekunder pada tanaman target (Pono, dkk., 2021). Kalus adalah sekumpulan sel-sel *amorphus* yang berasal dari sel-sel jaringan yang membelah secara terus-menerus dalam keadaan in vitro (Merthaningsih, dkk., 2018).

Produksi metabolit sekunder menggunakan kultur kalus lebih menguntungkan sebab memiliki beberapa kelebihan seperti dapat menghasilkan

metabolit sekunder tertentu dalam waktu singkat, tidak terpengaruh musim, produksi metabolit sekunder dapat berkesinambungan, meningkatkan produktivitas dengan menurunkan biayanya, dan memudahkan proses estraksinya (Efferth, 2019). Hal ini menyebabkan teknik kultur kalus sering digunakan untuk menghasilkan metabolit sekunder sebab kultur kalus berpotensi tinggi dalam menyediakan metabolit sekunder (Purwaningrum, 2018).

Pembentukan kalus terjadi disekitar perlukaan atau bekas potongan pada bahan tanam. Hal ini disebabkan oleh sel-sel yang bersentuhan dengan media tanam menjadi meristematik dan kemudian aktif membelah membentuk jaringan penutup luka sebagai respon adanya perlukaan (Purba, dkk., 2017). Kalus dibentuk melalui tiga tahapan yaitu tahapan induksi, tahapan proliferasi, dan tahapan diferensiasi. Pada tahapan induksi, eksplan mengalami dediferensiasi dan mulai melakukan pembelahan. Kemudian pada tahap proliferasi, bahan tanam mengalami pembelahan sel yang terjadi dengan cepat. Pada tahap terakhir yaitu tahap diferensiasi, bahan tanam mengalami proses metabolisme atau organogenesis (Purwaningrum, 2018). Tingkat pertumbuhan kalus dibagi menjadi lima fase diantaranya; (1) fase lag, sel pada bahan tanam sedang bersiap untuk membelah; (2) fase eksponen, sel pada bahan tanam sedang dalam keadaan pembelahan maksimal; (3) fase linear, sel pada bahan tanam sedang mengalami penurunan kecepatan membelah yang diikuti dengan membesarnya sel; (4) fase pertumbuhan menurun; (5) fase stationer, sel pada bahan tanam tidak mengalami pertumbuhan atau jumlah selnya konstan (Purwaningrum, 2018).

Pertumbuhan kalus sangat dipengaruhi oleh interaksi antara hormon auksin dan sitokinin endogen dengan penambahan ZPT eksogen pada media. Pemberian

kombinasi auksin dan sitokinin atau salah satunya pada eksplan dengan kadar yang tepat maka dapat merangsang pembentukan kalus (Kadapi, dkk., 2024). Salah satu jenis auksin yang biasa digunakan untuk merangsang pembentukan kalus adalah 2-4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) yang memiliki fungsi untuk merangsang pembentukan kalus melalui dediferensiasi sel dan menghambat terjadinya organogenesis (Tarigan, dkk., 2023). 2,4-D memiliki sifat yang stabil sebab tidak mudah rusak oleh cahaya atau pemanasan saat sterilisasi berlangsung (Purba, dkk., 2017). 2,4-D dalam konsentrasi rendah mampu untuk menginduksi pembentukan kalus dengan kadar metabolit sekunder yang tinggi. Selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Laila (2014) pada eksplan daun stevia yang diberikan konsentrasi 1 mg/L 2,4-D mampu menghasilkan senyawa steviosida sebanyak 4,792 mg/g. Selain itu, pemberian 2 mg/L 2,4-D juga mampu untuk menginduksi kalus stevia dengan persentase tumbuh mencapai 100% (Buana, 2020).

Pertumbuhan dan kualitas kalus yang dihasilkan melalui kultur kalus dapat diamati dengan memperhatikan beberapa parameter. Parameter yang dapat mewakili pertumbuhan dan kualitas kalus meliputi berat basah kalus, warna, dan tekstur kalus (Indah & Ermavitalini, 2013).

2.4.1. Berat Basah Kalus

Pertumbuhan merupakan proses peningkatan ukuran organisme yang terjadi secara permanen yang disebabkan bertambahnya jumlah dan ukuran sel. Pertumbuhan ditandai dengan terjadinya kenaikan berat yang bersifat *irreversible*. Oleh sebab itu, pengukuran berat basah kalus dapat dijadikan parameter untuk mengukur pertumbuhan kalus. Berat basah kalus dipengaruhi oleh kecepatan

pembelahan dan perbanyakkan sel serta pembesaran sel pada kalus (Indah & Ermavitalini, 2013).

Pertumbuhan kalus dipengaruhi oleh lingkungan tempat kalus ditumbuhkan. Pemberian paparan logam berat pada media pertumbuhan kalus dapat mempengaruhi pertumbuhan kalus (Lukatkin, dkk., 2014). Pemberian paparan logam berat dalam konsentrasi rendah dapat meningkatkan pertumbuhan kalus (Malik, dkk., 2021). Selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Numba, dkk (2024) yang menunjukkan terjadinya peningkatan berat basah kalus pada perlakuan 8 ppm Cu^{2+} yaitu 0,679 pada tanaman *Catharanthus roseus* L. Penelitian lainnya yang menunjukkan bahwa pemberian ion Cu^{2+} dalam konsentrasi rendah dapat meningkatkan berat basah kalus dilakukan oleh Zarad, dkk (2021) pada kalus tanaman *Artemisia annua* yang diberikan 2 mg/L Ion Cu^{2+} dapat meningkatkan berat basah kalus sebesar 1,29 g/eksplan. Ion Cu^{2+} yang diberikan pada media tanam dapat membantu meningkatkan aktivitas fotosintesis dan aktivitas metabolisme, sebab Cu^{2+} berperan sebagai katalis dalam tubuh tumbuhan serta penyusun enzim. Selain itu, ion Cu^{2+} juga berperan sebagai penyusun plastosianin yang merupakan bagian penting dalam fotosintesis (Jannah, 2016).

Ion Cu^{2+} merupakan mikronutrisi yang penting bagi pertumbuhan tanaman. ion Cu^{2+} berperan dalam pembentukan kofaktor molybdenum (MoCo) yang diperlukan untuk biosintesis asam absisat (ABA) dan auksin Indol-3-asetat (IAA) melalui indol-3-aldehida, serta terlibat dalam degradasi poliamina (PA) (Peñarrubia, dkk., 2015). Hal ini menunjukkan bahwa ion Cu^{2+} berpengaruh terhadap modulasi gen yang terkait dalam regenerasi atau aktivitas pengatur

pertumbuhan endogen (Miguel, 2023) . Konsentrasi ion Cu^{2+} yang tepat dapat membantu tahapan regenerasi dan perkembangan tanaman.

Pemberian konsentrasi ion Cu^{2+} pada media tanam dalam jumlah besar juga dapat menyebabkan pertumbuhan kalus menjadi terhambat (Malik, dkk., 2021). Penelitian yang dilakukan oleh Miroshnichenko, dkk (2021) menunjukkan bahwa pemberian 25-100 μM pada kalus tanaman *Triticum timopheevii* dapat menghambat pertumbuhan kalus ditandai dengan menurunnya berat basah kalus seiring dengan peningkatan konsentrasi ion Cu^{2+} . Penelitian lainnya menunjukkan bahwa pemberian konsentrasi ion Cu^{2+} 100-500 μM pada tanaman *Solanum lycopersicum* juga dapat menurunkan berat basah kalus seiring dengan meningkatnya konsentrasi ion Cu^{2+} yang diberikan (Kumari, dkk., 2022). Hal ini dapat terjadi sebab konsentrasi tembaga yang tinggi dapat menjadi racun bagi sel tanaman (Zarad, dkk., 2021).

2.4.2. Warna Kalus

Warna kalus yang dihasilkan dapat beragam sesuai dengan keadaan sel-sel penyusun kalus masih aktif membelah atau sudah tidak membelah (Heriyanto & Gunawan, 2020). Warna hijau pada kalus menunjukkan bahwa kalus memiliki kemampuan membelah yang baik (Anwar & Isda, 2021). Warna hijau kekuningan menunjukkan terdapat adanya kandungan klorofil pada kalus (Oktafiana, dkk., 2022). Warna putih menunjukkan bahwa kalus yang dihasilkan merupakan kalus embriogenik. Warna putih kekuningan menunjukkan fase pembelahan aktif pada kalus (Setiawati, dkk., 2021). Warna kuning menunjukkan kalus mampu membelah dengan baik dan kalus yang dihasilkan memiliki kandungan flavonoid pada sel

parenkimnya (Ekawati, dkk., 2022). Warna coklat pada kalus menunjukkan terdapat kandungan fenol yang teroksidasi (Prashariska, dkk., 2021).

Warna kalus dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan tempat kalus ditumbuhkan. Misalnya dengan adanya pemberian cekaman logam berat yang dapat mempengaruhi warna kalus yang dihasilkan. Selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Numba, dkk (2024) pada kalus tanaman *Catharanthus roseus* L. yang diberikan elisitor Cu^{2+} konsentrasi 8 ppm mengalami perubahan warna setelah dipindahkan ke media elisitor. Hal ini dapat terjadi sebab penambahan ion Cu^{2+} yang berperan sebagai komponen plastosianin. Semakin banyak ion Cu^{2+} yang ditambahkan, maka warna kalus yang dihasilkan akan semakin tua. Selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Ariningsih, dkk (2003) pada kalus tanaman mengkudu yang menghasilkan warna yang semakin tua seiring dengan peningkatan konsentrasi ion Cu^{2+} yang diberikan. Hal ini disebabkan oleh terjadinya penumpukan fenol pada kalus yang disebabkan adanya absorbs ion Cu^{2+} yang berlebihan. Ion Cu^{2+} berperan sebagai kofaktor dari enzim polifenol oksidase sehingga penumpukan fenol dapat terjadi dengan mudah (Ariningsih, dkk., 2003).

Tidak adanya perubahan warna pada kalus saat ditumbuhkan pada media dengan kandungan logam berat menandakan bahwa sel dalam kalus masih dapat beradaptasi dan melangsungkan pertumbuhan (Restiani, dkk., 2024). Selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Nurchayati, dkk (2016) yang menyatakan bahwa pemberian ion Cu dengan konsentrasi 5-15 μM tidak menyebabkan perubahan tekstur dan warna pada kalus tanaman *Datura metel* L. Hal ini menunjukkan bahwa kalus dapat beradaptasi dengan baik pada lingkungan dengan cekaman logam berat.

2.4.3. Tekstur Kalus

Tekstur kalus in vitro yang dihasilkan beragam dapat dipengaruhi oleh jenis bahan tanam, komposisi nutrisi media, usia bahan tanam, zpt yang digunakan, dan faktor lingkungan (Prashariska, dkk., 2021). Tekstur pada kalus dibedakan menjadi tiga macam yaitu, (1) kompak, memiliki tonjolan nodular, tidak dapat dipisahkan menjadi sel tunggal sebab terdiri dari sel dengan ukuran kecil dan rapat, memiliki tekstur padat dan keras; (2) remah, kalusnya dapat dipisahkan menjadi sel tunggal sebab memiliki ikatan yang renggang, memiliki ruang interstisial yang besar, dan mengandung banyak air; (3) intermediet, kalus dengan kondisi berada diantara ciri-ciri kalus kompak dan remah (Tarigan, dkk., 2023). Kalus dengan tekstur kompak merupakan kalus dengan kandungan metabolit sekunder yang lebih tinggi dibandingkan dengan jenis kalus yang lain (Prashariska, dkk., 2021).

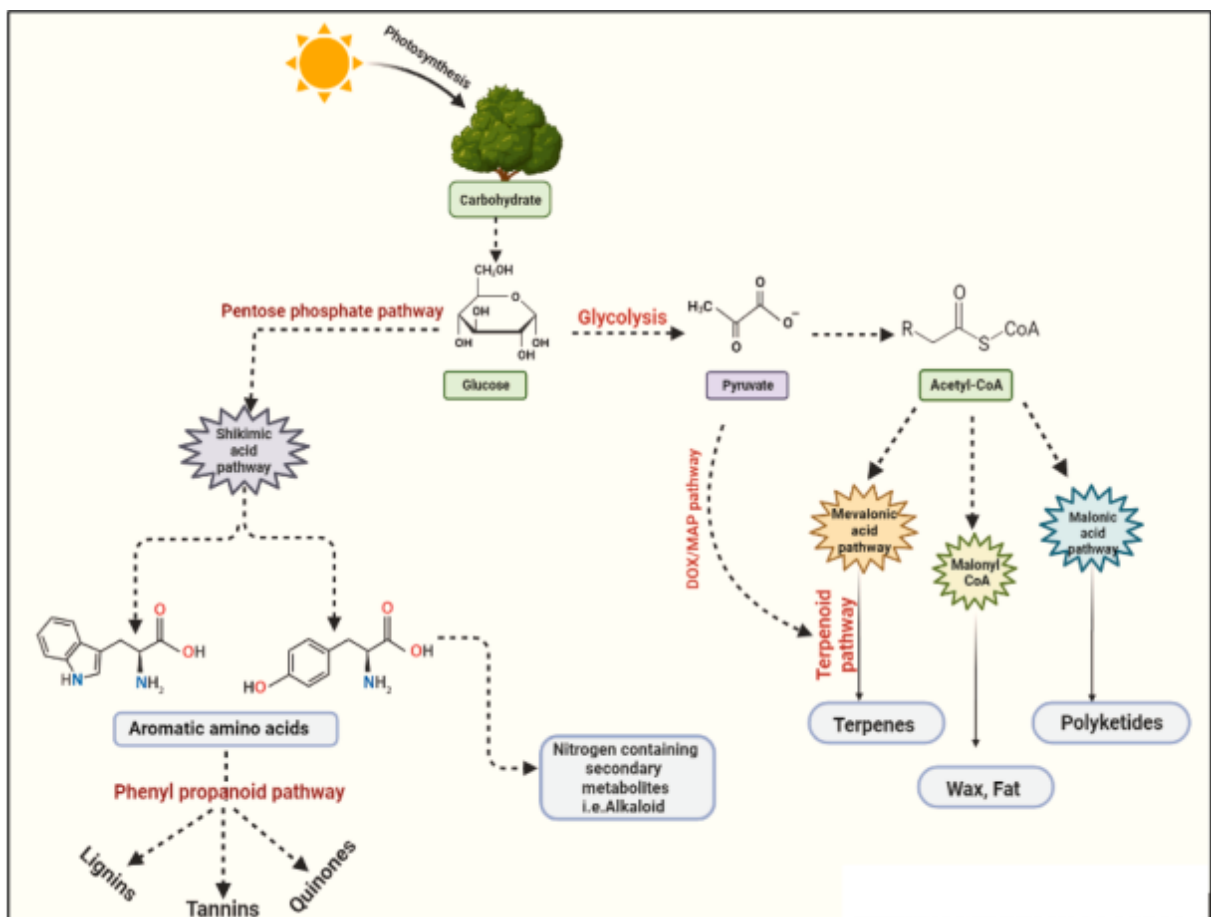
Lingkungan tempat kalus ditumbuhkan akan mempengaruhi tekstur kalus yang terbentuk. Pemberian cekaman logam berat dapat mengubah tekstur kalus yang terbentuk. Selaras dengan yang dilakukan oleh Nawrot-Chorabik (2017) yang menunjukkan bahwa pemberian ion Cu pada kalus tanaman *Abies nordmanniana* dengan konsentrasi 20 mg/L dalam media MS dapat menyebabkan perubahan tekstur kalus menjadi kering pada beberapa bagian kalus yang diikuti perubahan warna menjadi kehitaman dan selanjutnya kalus mengalami kematian.

Pemberian cekaman logam dalam konsentrasi kecil tidak akan menyebabkan perubahan tekstur pada kalus. Penelitian yang dilakukan oleh Nurchayati, dkk (2016) pada kalus tanaman *Datura metel* yang diberikan ion Cu^{2+} pada konsentrasi 5-15 μM tidak menyebabkan perubahan tekstur pada kalus. Hal ini membuktikan bahwa kalus yang diberikan paparan logam berat masih dapat

beradaptasi pada cekaman logam serta memiliki tingkat akumulasi dan indeks toleransi yang tinggi (Ratih Restianin, dkk., 2024).

2.5 Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder adalah zat yang dihasilkan oleh tanaman, namun tidak berperan langsung dalam pertumbuhannya. Jenis senyawa ini berbeda-beda tergantung pada spesies dan varietas tanaman. Metabolit sekunder dibagi menjadi empat kelompok utama, yaitu terpenoid, alkaloid, fenilpropanoid, dan antioksidan fenolik (Kadapi, dkk., 2024).



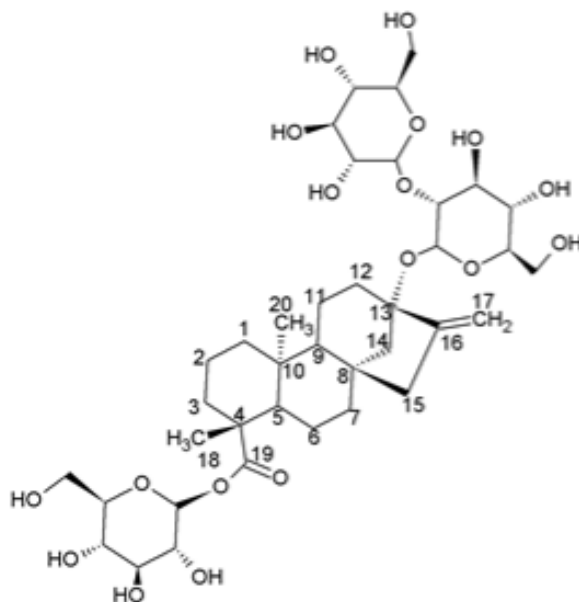
Gambar 2.6 Jalur Utama Pembentukan Metabolit Sekunder (Humbal & Pathak, 2023, hal. 2)

Faktor lingkungan seperti cahaya, suhu, air, dan salinitas juga berpengaruh terhadap tingkat produksi metabolit sekunder pada tanaman (Li, dkk., 2020). Metabolit sekunder memiliki beberapa fungsi diantaranya sebagai perlindungan dari sinar ultraviolet, sebagai atraktan, melindungi dari cekaman lingkungan biotik atau abiotik, sebagai zpt, dan bertindak sebagai alat bersaing dengan tanaman lain (Perangin-Angin, dkk., 2019).

Produksi senyawa metabolit sekunder berasal dari biosintesis senyawa primer pada tumbuhan (Ningsih, dkk., 2023). Metabolit sekunder terbentuk melalui jalur luar biosintesis karbohidrat dan protein (Perangin-Angin, dkk., 2019). Tiga jalur metabolit sekunder (Gambar 2.6) yaitu, (1) jalur asam asetat (*acetate pathway*); (2) jalur asam sikimat (*shikimic acid pathway*); (3) jalur asam mevalonate dan metileritritol fosfat (*mevalonate acid and MEP pathway*) (Anggraito, dkk., 2018; Julianto, 2019).

2.5.1. Steviosida

Steviosida ($C_{38}H_{60}O_{18}$) adalah senyawa utama penyebab rasa manis pada tanaman stevia dengan kadar kemanisan sekitar 300 kali lebih manis dari sukrosa (0,4% larutan) (Agus, 2019). Steviosida adalah glikosida diterpen yang tersusun atas tiga molekul glukosa dan gugus glukon steviol (Gambar 2.7) (Peteliuk, dkk., 2021). Kandungan steviosida berkisar antara 4-13% dari semua glikosida yang ada pada tanaman stevia, sehingga steviosida banyak digunakan sebagai pemanis (Orellana-Paucar, 2023). Steviosida memiliki rasa yang sedikit pahit atau rasa yang cukup kuat (Marcinek & Krejpcio, 2015).

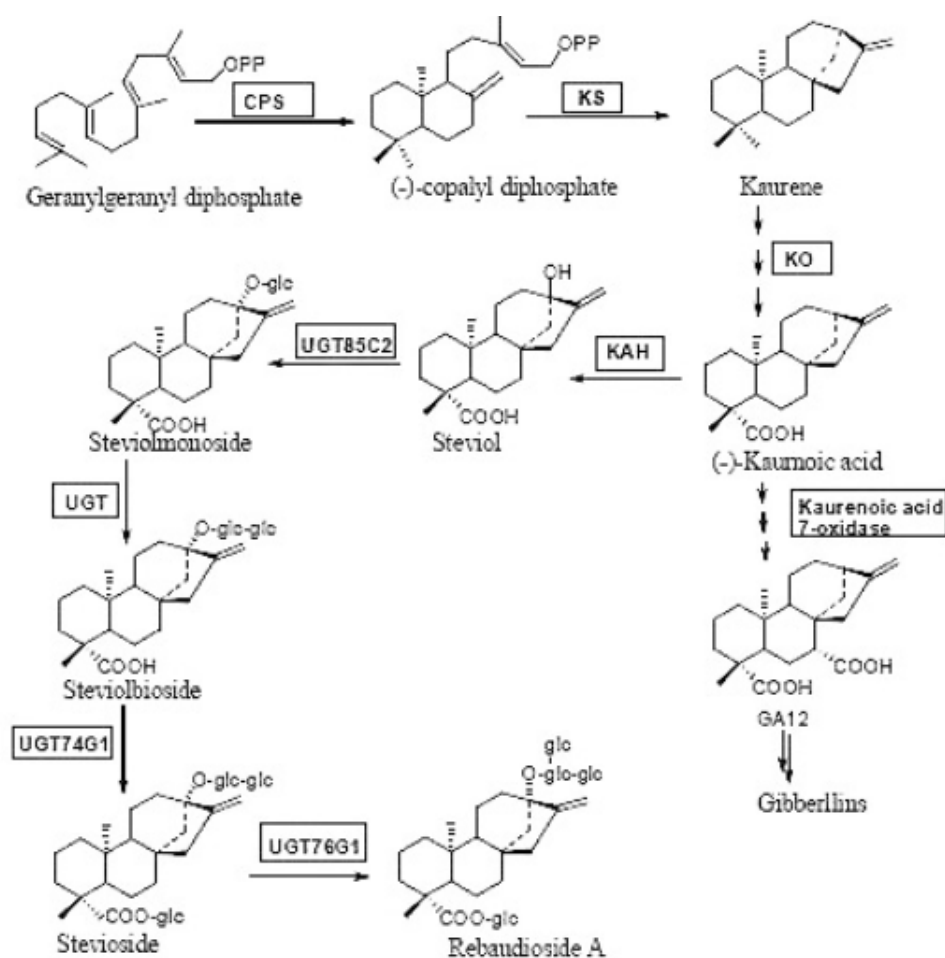


Gambar 2.7 Struktur Molekul Steviosida (Martono, dkk., 2018, hal. 665)

Jalur biosintesis steviosida melibatkan 16 langkah yang dikatalisis oleh banyak enzim. Enzim-enzim yang berperan dalam biosintesis steviosida adalah enzim UDP-glikosiltransferase (UGT) yang diidentifikasi sebagai UGT85C2, UGT74G1, UGT76G1, dan *kaurenoic acid 13-hidroxyase* (KAH) melalui jalur biosintesis asam giberelat (Gupta, dkk., 2016). Biosintesis steviosida terjadi di dua lokasi pada daun stevia, langkah awal dari biosintesis stevia terjadi di plastida. Kemudian setelah terbentuk steviol di plastida, maka terjadi penambahan gugus gula pada steviol yang terjadi di sitosol (Libik-Konieczny, dkk., 2021).

Biosintesis steviosida dimulai melalui jalur *2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate* (MEP) dengan tujuh tahapan yang menghasilkan *isopentenyl diphosphate* (IPP) dan *dimethylallyl diphosphate* (DMAPP), yang kemudian dikonversi menjadi *geranylgeranyl diphosphate* (GGDP) (Gambar 2.8). Kemudian tahapan berikutnya melibatkan empat tahapan yang mirip dengan jalur biosintesis asam giberelat (GA), yaitu GGDP mengalami perubahan menjadi *ent-kaurene* melalui aktivitas enzim seperti *copalyl diphosphate synthase* (CPS) dan *kaurene*

synthase (KS). *Ent-kaurene* kemudian dioksidasi menjadi *kaurenoic acid* melalui proses enzimatik oleh *kaurene oxidase* (KO) (gambar 2.8). Untuk membentuk steviol, *kaurenoic acid* dihidroksilasi menjadi steviol oleh enzim *kaurenoic acid 13-hydroxylase* (KAH). Tahapan selanjutnya adalah glikosilasi yang terdiri dari lima tahapan (gambar 2.8), yaitu perubahan steviol menjadi steviosida melalui penambahan gugus glukosa yang dikatalisis oleh enzim UDP-glikosiltransferase (UGT) seperti UGT85C2, UGT74G1, dan UGT76G. Pada proses ini, UGT85C2 menambahkan glukosa pada posisi C13 dari steviol membentuk steviolmonosida. Kemudian, glukosa tambahan ditambahkan untuk membentuk steviolbiosida yang akhirnya menghasilkan steviosida (Gupta, dkk., 2016; Libik-Konieczny, dkk., 2021).



Gambar 2.8 Jalur Biosintesis Steviosida (Gupta, dkk., 2016, hal. 284).

Paparan ion Cu^{2+} dapat mempengaruhi produksi steviosida dengan menyebabkan peningkatan spesies oksigen reaktif (ROS) yang menyebabkan stress oksidatif pada sel tanaman. Stress oksidatif menyebabkan aktivasi dari hormon pertahanan seperti asam salisilat dan metil jasmonat. Kedua hormon ini banyak mempengaruhi biosintesis steviosida, misal pada gen *deoxyxylulose-5-phosphate synthase* (DXS) yang memiliki peran sentral dalam jalur biosintesis steviol glikosida (Lucho, dkk., 2018). Metil jasmonat berperan dalam meningkatkan ekspresi GGDPS, CDPS, KS, dan KO yang terlibat dalam sintesis *geranylgeranyl diphosphate* dan asam kaurenat. Selain itu, metil jasmonat juga meningkatkan ekspresi gen glikosiltransferase seperti UGT85C2, UGT74G1, dan UGT76G1. Peningkatan ekspresi gen glikosiltransferase ini dapat meningkatkan produksi steviosida pada tanaman stevia sebab berperan dalam sintesis steviol glikosida (Lucho, dkk., 2018).

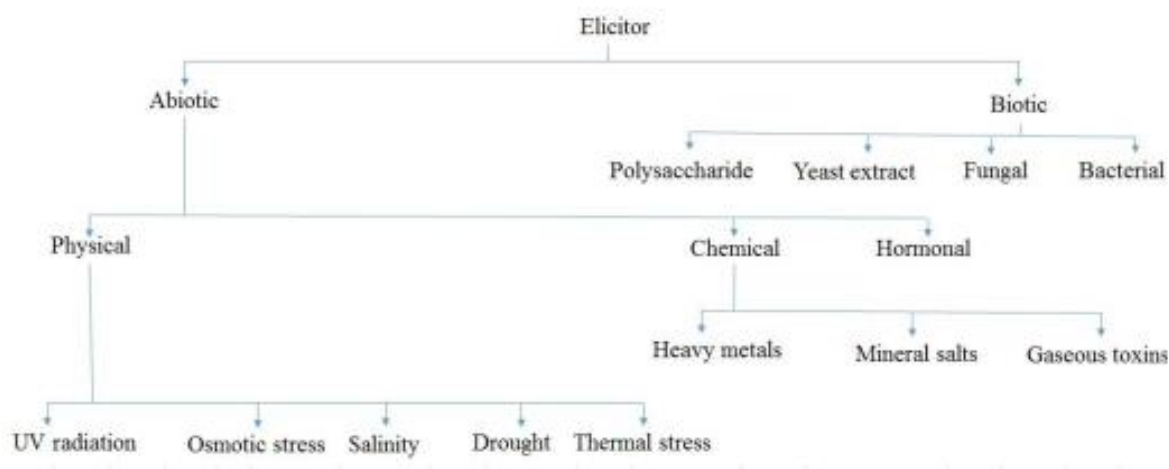
Pemberian ion Cu^{2+} secara tidak langsung merangsang pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) yang dapat menyebabkan stress oksidatif pada tanaman dengan mengaktifkan hormon pertahanan pada tanaman (Ahmad, dkk., 2020). Stress oksidatif yang terjadi dapat merangsang pembentukan senyawa metabolit sekunder pada tanaman sebagai respon terhadap stress oksidatif yang terjadi (Libik-Konieczny, dkk., 2021). Ion Cu^{2+} diketahui dapat merangsang ekspresi gen yang terkait dengan produksi senyawa metabolit sekunder penting (Al-Khayri, dkk., 2023).

2.6 Elisitor

Metabolit sekunder pada tanaman biasanya hanya diproduksi dalam jumlah terbatas pada kondisi tercekam (Kusbiantoro, 2018), sebab tidak terlibat langsung

dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Metabolit sekunder umumnya bersifat sangat spesifik dan tidak harus selalu diproduksi sebab jika tidak diproduksi dalam jangka waktu pendek tidak menyebabkan kematian pada tanaman (Anggraito, dkk., 2018;Sila, dkk., 2022). Oleh sebab itu, untuk memanfaatkan metabolit sekunder pada tanaman diperlukan metode yang dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder.

Salah satu cara untuk meningkatkan metabolit sekunder pada tanaman dapat dilakukan dengan melakukan teknik elisitasi. Elisitasi merupakan metode peningkatan metabolit sekunder dengan cara menambahkan zat atau molekul pada media tanam untuk merangsang respon stress sehingga meningkatkan produksi metabolit sekunder pada tanaman (Lutfiah & Habibah, 2022). Elisitor dapat didefinisikan sebagai zat untuk faktor stres yang ketika diberikan dalam jumlah kecil pada tanaman, akan memicu atau meningkatkan biosintesis metabolit sekunder yang berperan dalam adaptasi tanaman terhadap kondisi stress (Naik & Al-Khayri, 2016).



Gambar 2.9 Jenis-jenis Elisitor (Naik & Al-Khayri, 2016, hal. 250)

Berdasarkan sifatnya elisitor dibagi menjadi dua jenis, yaitu elisitor biotik dan abiotik (Gambar 2.9). Elisitor abiotik terdiri dari zat-zat yang berasal dari non-biologis dan dikelompokkan dalam faktor fisik, kimia, dan hormonal. Sedangkan elisitor biotik adalah zat-zat yang berasal dari benda hidup (biologis) yang meliputi polisakarida yang berasal dari dinding sel tanaman misalnya kitin, pektin, dan selulosa, serta mikroorganisme (Naik & Al-Khayri, 2016).

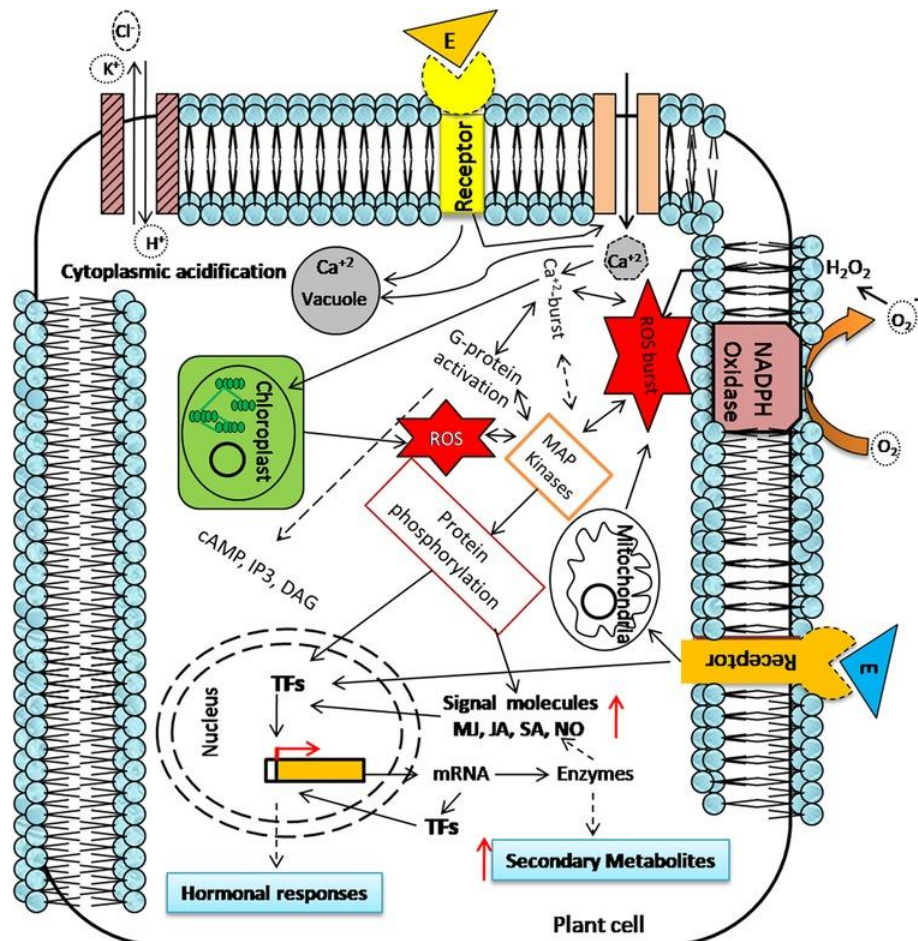
2.6.1 Ion Cu^{2+}

Ion tembaga (Cu^{2+}) adalah salah satu mikronutrien yang sangat penting selama pertumbuhan vegetatif, perkembangan, dan perbanyakan tanaman (Liu, dkk., 2015). Cu^{2+} memiliki fungsi esensial bagi tanaman sebab berperan penting dalam berbagai proses siklus hidup tanaman, seperti fotosintesis, respirasi, penginderaan etilen, pembersihan spesies oksigen reaktif (ROS), metabolisme dinding sel, dan pensinyalan hormon (Xu, dkk., 2024).

Tanaman memiliki kemampuan yang berbeda dalam tingkat toleransi terhadap logam berat. Secara umum tanaman dapat beradaptasi pada tanah yang mengandung sekitar 30 mg/kg ion Cu, sedangkan konsentrasi ion Cu yang dapat ditoleransi untuk pertumbuhan tanaman sekitar 0,4-45,8 mg/kg (Hajar, dkk., 2014). Penelitian yang dilakukan oleh Hajar, dkk., (2014) menyebutkan bahwa tanaman stevia mampu mengakumulasi ion Cu sekitar 6,94 mg/kg pada bagian daun, 8,11 mg/kg pada bagian batang, dan 2,00 mg/kg pada bagian bunga.

Pemberian Cu^{2+} sebagai elisitor menunjukkan efek stimulus pada produksi metabolit sekunder pada tanaman seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Chung, dkk (2019) pada eksplan *Gymnema sylvestre* yang diberikan 3 mg/L CuO mampu meningkatkan produksi fenolik total dan flavonoid. Penelitian lainnya

berhasil meningkatkan kandungan flavonoid pada eksplan *Gynura procumbens* (L). Merr dengan pemberian 1mg/L CuSO_4 (Faizah, dkk., 2018). Penelitian serupa berhasil meningkatkan senyawa artemisinin sebanyak 0,00790% dengan penambahan 7,5 ppm Cu^{2+} dan 0,65% dengan pemberian 5 μM CuSO_4 pada kalus *Artemisia annua* (Jannah, 2016; Darki, dkk., 2019). Pada Meskipun Cu^{2+} merupakan mikro-konstituen media pertumbuhan dan diketahui penting untuk beberapa jalur biokimia dan fisiologis, pada konsentrasi yang lebih tinggi Cu^{2+} dapat menjadi racun bagi tanaman. Oleh karena itu, penting untuk mengatur pemberian konsentrasi Cu^{2+} agar dapat merangsang produksi metabolit sekunder seperti yang diharapkan (Jurić, dkk., 2020).



Gambar 2.10 Elisitor Logam berat Menginduksi Pembentukan Metabolit

Sekunder (Halder, dkk., 2019)

Ion Cu^{2+} sebagai elisitor abiotik dapat merangsang pembentukan metabolit sekunder yang diawali dengan pengenalan jenis elisitor oleh reseptor spesifik di membran sel (Halder, dkk., 2019) (Gambar 2.10). Selanjutnya aktivasi reseptor elisitor ini akan menyebabkan depolarisasi membran sel yang memicu serangkaian peristiwa transduksi sinyal, seperti saluran antiport K^+ atau H^+ , dan ion Ca^{2+} yang penting untuk mengaktifkan berbagai proses dalam sel (Narayani & Srivastava, 2017).

Transduksi sinyal dalam membran sel akan melibatkan aktivasi enzim seperti kinase protein yang berikatan pada Ca^{2+} (Gambar 2.10), enzim ini akan mengatur fosforilasi protein dan memodifikasi aktivitas enzim-enzim terkait metabolit sekunder. Molekul seperti jasmonat, etilen, dan spesies oksigen reaktif diproduksi, yang masing-masing berperan dalam jalur sinyal stress dan respons pertahanan (Halder, dkk., 2019). Adanya inisiasi kaskade transduksi sinyal akhirnya mengubah tingkat ekspresi berbagai faktor atau gen transkripsi regulator dan gen pembatas laju jalur metabolit sekunder. Setelah itu, barulah terbentuk metabolit sekunder yang diinduksi oleh enzim-enzim biosintetik sebagai molekul pertahanan tanaman (Narayani & Srivastava, 2017).

2.7 Teknik Analisis *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) adalah teknik kromatografi cair yang digunakan untuk memisahkan berbagai macam komponen dalam campuran (Tumanduk, dkk., 2023). HPLC biasa digunakan untuk mengidentifikasi dan mengukur jumlah senyawa dalam proses pengembangan obat (Chawla & Ranjan, 2016). HPLC memiliki prinsip dasar yaitu dengan melibatkan tahapan adsorpsi yang dinamis, dengan

pergerakan molekul analit melalui celah berpori. Interaksi antara fase diam dengan komponen sampel menyebabkan terjadinya pemisahan (Unique, 2016).

Parameter kualitatif pada metode HPLC yaitu waktu retensi setiap senyawa sebab waktu retensi satu senyawa dengan senyawa lainnya berbeda. Sedangkan untuk parameter kuantitatif metode HPLC membutuhkan data berupa luas puncak atau tinggi puncak yang ditentukan oleh konsentrasi solute (Salamah & Guntarti, 2023). Prinsip kerja HPLC didasarkan pada pemisahan komponen analit sesuai dengan tingkat polaritasnya. Setiap campuran yang keluar dari kolom akan terdeteksi oleh detector dan hasilnya akan direkam dalam bentuk kromatogram. Jumlah puncak pada kromatogram menunjukkan jumlah komponen yang ada, sedangkan luas puncak mencerminkan konsentrasi masing-masing komponen (Unique, 2016).

Pemilihan metode HPLC sebagai instrument analisis senyawa metabolit didasarkan pada beberapa keunggulan yang dimiliki metode ini, antara lain; waktu analisis yang singkat, membutuhkan volume sampel yang minim, memiliki kemampuan untuk menganalisis senyawa organik dan anorganik, serta mampu untuk menggunakan kolom kembali (Amin, dkk., 2016). HPLC banyak digunakan dalam bidang kimia bahan alami sebab dapat mengukur kandungan senyawa bioaktif dalam ekstrak tanaman secara kualitatif dan kuantitatif (Unique, 2016).

2.8 Kerangka Konseptual

Kebutuhan gula nasional Indonesia semakin meningkat dari tahun ke tahun. Penurunan produksi tebu pada tahun 2020 mengakibatkan Indonesia tidak mampu memenuhi kebutuhan gula nasional mengharuskan Indonesia untuk mengimpor gula sebanyak 14,4% produk gula mentah dunia (Artono, dkk., 2024). Tren

kesehatan yang sedang berkembang saat ini menyebabkan banyak masyarakat Indonesia yang mulai melirik alternatif lain bahan pemanis yang berasal dari alam (Sulandari, dkk., 2024) (Gambar 2.11).

Stevia adalah tanaman obat yang memiliki metabolit sekunder steviosida dengan rasa manis 300 kali lebih manis dibandingkan gula tebu dengan kandungan kalori lebih rendah (Chiew, dkk., 2024). Hal ini menjadi daya tarik bagi sebagian orang sebab dirasa lebih sehat (Tappy, 2018). Namun pengembangan stevia sebagai tanaman pemanis pendamping gula tebu di Indonesia mengalami kesulitan sebab beberapa faktor lingkungan seperti terlalu tingginya temperature dan kelembaban yang terlalu rendah (Husna, dkk., 2018). Hal dapat menyebabkan kandungan metabolit pada stevia mengalami penurunan (Tavarini, dkk., 2020) (Gambar 2.11).

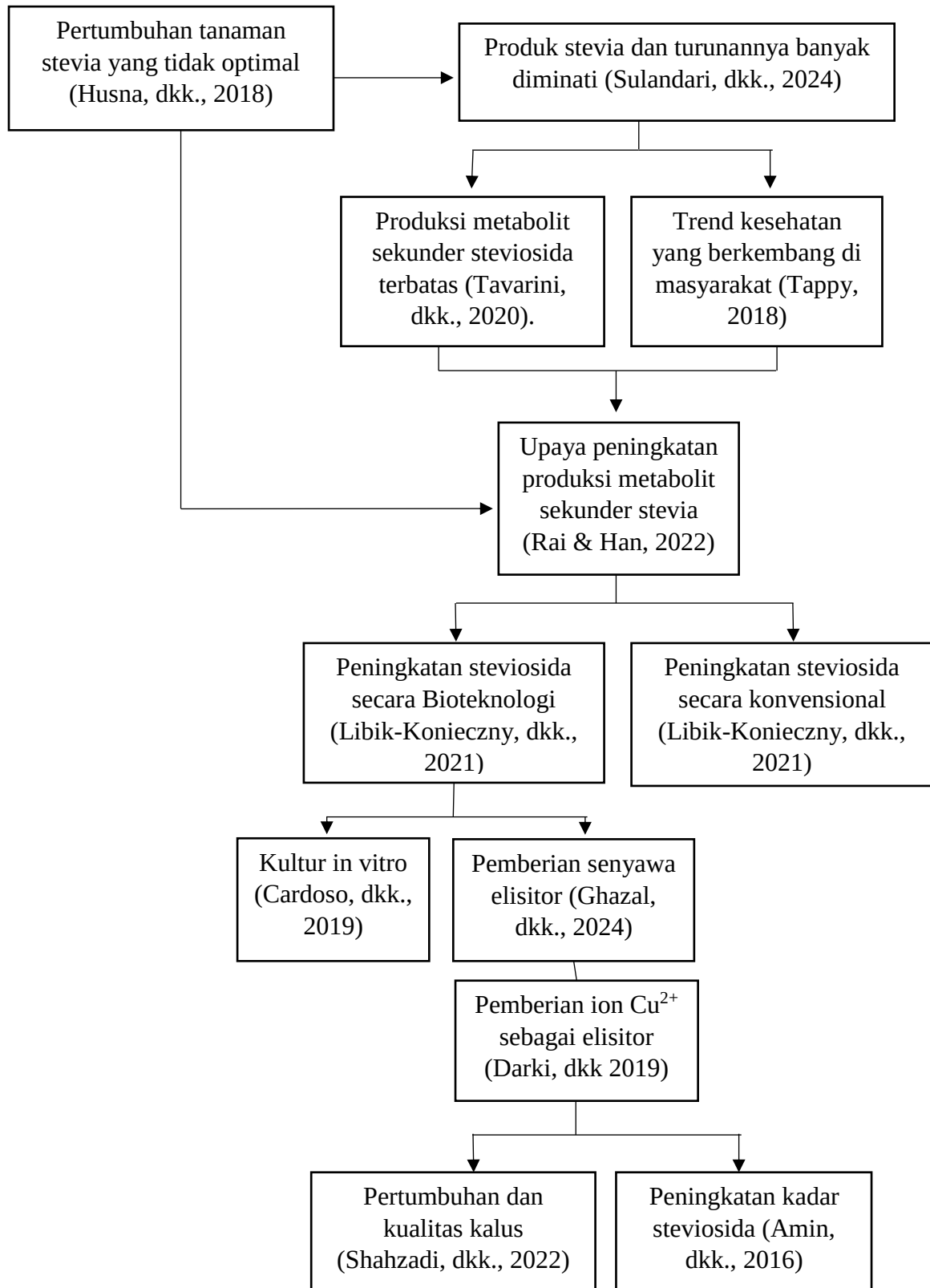
Peningkatan senyawa steviosida (Gambar 2.11) dapat dilakukan dengan berbagai macam perlakuan fisik dan kimia (Rai & Han, 2022), secara konvensional peningkatan senyawa metabolit sekunder dapat dilakukan dengan pemilihan kultivar, induksi poliploid, dan manipulasi faktor biotik dan abiotik yang mempengaruhi pertumbuhan tanaman stevia. Sedangkan secara bioteknologi dapat dilakukan dengan mikropropagasi, pemberian senyawa elisitor atau stres salinitas selama tahapan mikropropagasi, dan kultur sel, kalus, atau akar adventif (Libik-Konieczny, dkk., 2021). Kultur in vitro biasa digunakan untuk meningkatkan kandungan senyawa metabolit pada tanaman dengan kelebihan dapat menghasilkan tanaman dalam kuantitas besar dan waktu yang singkat, dengan tingkat keseragaman tinggi, dan produksi metabolit sekunder yang meningkat (Cardoso, dkk., 2019). Penambahan zat elisitor pada teknik kultur in-vtro juga dapat

meningkatkan kandungan senyawa metabolit sekunder pada tanaman (Ghazal, dkk., 2018).

Senyawa elisitor (Gambar 2.11) yang ditambahkan pada media tanam kultur in vitro beragam, salah satunya yang biasa digunakan ialah golongan logam berat seperti ion Cu^{2+} . Penelitian terkait peningkatan senyawa metabolit sekunder telah banyak dilakukan sebelumnya, misal pada kalus *Artemisia annua* yang diberikan elisitor ion Cu^{2+} berhasil meningkatkan senyawa artemisinin sebanyak 0,00790% dengan penambahan 7,5 ppm Cu^{2+} (Darki, dkk., 2019).

Pertumbuhan dan kualitas kalus yang diberikan konsentrasi ion Cu yang berbeda juga akan menghasilkan respon yang berbeda. Ion Cu dalam konsentrasi tinggi dapat menyebabkan kerusakan sel yang berujung pada kematian. Sedangkan dalam konsentrasi yang lebih rendah, ion Cu berperan penting sebagai kofaktor dari beberapa enzim katalitik yang berhubungan dengan pertumbuhan dari kalus (Ahmad, dkk., 2020). penelitian yang dilakukan oleh Shahzadi, dkk (2022) pada kalus stevia yang diberikan perlakuan konsentrasi ion Cu^{2+} mengalami peningkatan dari perlakuan kontrol sebesar 1,79 gr menjadi 2,77 gr pada perlakuan optimal yang diberikan konsentrasi 50 μM Cu.

Konsentrasi steviosida dalam kalus stevia dapat diketahui melalui teknik analisis menggunakan teknik kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) atau *high performance liquid chromatography* (HPLC). Teknik ini dipilih sebagai instrument analisis senyawa metabolit didasarkan pada beberapa keunggulan yang dimiliki metode ini, antara lain; waktu analisis yang singkat, membutuhkan volume sampel yang minim, memiliki kemampuan untuk menganalisis senyawa organik dan anorganik, serta mampu untuk menggunakan kolom kembali (Amin, dkk., 2016).



Gambar 2.11 Kerangka Konseptual

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) satu faktorial yaitu pemberian konsentrasi ion Cu^{2+} . Pemberian konsentrasi ion Cu^{2+} diberikan sebanyak lima macam konsentrasi yaitu kontrol (0 mg/L), 1 mg/L, 2 mg/L, 5 mg/L, dan 10 mg/L. Hal ini mengacu pada pemberian konsentrasi ion Cu^{2+} pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Zarad, dkk (2021) pada bahan tanam daun *Artemisia annua* yang berhasil meningkatkan metabolit sekunder dengan pemberian 2 mg/L CuSO_4 . Tanaman *Artemisia annua* masih berasal dari satu famili yang sama dengan stevia yaitu berasal dari famili *Asteraceae* (Septembre-Malaterre, dkk., 2020). Setiap konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak lima kali sehingga terdapat 25 unit percobaan. Setiap unit percobaan terdiri dari tiga eksplan, maka total eksplan yang digunakan sebanyak 75 eksplan. Denah percobaan dapat dilihat pada tabel 3.1

Tabel 3.1 Denah Percobaan

Perlakuan				
C1	A2	B3	D4	B5
A1	B2	C3	E4	A5
B1	E2	E3	C4	D5
E1	C2	D3	B4	C5
D1	D2	A3	A4	E5

Keterangan :

A : Kontrol (0 mg/L Cu^{2+})

B : 1 mg/L Cu^{2+}

C : 2 mg/L Cu^{2+}

D : 5 mg/L Cu^{2+}

E : 10 mg/L Cu^{2+}

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari - Maret 2025. Induksi kalus dan pengamatan kalus dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Tahapan ekstraksi kalus stevia dan uji kandungan steviosida dilakukan di Laboratorium Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Kristen Satya Wacana.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ion Cu^{2+} yaitu kontrol (0 mg/L), 1 mg/L, 2 mg/L, 5 mg/L, dan 10 mg/L.
2. Variabel terikat pada penelitian ini meliputi berat basah, tekstur, warna, dan kandungan steviosida pada kalus tanaman stevia
3. Variabel terkendali pada penelitian ini meliputi media tanam yang digunakan (media MS), suhu diatur pada 21°C , intensitas cahaya 1.000 lux, konsentrasi 2,4-D yang digunakan yaitu 2 mg/L, dan pH media tanam diatur pada skala 5,8-6,1.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian antara lain botol kultur, *wareglasses* (cawan petri, Erlenmeyer, gelas ukur, *beaker glass*), pipet volume, pipet tetes, mikropipet, sendok, neraca analitik, *hot plate*, *stirrer bar*, pHmeter, microwave, *autoclave*, korek api, bunsen, alat diseksi (gunting, pinset, *scalpel*), *laminar air flow* (LAF), lampu penyorotan, rak kultur, penggaris, kertas miliblock, *hand sprayer*,

dan *blade* no. 21. Alat selanjutnya yang dibutuhkan untuk ekstraksi kalus stevia antara lain oven, alu dan mortar, ultrasonikator tipe probe UP400S. Pengukuran kadar steviosida dilakukan menggunakan dengan alat *high performance liquid chromatography* (HPLC) Kneur seri *smart line*.

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi bahan tanam (eksplan) yang berupa daun muda tanaman stevia. Daun muda stevia dipilih sebagai eksplan pada kultur in vitro kalus sebab menurut penelitian kandungan glikosida steviol paling banyak terdapat di bagian daun (Gupta, dkk., 2016). Selain itu, daun memiliki daya regenerasi yang tinggi dan mudah didapatkan sebab bahan induknya tersedia secara luas (Millenia, dkk., 2022). Pembuatan media membutuhkan larutan stok media MS yang ditambahkan 2 mg/L 2,4-D yang digunakan sebagai zat pengatur tumbuh untuk menginduksi pembentukan kalus. Hal ini didasarkan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Buana (2020) dengan konsentrasi 2 mg/L 2,4-D secara optimal mampu merangsang pembentukan kalus stevia hingga persentase tumbuhnya sebesar 100% (Buana, 2020). Bahan selanjutnya adalah sukrosa, agar, aquades, natrium hipoklorit (NaOCl), NaOH, HCl, elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, steviosida, detergen, fungisida, bakterisida, etanol, alkohol 70% dan 96%, betadine, plastik tahan panas, karet gelang, kertas label, alumunium foil, *ethanol pro analysis grade* dari E-Merck Jerman, *asetonitril LC grade* dari E-Merck Jerman, *methanol LC grade* dari dari E-Merck Jerman, *tri fluora acetic acid pro analysis grade* dari dari E-Merck Jerman, *steviosida standart derajat kemurnian minimum 99,0%* dari WAKO Jepang, *rebaudiosida A standart derajat kemurnian minimum 99,0%* dari WAKO Jepang, *rebaudiosida D standart derajat kemurnian*

minimum 99,0% dari WAKO Jepang, akuades bebas ion dari Lab. Kimia FSM UKSW, membrane filter nylon 0,45 μ m D 25 mm dari whatman Inggris, membrane filter nylon 0,45 μ m D 47 mm dari whatman Inggris.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pembuatan Media Induksi Kalus

Media tanam dibuat dengan menggunakan larutan stok media MS. Mulanya dilakukan penimbangan pada gula, dan agar masing-masing sebanyak 30 gram dan 11 gram menggunakan timbangan analitik. Kemudian masukkan sebanyak 1000 mL aquades pada *beaker glass* yang sebelumnya telah diletakkan diatas *hot plate*. Selanjutnya aquades tersebut ditambahkan gula 30 gram, 50 mL unsur makro, 10 mL unsur mikro, 10 mL Myo-Inositol, 10 mL NaFeEDTA, dan 1 mL vitamin yang merupakan komposisi penyusun media MS. Setelah semua bahan dimasukkan, selanjutnya dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* hingga dirasa semua bahan menjadi homogen. Selanjutnya ditambahkan 2,4-D sebanyak 2 mg/L dan dihomogenkan kembali menggunakan *magnetic stirrer*. Langkah selanjutnya adalah dilakukan pengukuran pH pada larutan media sekitar 5,8-6,1. Jika nilai pH >6,1 maka akan ditetesi larutan HCl sedikit demi sedikit sembari dihomogenkan agar nilai pH nya turun, sebaliknya jika nilai pH <5,8 maka akan ditetesi larutan NaOH sedikit demi sedikit sembari dihomogenkan agar nilai pH nya naik. Setelah pH larutan media sudah sesuai, langkah selanjutnya adalah memasukkan agar sebanyak 11 gram dan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*. Setelah itu, media dimasak menggunakan *microwave* selama 7 menit 30 detik. Kemudian media dimasukkan pada botol kultur dengan ketebalan 12,5 mL dan dibungkus rapat menggunakan plastik tahan panas serta diikat dengan karet pentil. Selanjutnya

media di sterilisasi basah menggunakan *autoclave* selama 60 menit dengan suhu 121°C.

3.5.2 Pembuatan Media Elisitasi

Media elisitasi dibuat menggunakan media MS yang ditambahkan dengan konsentrasi ion Cu^+ yang telah ditentukan sebelumnya. Konsentrasi ion Cu^{2+} yang digunakan pada media adalah 1 mg/L, 2 mg/L, 5 mg/L, dan 10 mg/L.

3.5.3 Persiapan Bahan Tanam

Bahan tanam yang berupa daun muda tanaman stevia mulanya dicuci bersih dengan air mengalir, dilakukan perendaman dengan sabun bayi selama 10 menit. Kemudian dilanjutkan dengan perendaman dengan larutan fungisida dan bakterisida 1,5% selama 10 menit (Cahyono & Riani Ningsih, 2023). Setelah itu, dilakukan pembilasan menggunakan aquades masing-masing perlakuan sebanyak tiga kali untuk memastikan eksplan daun stevia sudah bersih dari sisa-sisa zat yang digunakan. Persiapan bahan tanam selanjutnya dilakukan di dalam *laminar air flow* (LAF) menggunakan larutan *clorox* 5% dan 10% masing-masing selama 3 menit, setelah itu dilakukan pembilasan menggunakan aquades steril untuk membersihkan sisa-sisa bahan kimia yang menempel. Daun stevia kemudian direndam menggunakan larutan alkohol 70% selama 1 menit. Pembilasan menggunakan aquades steril sebanyak tiga kali dilakukan kembali untuk memastikan bahwa daun stevia benar-benar bersih dari sisa-sisa bahan kimia yang digunakan dalam tahapan sterilisasi.

3.5.4 Inisiasi Bahan Tanam

Inisiasi daun stevia dilakukan di dalam *laminar air flow* (LAF) untuk menghindari kontaminasi. Sebelum dilakukan penanaman pada media MS,

sebelumnya daun stevia dipotong terlebih dahulu dengan ukuran sekitar 1 cm menggunakan alat diseksi (*scalpel* dan *blade*). Inisiasi dilakukan dengan melewati potongan daun stevia di dekat api bunsen dan langsung ditanam ke media MS dengan posisi permukaan daun menyentuh media.

Daun stevia akan ditanam pada media MS selama 15 hari hingga muncul kalus pada permukaan daun stevia. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Buana (2020) yang berhasil menumbuhkan kalus daun stevia pada hari ke-14 HST dengan pemberian 2 mg/L 2,4-D.

3.5.5 Penanaman Kalus Pada Media Elisitasi

Kalus daun stevia yang telah berumur 15 HST dengan berat 0,01 g kemudian dipindahkan ke media elisitasi dengan konsentrasi ion Cu^{2+} yang telah ditentukan sebelumnya. Hal ini dilakukan untuk mengetahui perubahan volume sel pada setiap perlakuan setelah dipindahkan pada media elisitasi. Selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Fadilah (2023) pada kalus *Tithonia diversifolia* yang memindahkan sebanyak 0,01 gram kalus pada media perlakuan untuk mengetahui pertumbuhan massa sel. Penanaman kalus dilakukan secara aseptis di dalam *laminar air flow* (LAF) menggunakan pinset.

3.5.6 Pemeliharaan Selama Perlakuan

Kalus pada media diinkubasi pada ruangan steril dengan suhu 21°C selama 15 hari setelah subkultur kalus ke media elisitasi. Sesuai dengan penelitian produksi flavonoid dan fenolik kalus tanaman *Tithonia diversifolia* yang ditingkatkan dengan elisitor CuSO_4 yang diinisiasi selama 15 hari (Fadilah, 2023). Setiap dua hari sekali akan dilakukan pengecekan dan penyemprotan dengan alkohol 70% untuk mencegah terjadinya kontaminasi.

3.6 Parameter Pengamatan

3.6.1. Parameter Kuantitas

Parameter kuantitas pada penelitian ini mengacu pada pengukuran berat basah kalus stevia setelah dipindahkan ke media elisitasi. Pengamatan berat basah kalus dilakukan setelah kalus berumur 30 HST dengan menimbang kalus menggunakan timbangan analitik dengan satuan gram. Kalus basah memiliki kandungan metabolit sekunder yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan kalus kering dengan efisiensi ekonomi dan proses yang lebih ringan penanganan dan ekstraksinya (Ng Mei, dkk., 2016). Oleh karena itu, kalus basah lebih cocok untuk digunakan sebagai bahan tanam untuk peningkatan produksi metabolit sekunder.

3.6.2. Parameter Kualitas

Parameter kualitas pada penelitian ini meliputi:

3.6.2.1 Tekstur Kalus

Pengamatan testur kalus dilakukan secara visual pada akhir penelitian setelah kalus berumur 30 HST. Tekstur kalus dapat dibedakan menjadi tiga macam yaitu; (1) kompak (2) remah dan (3) intermediat (Tarigan, dkk., 2023). Kalus dibedakan dengan memperhatikan tekstur yang terbentuk pada kalus.

3.6.2.2 Warna Kalus

Pengamatan warna kalus dilakukan diakhir penelitian ketika kalus telah berumur 30 HST. Pengamatan dilakukan secara visual dengan bantuan aplikasi *colour grab* untuk menentukan warna yang dihasilkan oleh kalus.

3.6.3. Analisis Kandungan Steviosida

Analisis kandungan steviosida dilakukan dalam dua tahap sebagai berikut:

3.6.3.1 Ekstraksi Kalus Stevia

Ekstraksi dilakukan pada kalus daun stevia yang memiliki berat basah minimum 0,01 gram dengan memasukkan kalus dalam lemari pengering pada suhu 40°C selama 24 jam. Kemudian sebanyak 500 mg kalus kering dihaluskan dengan baik menggunakan mortar dan alu. Selanjutnya sebanyak 500 mg serbuk kalus ditimbang dalam wadah kaca dan ditambahkan dengan 25 ml *ethanol* 60% v/v. Tahapan ekstraksi dilakukan selama 15 menit dalam alat ultrasonikator tipe probe UP400S, 24 kHz yang telah diatur pada suhu 40°C. Larutan ekstrak disaring menggunakan membrane filter nylon 0,45 µm D 25 mm dan 47 mm dari whatman Inggris, dan filtratnya ditampung, sementara residunya diekstrak ulang dengan 25 ml *ethanol* 60% v/v. Tahapan ini diulang sebanyak tiga kali dan filtratnya digabung menjadi satu. Seluruh filtrate ditampung di dalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan dengan pelarut *ethanol* 60% v/v hingga garis batas tera. Larutan ekstrak yang diperoleh berkonsentrasi 5 mg/ml.

3.6.3.2 Analisis Senyawa Steviosida Menggunakan HPLC

Larutan ekstrak disaring dengan nylon membrane filter whatman 0,45µm, filtrate siap untuk diaplikasikan ke dalam instrument HPLC Knauer seri *smart line* yang kondisinya sudah diatur sesuai kondisi operasional berikut, fase diam (kolom) menggunakan Eurosphere C-18 (250 x 4.6 mm, 5 µm) DJ 142, fase gerak (solvent) menggunakan (H₂O:methanol)_{pH3} : Asetonitril : TFA (65:35:0.01 v/v/v), kecepatan aliran sebesar 0,6 ml/menit, temperature kolom diatur pada suhu 30°C, panjang gelombang dideteksi menggunakan UV/VIS dengan panjang gelombang 210 nm yang dideteksi sebagai steviosida, dan volume injeksi yang digunakan memiliki kapasitas 20µl. Setelah instrument HPLC telah diatur dengan kondisi yang

ditentukan, sebanyak 60 ml filtrate diinjeksikan ke dalam *injector loop* berkapasitas 20 μ l, dengan posisi tombol pada kondisi *load*, proses analisa dimulai dengan mengubah posisi injector ke posisi *inject*. Data kromatogram akan terekam dan tersimpan secara otomatis.

3.6.3.3 Perhitungan Kadar Steviosida

Mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Kartikasari, dkk (2018) penentuan kadar steviosida secara kuantitatif membutuhkan larutan standar steviosida murni. Larutan standar yang dibuat yaitu, 20 μ g, 40 μ g, 60 μ g, 80 μ g, 100 μ g untuk mengetahui luas area pada larutan standar yang nantinya digunakan sebagai acuan pembuatan kurva kalibrasi (Lampiran 2). Berdasarkan kurva kalibrasi (Lampiran 2) diperoleh persamaan garis y

$$y = 1.7538x + 10.742$$

dengan:

y : area puncak
 x : konsentrasi steviosida (μ g/ml)

Konsentrasi steviosida dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar Steviosida } (\mu\text{g/ml}) = \frac{(\text{area} \cdot 1000) - b}{m}$$

$$\text{Kadar Steviosida/ kadar uji } (\mu\text{g/ml}) = \frac{(\text{area} \cdot 1000) - 10.742}{1.7538}$$

dengan:

Area puncak : luas puncak steviosida yang diperoleh dari hasil kromatografi
 m : slope dari persamaan regresi standar
 b : intersep dari persamaan regresi

Setelah kadar steviosida diketahui, selanjutnya adalah menghitung kadar ekstrak dan kadar sampel. Kadar ekstrak diperoleh dengan rumus seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Permatasari (2018)

$$\text{Kadar Ekstrak } (\mu\text{g/ml}) = \text{kadar steviosida} \times \text{fp}$$

dimana:

fp : Faktor pengenceran

Setelah kadar ekstrak diperoleh, selanjutnya adalah menentukan kadar sampel (% b/b) seperti yang telah dilakukan oleh Kartikasari, dkk (2018) dengan rumus:

$$\text{Kadar Sampel (\% b/b)} = \frac{\text{kadar ekstrak } (\mu\text{g/ml})}{\text{berat sampel awal } (\mu\text{g/ml})} \times 100\%$$

3.7 Analisis Data

Penelitian ini menghasilkan dua data yang berupa data kuantitatif dan data kualitatif. Data kuantitatif berupa berat basah kalus dianalisis menggunakan *software* SPSS 21. Mulanya data kuantitatif akan dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Jika data menunjukkan nilai sig >0,05 maka data dikatakan normal dan homogen. Setelah itu, dilanjutkan dengan dilakukannya uji analisis variansi (ANOVA) untuk mengetahui adanya pengaruh ion Cu^{2+} terhadap berat basah kalus stevia. Jika nilai menunjukkan sig <0,05 maka dikatakan terdapat pengaruh yang signifikan pada data. Maka akan dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan atau DMRT taraf 5%. Sedangkan data kualitas berupa tekstur dan warna kalus dianalisis secara visual. Adapun data analisis kadar steviosida menggunakan HPLC baik secara kuantitatif yang berupa data luas puncak atau tinggi puncak maupun data kualitatif berupa waktu retensi dijelaskan secara deskriptif.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Media Elisitasi Cu^{2+} Terhadap Berat Basah Kalus Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

Berat basah kalus yang ditumbuhkan pada media elisitasi menggunakan elisitor ion Cu^{2+} menunjukkan adanya penambahan berat basah kalus jika dibandingkan dengan kalus yang ditumbuhkan di media kontrol (Tabel 4.1). Pada penelitian ini, perlakuan optimal yang dapat meningkatkan berat basah kalus terdapat pada perlakuan konsentrasi 2 mg/L ion Cu^{2+} dengan berat basah kalus sebesar 0,142 g. Data berat basah kalus stevia pada setiap perlakuan konsentrasi ion Cu^{2+} disajikan dalam tabel 4.1

Tabel 4.1 Berat basah kalus dari eksplan daun stevia (*Stevia rebaudiana*) yang ditumbuhkan pada media elisitasi ion Cu^{2+}

No.	Perlakuan	Berat Basah Kalus (gram)
1.	Kontrol (0 mg/L Cu^{2+})	0,078 ^a
2.	1 mg/L Cu^{2+}	0,124 ^b
3.	2 mg/L Cu^{2+}	0,142 ^c
4.	5 mg/L Cu^{2+}	0,122 ^b
5.	10 mg/L Cu^{2+}	0,116 ^b

Keterangan: Angka pada kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda pada uji DMRT 5%

Penambahan berat kalus menandakan bahwa kalus yang ditumbuhkan pada media elisitasi ion Cu^{2+} mengalami pertumbuhan yang baik (Sari, dkk., 2014). Kandungan ion Cu^{2+} pada media tidak menyebabkan pertumbuhan kalus menjadi terhambat sebab konsentrasi yang diberikan masih dapat ditoleransi oleh sel-sel tanaman kalus tanaman stevia. Sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh

Hajar, dkk (2014) menyebutkan bahwa tanaman stevia mampu mengakumulasi ion Cu^{2+} sekitar 6,94 mg/kg pada bagian daun.

Ion Cu^{2+} merupakan mikronutrisi yang berperan dalam pembentukan kofaktor molybdenum (MoCo) yang diperlukan untuk biosintesis asam absisat (ABA) dan auksin Indol-3-asetat (IAA) melalui indol-3-aldehida, serta terlibat dalam degradasi poliamina (PA) (Peñarrubia, dkk., 2015). Hal ini menunjukkan bahwa ion Cu^{2+} berpengaruh terhadap modulasi gen yang terkait dalam regenerasi atau aktivitas pengatur pertumbuhan endogen (Miguel, 2023). Konsentrasi yang tepat ion Cu^{2+} dapat membantu tahapan regenerasi dan perkembangan tanaman. Selain itu, pada saat proliferasi kalus dan pembelahan sel terjadi, laju respirasi dalam sel meningkat sehingga dibutuhkan ion Cu^{2+} dengan konsentrasi yang lebih tinggi sebab ion Cu^{2+} berperan penting dalam proses respirasi (Yruela, 2009). Selanjutnya metalloenzim ion Cu^{2+} berperan penting dalam pembelahan sel dan diferensiasi sel sebagai prekursor dalam biosintesis dinding sel (Miguel, 2023; Mydy, dkk., 2021).

Pemberian konsentrasi ion Cu^{2+} dapat meningkatkan berat basah pada kalus tanaman stevia. Perlakuan yang diberikan pada kalus tanaman stevia (Tabel 4.1) menunjukkan bahwa pertumbuhan berat basah kalus menunjukkan pola dosis-respon sigmoidal. Pemberian konsentrasi 2 mg/L ion Cu^{2+} memberikan peningkatan pada berat basah sebesar 82,05%, kemudian pertumbuhan kalus mengalami penurunan dengan ditamapkannya konsentrasi ion Cu^{2+} . Selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Zarad, dkk (2021) pada kalus *Artemisia annua* yang juga mengalami penurunan pertumbuhan ketika diberikan dosis diatas 2 mg/L ion CuSO_4 . Hal ini terjadi sebab ion Cu^{2+} merupakan mikronutrisi yang penting bagi

tanaman (Baroni-nezhad, dkk., 2021). Ion Cu^{2+} memerankan peran penting dalam pensinyalan transkripsi, pergerakan protein di dalam sel, mobilisasi zat besi, fosforilasi oksidatif, dan berperan sebagai kofaktor untuk enzim katalitik (Shahzadi, dkk., 2022). Namun kelebihan ion Cu^{2+} dalam sel juga dapat menyebabkan fototoksik pada sel yang mengakibatkan penghambatan pertumbuhan sel dan berujung pada kematian sel (Nurcahyani, dkk., 2008).

Pemberian konsentrasi ion Cu^{2+} yang tepat akan membantu sel tanaman untuk bertumbuh. Hal ini terbukti dengan pemberian konsentrasi ion Cu^{2+} 1-10 mg/L pada penelitian ini yang dapat meningkatkan berat basah kalus tanaman stevia dengan perlakuan optimal terdapat pada pemberian konsentrasi 2 mg/L ion Cu^{2+} . Selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Shahzadi, dkk (2022) pada kalus stevia yang diberikan perlakuan konsentrasi ion Cu^{2+} mengalami peningkatan dari perlakuan kontrol sebesar 1,79 g menjadi 2,77 g pada perlakuan optimal yang diberikan konsentrasi 50 μM Cu.

Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Zarad, dkk (2021) membuktikan bahwa pemberian ion Cu^{2+} dapat meningkatkan berat basah kalus tanaman *Atermisia annua* dengan perlakuan optimal menghasilkan berat basah kalus sebesar 1,29 gr yang diberikan konsentrasi ion CuSO_4 2 mg/L. Ion Cu^{2+} dalam konsentrasi rendah tidak bersifat toksik bagi tanaman, namun sebaliknya dapat merangsang pertumbuhan sel tanaman dengan berperan sebagai kofaktor berbagai enzim pertumbuhan (Shahzadi, dkk., 2022). Selain itu, ion Cu^{2+} juga merupakan bagian penting dari plastosianin dalam rantai transpor elektron dalam reaksi fotosintesis (Hindarti & Larasati, 2019). Reaksi fotosintesis sangat penting untuk pertumbuhan,

pada kalus pertumbuhan dapat ditandai dengan penambahan berat basah kalus (Ulva, dkk., 2019).

Ion Cu^{2+} memainkan peran penting dalam morfogenesis tanaman (Miguel, 2023). Ion Cu^{2+} dengan konsentrasi 1-5 μg sangat penting bagi pertumbuhan tanaman (Kumar, dkk., 2021). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ion Cu^{2+} dapat meningkatkan merangsang pertumbuhan dan perkembangan serta meningkatkan berat segar pada tanaman anggrek *Dendrobium kingianum* Bidwil yang diberikan konsentrasi ion Cu^{2+} sebesar 2,5 mg (Pražak & Molas, 2015). penelitian lainnya membuktikan bahwa ion Cu^{2+} dalam konsentrasi rendah dapat meningkat proliferasi sebesar $312 \pm 1,79\%$ pada kalus tanaman kurma yang diberikan konsentrasi ion CuSO_4 sebesar 2 $\mu\text{M/L}$ (AL-Mayahi, 2013).

Ion Cu^{2+} yang diberikan pada media pertumbuhan kalus selain dapat meningkatkan berat basah kalus juga dapat menyebabkan penurunan berat basah kalus seiring dengan peningkatan konsentrasi ion Cu^{2+} . Hasil penelitian (Tabel 4.1) menunjukkan bahwa terjadi penurunan berat basah kalus seiring dengan bertambahnya konsentrasi ion Cu^{2+} yang diberikan dalam media tanam. Hal ini terjadi sebab dalam jumlah yang cukup tinggi ion Cu^{2+} dapat bersifat toksik bagi sel tanaman (Xu, dkk., 2024). Selaras dengan penelitian yang dilakukan pada kalus stevia yang diberikan ion Cu^{2+} sebesar 200 μM mengalami penurunan berat basah kalus jika dibandingkan dengan perlakuan optimal dengan berat kalus sebesar 1,84g (Shahzadi, dkk., 2022).

Penelitian lainnya menyebutkan bahwa pemberian konsentrasi 80 μM ion Cu^{2+} pada kalus tanaman *Rauvolfia serpentina* (L.) dapat menurunkan berat kalus jika dibandingkan dengan berat kalus kontrol (Nurcahyani, dkk., 2008). Hal ini

dapat terjadi sebab dalam konsentrasi yang lebih tinggi ion Cu^{2+} yang terakumulasi dalam sel dapat mengakibatkan kerusakan membran, kebocoran ion K^+ dan merusak organel sel yang akhirnya menyebabkan nekrosis sel (Shahzadi, dkk., 2022; Gao & Zhang, 2023). Selain itu, sel yang kekurangan ion K^+ akan mengalami penumpukan karbohidrat dan penurunan laju pati, sehingga menyebabkan penghambatan pada fotosintesis. Terhambatnya proses fotosintesis akan menyebabkan pertumbuhan kalus menjadi terhambat dan berat basah kalus yang dihasilkan juga akan semakin kecil (Nurcahyani, dkk., 2008).

Pemberian ion Cu^{2+} dalam konsentrasi tinggi pada kalus stevia menyebabkan penurunan berat basah kalus jika dibandingkan dengan perlakuan optimal, namun masih lebih berat jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Selaras dengan penelitian pada tanaman *S. lycopersicum* yang diberikan konsentrasi 50-500 μM ion Cu^{2+} menyebabkan penurunan berat basah kalus jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol (Kumari, dkk., 2022). Hal ini berhubungan dengan kelebihan ion Cu^{2+} pada sel yang dapat meningkatkan produksi spesies oksigen reaktif (ROS) yang menyebabkan kerusakan oksidatif dan degenerasi komponen seluler (Schmitt, dkk., 2020). Kerusakan oksidatif yang terjadi pada sel tanaman pada akhirnya akan menyebabkan penghambatan aktivitas fotosintesis. Aktivitas fotosintesis sangat penting bagi tanaman khususnya pada proses pertumbuhan dan perkembangan sel (Nurcahyani, dkk., 2008).

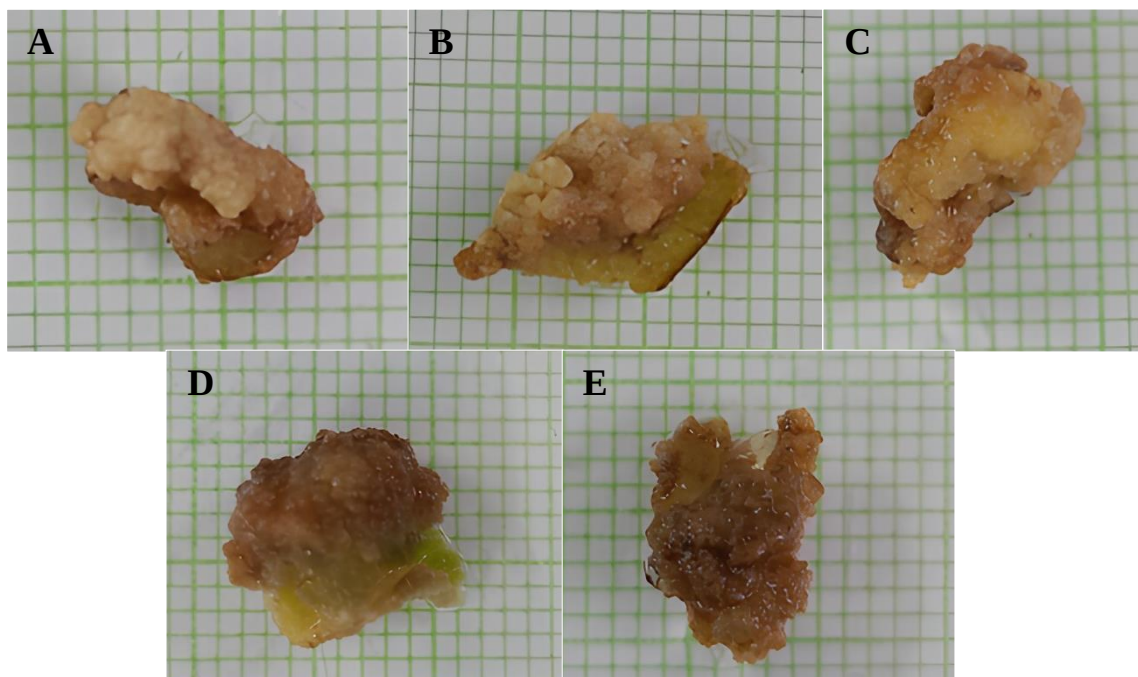
Respon kalus terhadap paparan logam berat yang diberikan di media tanam dapat berbeda dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti jenis dan konsentrasi dari logam berat yang digunakan, jenis dan genotip dari bahan tanam, dan jenis kultur yang diterapkan (Ratih Restiani, dkk., 2024). Oleh sebab itu, respon dari setiap

kalus akan menunjukkan hasil yang berbeda untuk setiap spesies tanaman yang terpapar oleh logam berat. Seperti penelitian yang dilakukan oleh Hendawey, dkk (2015) pada kalus stevia yang diberikan konsentrasi 8 ppm ion Si menghasilkan berat kalus sebesar 5 g. Penelitian lainnya dilakukan oleh Golkar, dkk (2018) menggunakan konsentrasi 60 mg/L ion Ag menghasilkan berat kalus sebesar 0,045 g.

4.2 Pengaruh Media Elisitasi Cu^{2+} Terhadap Warna dan Tekstur Kalus *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

Kalus stevia yang ditumbuhkan pada media tanam yang ditambahkan zat pengatur tumbuh 2,4-D memiliki tekstur kalus kompak (Gambar 4.1). Selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Mahadi, dkk (2016) pada tanaman *Citrus microcarpa* yang diberikan konsentrasi 2 mg/l 2,4-D. Penelitian lainnya dengan hasil serupa dilakukan pada kalus tanaman *Diospyros discolor* Willd yang diberikan konsentrasi 4 mg/l 2,4-D menghasilkan kalus dengan tekstur kompak (Illahi, dkk., 2022). Hal ini dapat terjadi sebab dalam konsentrasi yang tinggi 2,4-D dapat merangsang pembentukan kalus kompak (Rasud & Bustaman, 2020).

Ion Cu dalam konsentrasi rendah berperan dalam biosintesis dinding sel, melalui protein Cu lakase (LAC) yang terdapat dalam eksosom yang berperan dalam biosintesis lignin dan flavonoid, pigmentasi, pemeliharaan dan integritas dinding sel, serta toleransi stres garam (Xu, dkk., 2024). Oleh karena itu, kalus yang ditumbuhkan pada media elisitasi Cu^{2+} cenderung memiliki tekstur kalus kompak akibat proses lignifikasi yang diinduksi oleh penambahan ion Cu^{2+} dalam media tanam. Terbentuknya lignin pada dinding sel menyebabkan kalus memiliki tekstur yang kompak, keras dan padat (Zakiah & Turnip, 2024).



Gambar 4.1 Tekstur kalus daun stevia yang ditumbuhkan di media elisitasi

ion Cu^{2+} , (A) kontrol (0mg/l Cu^{2+}), (B) 1 mg/l Cu^{2+} , (C) 2 mg/l Cu^{2+} , (D) 5 mg/l Cu^{2+} , (E) 10 mg/l Cu^{2+} (Dokumentasi pribadi, 2025)

Pemberian konsentrasi ion Cu^{2+} yang berbeda ke dalam media tanam tidak mempengaruhi tekstur kalus yang terbentuk (Tabel 4.2). Kalus yang terbentuk pada kalus stevia yang ditanam di media elisitasi ion Cu^{2+} menghasilkan kalus yang memiliki tekstur kompak (Gambar 4.1). Hal ini menandakan bahwa ion Cu^{2+} yang ditambahkan ke dalam media tidak mempengaruhi pertumbuhan kalus stevia. Hal ini selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Nurchayati, dkk (2016) pada kalus tanaman *Datura metel* yang diberikan ion Cu^{2+} pada konsentrasi $5\text{-}15\text{ }\mu\text{M}$ tidak menyebabkan perubahan tekstur pada kalus. Hal ini membuktikan bahwa kalus yang diberikan paparan logam berat masih dapat beradaptasi pada cekaman logam serta memiliki tingkat akumulasi dan indeks toleransi yang tinggi (Ratih Restianin, dkk., 2024). Penelitian serupa juga dilakukan pada kalus stevia yang

diberikan perlakuan konsentrasi ion Cu 0,25-8 ppm yang menunjukkan tidak terjadinya perubahan tekstur pada kalus (Hendawey, dkk., 2014).

Kalus yang terpapar oleh logam berat Cu^{2+} menunjukkan respon yang berbeda terhadap warna yang dihasilkan setelah diberikan berbagai konsentrasi ion Cu^{2+} . Warna yang dihasilkan oleh kalus dipengaruhi oleh komposisi dan penambahan zat pengatur tumbuh pada media (Isda & Salsabilla, 2022). Hasil penelitian terhadap warna kalus yang ditumbuhkan pada media elisitasi ion Cu^{2+} disajikan pada tabel 4.2

Tabel 4.2 Warna dan tekstur kalus dari eksplan daun stevia (*Stevia rebaudiana*) yang ditumbuhkan pada media elisitasi ion Cu^{2+}

No.	Perlakuan	Warna Kalus	Tekstur kalus
1.	Kontrol (0 mg/L Cu^{2+})	Brown: yellow Hex: #AA9562	Kompak
2.	1 mg/L Cu^{2+}	Brown: yellow Hex: #A28C67	Kompak
3.	2 mg/L Cu^{2+}	Brown: yellow Hex: #9A8353	Kompak
4.	5 mg/L Cu^{2+}	Brown: orange Hex: #755B45	Kompak
5.	10 mg/L Cu^{2+}	Dark brown: orange Hex: #755435	Kompak

Kalus yang ditumbuhkan pada media kontrol (0 mg/l Cu^{2+}) menunjukkan warna coklat kekuningan. Warna yang dihasilkan oleh kalus kontrol menunjukkan bahwa kalus dalam kondisi yang baik (Ekawati, dkk., 2022). Penambahan 2,4-D sebagai zat pengatur tumbuh pada kalus stevia menghasilkan warna coklat kekuningan yang menunjukkan bahwa sel yang terdapat di dalam kalus merupakan

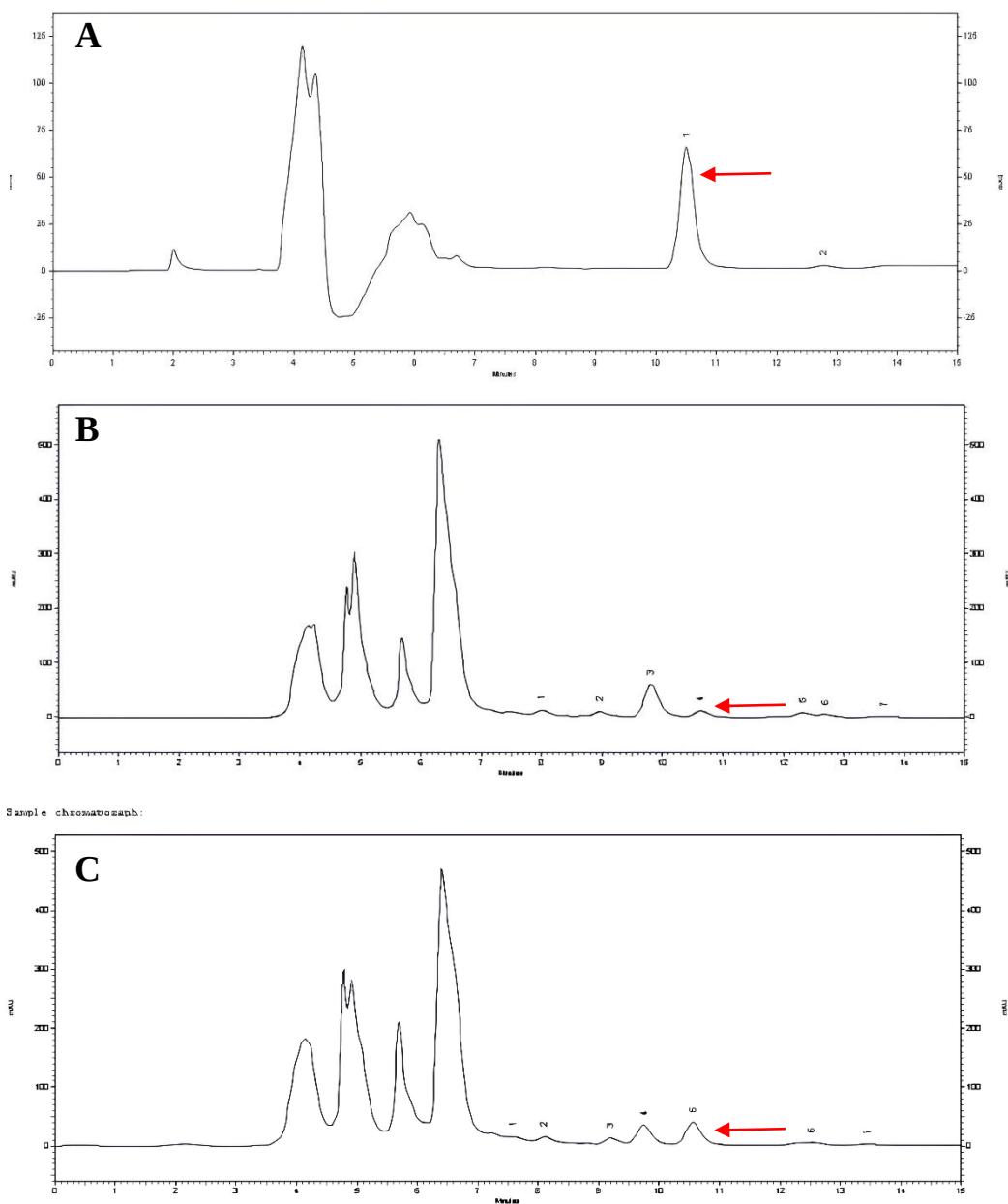
sel-sel dewasa menuju fase pembelahan aktif (Putu Merthaningsih, dkk., 2018). Selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Rasud & Bustaman (2020) pada kalus daun tanaman *Syzygium aromaticum* L. yang diberikan berbagai konsentrasi 2,4-D menghasilkan kalus berwarna coklat kekuningan.

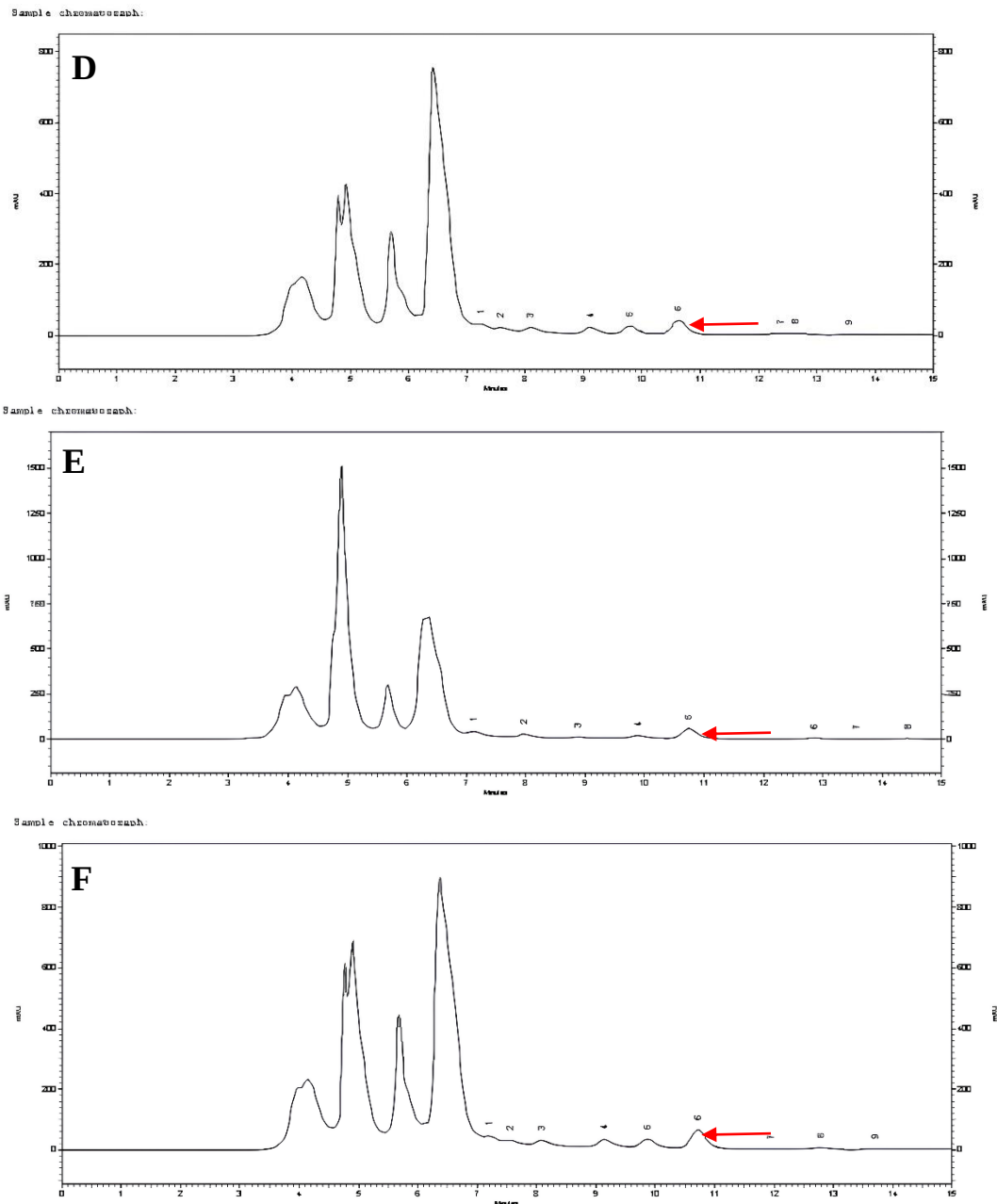
Ion Cu^{2+} yang ditambahkan pada media dapat menggantikan kofaktor seperti Mg^{2+} , Zn^{2+} atau Fe^{2+} yang terdapat dalam pigmen fotosintetik atau protein di dalam kloroplas. Hal ini menyebabkan perubahan warna pada kalus dengan mengubah komposisi ionik pigmen fotosintetik atau protein, menjadikannya tidak stabil atau tidak aktif yang mengarah pada degradasi pigmen kloroplas menyebabkan warna kalus menggelap (Xu, dkk., 2024). Selain itu, penumpukan ion Cu^{2+} yang berlebihan di dalam sel tanaman akan mengakibatkan peningkatan kandungan fenol pada kalus (Jańczak-Pieniżek, dkk., 2023). Penumpukan fenol pada kalus akan menyebabkan pencoklatan (*browning*) dan menyebabkan penurunan regenerasi pada kalus (Hutami, 2008).

Pemberian elisitor golongan logam berat dapat mempengaruhi warna yang terbentuk pada kalus. Penelitian yang dilakukan oleh Hendawey, dkk (2015) pada kalus stevia yang diberikan konsentrasi ion Fe 0,25-8 ppm menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ion Fe yang diberikan maka semakin tua pula warna kalus yang dihasilkan. Hal ini selaras dengan hasil penelitian ini yang menghasilkan warna yang semakin tua seiring dengan peningkatan ion Cu^{2+} yang diberikan. Penelitian serupa dilakukan oleh Restiana, dkk (2024) pada kalus tanaman *Talinum paniculatum* yang diberikan perlakuan konsentrasi ion Cr 0-3 ppm menunjukkan bahwa kalus mengalami perubahan warna menjadi lebih coklat saat diberikan konsentrasi ion Cr lebih dari 1 ppm.

4.3 Pengaruh Media Elisitasi Cu^{2+} Terhadap Kandungan Metabolit Sekunder Steviosida Kalus Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

Pemberian ion Cu^{2+} pada media pertumbuhan kalus menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kandungan senyawa steviosida pada kalus stevia. Hasil analisis menggunakan metode *high performance liquid chromatography* (HPLC) disajikan pada Gambar 4.2





Gambar 4.2 Grafik kromatografi senyawa steviosida, (A) sampel standar, (B) 0 mg/L, (C) 1 mg/L, (D) 2 mg/L, (E) 5 mg/L, (F) 10mg/. Keterangan : Senyawa steviosida ditunjukkan menggunakan panah merah

Hasil grafik kromatografi senyawa steviosida menampilkan waktu retensi, luas puncak, dan tinggi puncak yang berbeda-beda. Waktu retensi berfungsi untuk mengidentifikasi dan membedakan senyawa pada larutan ekstrak saat dianalisis pada alat analisis HPLC, sehingga waktu retensi setiap senyawa dapat berbeda-beda

(Sukma & Fajri., 2019). Penelitian sebelumnya oleh Kartikasari, dkk (2018) menunjukkan bahwa waktu retensi larutan standar steviosida memiliki waktu retensi yaitu 11,2675 menit. Maka senyawa steviosida dapat terbaca pada menit ke 10-11 pada metode analisis HPLC (Gambar 4.2).

Perbedaan luas puncak menunjukkan bahwa semakin luas puncak yang terbentuk pada grafik kromatografi maka semakin tinggi konsentrasi senyawa yang dianalisis. Sama halnya dengan luas puncak, tinggi puncak juga digunakan untuk mengetahui konsentrasi senyawa yang dianalisis. Semakin tinggi puncak, maka semakin tinggi pula konsentrasi senyawa (Tinungki, dkk., 2018). Hasil grafik kromatografi senyawa steviosida menampilkan waktu retensi, luas puncak, dan tinggi puncak diringkas pada tabel 4.3

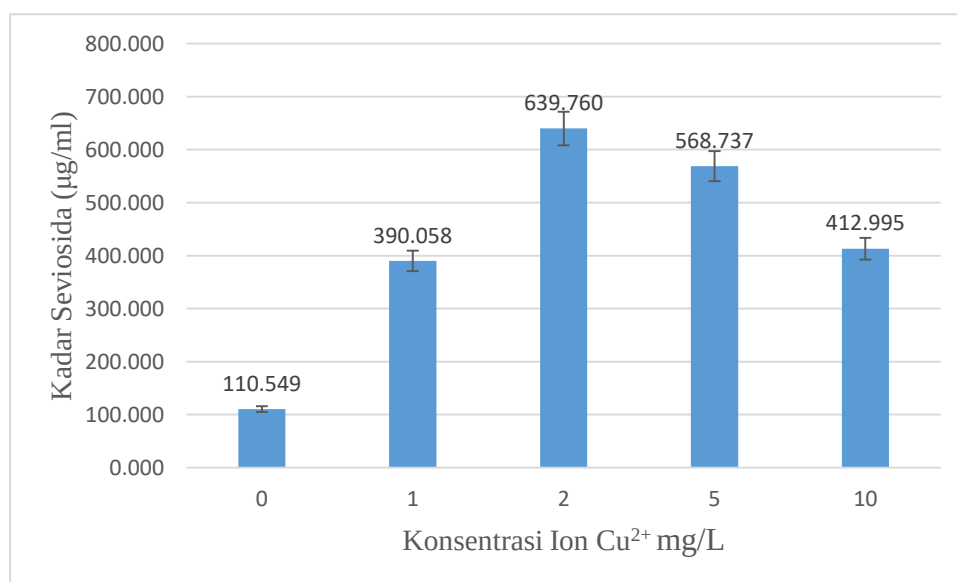
Tabel 4.3 Hasil analisis ekstrak kalus stevia menggunakan HPLC

No	Perlakuan	Waktu Retensi	Luas Puncak	Tinggi Puncak
1	Sampel standar	10.50	1150,741	64701
2	Kontrol/(0 mg/L Cu^{2+})	10.63	204,532	11410
3	1 mg/L Cu^{2+}	10.63	734,720	37733
4	2 mg/L Cu^{2+}	10.71	113,,239	61393
5	5 mg/L Cu^{2+}	10.75	1007,736	54095
6	10 mg/L Cu^{2+}	10.56	694,512	40068

Perbedaan luas puncak dan tinggi puncak pada grafik kromatografi menunjukkan konsentrasi senyawa pada larutan ekstrak yang dianalisis menggunakan HPLC (Unique, 2016). Pada grafik kromatografi senyawa steviosida perlakuan konsentrasi ion Cu^{2+} didapatkan bahwa perlakuan 2 mg/L ion Cu^{2+} merupakan perlakuan dengan luas puncak dan tinggi puncak tertinggi (Tabel 4.3).

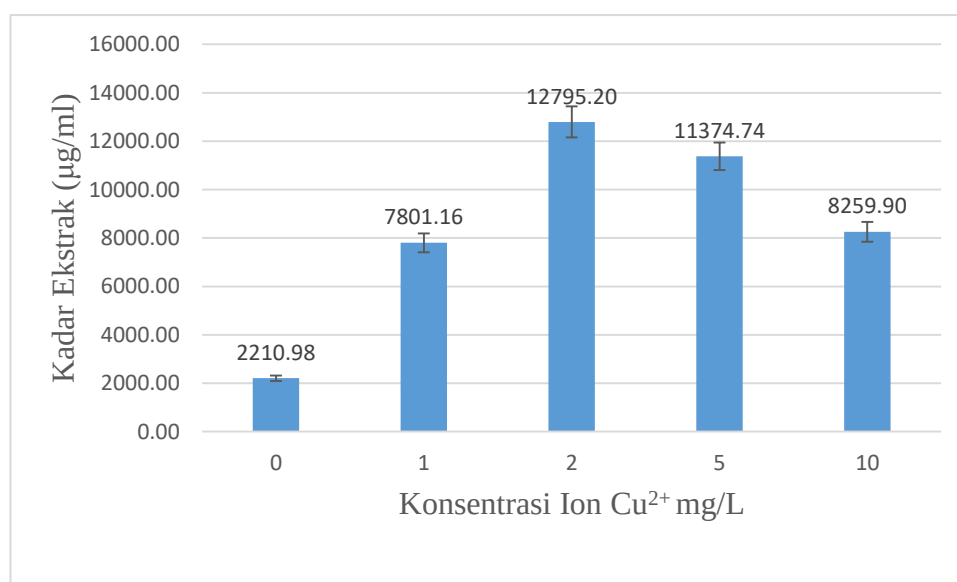
Luas puncak dan tinggi puncak dengan nilai yang tinggi menunjukkan bahwa kandungan senyawa steviosida dalam ekstrak kalus stevia perlakuan 2 mg/L ion Cu^{2+} memiliki kadar yang tinggi juga.

Penentuan kadar senyawa steviosida pada setiap perlakuan ditentukan menggunakan kurva baku steviosida dengan persamaan garis $y = 1,7538x + 10,742$ dengan nilai $R^2 = 0,9995$ (Lampiran 2). Kurva kalibrasi standar steviosida menunjukkan hubungan linier yang sangat kuat antara konsentrasi dan respon instrument. Nilai R^2 yang mendekati 1 menunjukkan bahwa perubahan luas puncak berbanding lurus secara proporsional terhadap perubahan konsentrasi. Oleh sebab itu, metode HPLC yang digunakan telah memenuhi kriteria linearitas dan dapat digunakan untuk menentukan kadar stevioisda dalam sampel. Berdasarkan hasil perhitungan persamaan garis y diperoleh hasil bahwa konsentrasi 2 mg/L ion Cu^{2+} merupakan perlakuan optimal yang mampu meningkatkan kadar steviosida pada kalus stevia sebesar 639.760 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini menunjukkan bahwa ion Cu^{2+} berperan penting dalam pembentukan senyawa metabolit sekunder. Hasil perhitungan kadar steviosida disajikan dalam bentuk diagram batang pada gambar 4.3



Gambar 4.3 Kadar steviosida pada setiap perlakuan konsentrasi ion Cu^{2+}

Pemberian ion Cu^{2+} mampu meningkatkan kadar steviosida pada kalus stevia, dibuktikan dengan adanya peningkatan kadar steviosida pada setiap perlakuan ion Cu^{2+} yang diberikan pada media tanam kalus stevia jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol (Gambar 4.3). Selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Javed, dkk (2017) pada daun tanaman stevia yang diberikan paparan ion Cu menghasilkan peningkatan kandungan steviosida sebanyak 2.06% dengan pemberian 10 mg/L. Hal ini berhubungan dengan peran ion Cu yang ditambahkan pada media yang diserap oleh sel dan berperan penting dalam biokimia tanaman (Zafar, dkk., 2017). Penelitian serupa yang dilakukan oleh Ahmad, dkk (2020) menunjukkan bahwa pemberian ion Cu 20 mg/L mampu meningkatkan konsentrasi senyawa steviosida sebesar 1,96%. Hal ini membuktikan bahwa pemberian ion Cu mampu meningkatkan senyawa metabolit sekunder.

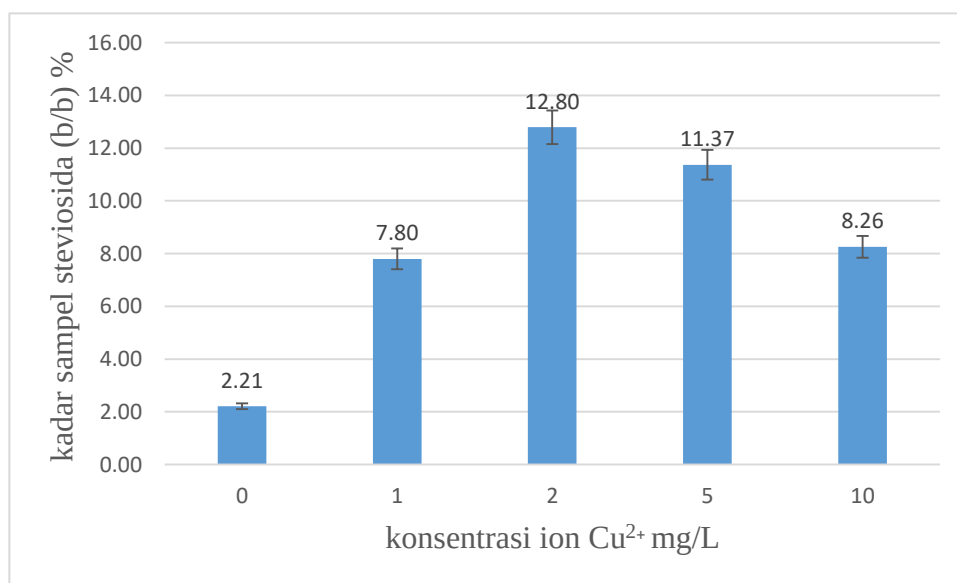


Gambar 4.4 Kadar ekstrak steviosida pada setiap perlakuan konsentrasi ion Cu^{2+}

Peningkatan kadar steviosida pada kalus stevia yang diberikan konsentrasi ion Cu^{2+} turut meningkatkan kadar ekstrak steviosida pada kalus stevia. Ekstrak didefinisikan sebagai sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa

aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai. Kadar ekstrak menunjukkan konsentrasi senyawa aktif yang berhasil terekstraksi dari bahan baku menggunakan pelarut tertentu (Zulharmita, dkk., 2012). Pada kalus yang diberikan perlakuan konsentrasi ion Cu^{2+} terjadi peningkatan kadar ekstrak dengan perlakuan optimal terdapat pada konsentrasi 2 mg/L ion Cu^{2+} . Hasil perhitungan kadar ekstrak disajikan dalam bentuk diagram batang pada gambar 4.4

Kadar sampel pada kalus stevia yang diberikan perlakuan konsentrasi ion Cu^{2+} turut mengalami peningkatan seiring dengan meningkatnya kadar steviosida dan kadar ekstrak. Kadar sampel diartikan sebagai proporsi senyawa dalam bahan mentah yang dapat dinyatakan dalam persen terhadap bahan awal (Kartikasari, dkk., 2015). Pemberian konsentrasi 2 mg/L ion Cu^{2+} merupakan perlakuan optimal yang dapat meningkatkan kadar sampel pada kalus stevia. Selaras dengan peningkatan yang terjadi pada kadar steviosida dan kadar ekstrak yang turut meningkat pada perlakuan 2 mg/L ion Cu^{2+} . Hasil perhitungan kadar sampel disajikan dalam bentuk diagram batang pada gambar 4.5



Gambar 4.5 Kadar sampel steviosida pada setiap perlakuan konsentrasi ion Cu^{2+}

Penelitian serupa yang dilakukan oleh Trettel, dkk (2018) membuktikan bahwa pemberian ion Cu^{2+} pada tanaman *Ocimum basilicum* dapat meningkatkan kandungan kadar metil-eugenol dan en-genol dengan pemberian 25 μM CuSO_4 sebanyak 41,05% untuk metil-eugenol dan 36,37% untuk en-genol. Ion Cu dapat meningkatkan kandungan senyawa pada tanaman dengan merangsang respon stress alami pada tanaman. Stres yang terjadi pada tanaman dapat memicu jalur biosintesis pembentukan senyawa metabolit sekunder sebagai respon tanaman terhadap stress oksidatif yang terjadi (Zlotek, dkk., 2016).

Peningkatan kadar steviosida pada kalus stevia yang diberikan perlakuan konsentrasi ion Cu^{2+} mengalami peningkatan seiring dengan penambahan berat basah pada kalus stevia. Hal ini menandakan bahwa terdapat korelasi antara peningkatan berat basah kalus dengan peningkatan produksi metabolit sekunder. Penelitian ini menunjukkan bahwa berat basah kalus tertinggi terdapat pada perlakuan 2 mg/L ion Cu^{2+} dengan berat sebesar 0,142 g, peningkatan berat basah kalus ini diikuti pula dengan peningkatan produksi steviosida pada kalus yaitu sebesar 639,760 μg . Selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Janarthanam, dkk (2010) pada kalus stevia menunjukkan bahwa berat basah kalus 182,3 g/L mampu menghasilkan kandungan senyawa steviosida yang tinggi jika dibandingkan dengan ekstrak daun stevia. Penelitian serupa dilakukan oleh Bano, dkk (2022) pada kalus tanaman *Salvia moorcroftiana* L. dengan berat basah sebesar 2,53 mg/L mampu menghasilkan metabolit sekunder tertinggi yaitu 2,19 mg/g.

Kehadiran dan akumulasi metabolit sekunder dipengaruhi oleh tingkat diferensiasi seluler dan organisasi jaringan (Mahendran, dkk., 2014). Semakin banyak sel hidup aktif dengan kata lain biomassa sel meningkat, maka potensi untuk

mensintesis metabolit sekunder juga mengalami peningkatan. Pada tumbuhan yang dikembangkan secara *in vitro* banyak ditemukan konsentrasi tertinggi metabolit sekunder terdeteksi pada sel yang tidak mengalami diferensiasi (Park, dkk., 2020). Seperti penelitian yang dilakukan oleh Karakas dan Turker (2016) pada kalus *Phlomis armeniaca* Willd yang menunjukkan bahwa kalus yang berproliferasi dengan baik, berwarna hijau, dan bertekstur kompak mengakumulasi kadar asam kafeat dan asam p-kumarat yang lebih tinggi dibandingkan dengan jaringan daun.

Penambahan zat elisitor pada media tanam kalus juga mampu meningkatkan produksi senyawa metabolit sekunder pada tanaman. Salah satunya melalui pensinyalan pembentukan stress oksidatif. Pembentukan stress oksidatif pada yang terjadi di dalam sel dapat meningkatkan respon hormon dan gen-gen pertahanan dalam tanaman (Hendawey, dkk., 2014). Pemberian ion Cu^{2+} sebagai salah satu zat elisitasi dapat merangsang pembentukan stress oksidatif pada sel tanaman menyebabkan aktivasi hormon pertahanan seperti asam salisilat dan metil jasmonat. Kedua hormon ini dapat merangsang pembentukan metabolit sekunder sebagai respon pertahanan terhadap cekaman yang diterima oleh tanaman (Ahmad, dkk., 2020).

Aktivasi hormon pertahanan seperti asam salisilat dan metil jasmonat yang dirangsang oleh pembentukan stress oksidatif oleh ion Cu dapat memicu ekspresi gen-gen yang memproduksi senyawa metabolit sekunder. Pada tanaman stevia, metil jasmonat dan asam salisilat berperan dalam meningkatkan ekspresi gen-gen jalur MEP salah satunya meningkatkan ekspresi gen *deoxyxylulose-5-phosphate synthase* (DXS) yang memiliki peran sentral dalam jalur biosintesis steviol glikosida (Lucho, dkk., 2018). Selanjutnya metil jasmonat dan asam salisilat juga

berperan dalam meningkatkan ekspresi GGDPS, CDPS, KS, dan KO yang terlibat dalam sintesis *geranylgeranyl diphosphate* dan asam kaurenat. Metil jasmonat juga meningkatkan ekspresi gen glikosiltransferase seperti UGT85C2, UGT74G1, dan UGT76G1. Peningkatan ekspresi gen glikosiltransferase ini dapat meningkatkan produksi steviosida pada tanaman stevia sebab berperan dalam sintesis steviol glikosida (Lucho, dkk., 2018).

Peran ion Cu^{2+} dalam meningkatkan kandungan senyawa metabolit sekunder telah banyak diteliti sebelumnya pada tanaman yang lain, seperti pada kandungan senyawa kardenolida juga berhasil ditingkatkan dengan pemberian $50\mu\text{M}$ CuSO_4 pada kalus tanaman *Turki digitalis* L. (Sahin, dkk., 2017). Peningkatan senyawa fenol sebanyak 8,75 mg/g pada kalus tanaman *Artemisia annua* yang diberikan 2 mg/l CuSO_4 (Zarad, dkk., 2021). Perlakuan ion Cu^{2+} mampu meningkatkan produksi epitekin galat sebesar 193,88 ppm dengan pemberian konsentrasi Cu^{2+} 1 g/L (Retnaningati, dkk., 2021). Penelitian lainnya terkait pemberian ion Cu^{2+} juga dilaporkan berhasil meningkatkan produksi flavonoid total dan fenolik total dengan pemberian 200 $\mu\text{g/ml}$ ion Cu pada tanaman *Momordia charantia* L. (Jdayea & Neamah, 2024).

Peningkatan stress oksidatif yang dirangsang oleh pemberian elisitor logam berat salah satunya ion Cu^{2+} dapat meningkatkan produksi senyawa metabolit sekunder melalui pensinyalan stress oksidatif (Ahmad, dkk., 2020). Namun dalam konsentrasi yang lebih tinggi, pemberian ion Cu^{2+} dapat menyebabkan penurunan produksi steviosida. Penelitian yang dilakukan oleh Ahmad, dkk (2020) menunjukkan bahwa pemberian 2000 mg/L ion Cu dapat menurunkan kadar steviosida menjadi 0,25%. Penelitian serupa dilakukan oleh Javed, dkk (2017)

menunjukkan bahwa dengan pemberian 1000 mg/L ion Cu dapat menurunkan kadar steviosida menjadi 0,13%. Hal ini berkaitan dengan peningkatan akumulasi oksigen reaktif yang menyebabkan stress oksidatif intraseluler melalui pelepasan ion logam (Cu^{2+}) atau radikal bebas ke dalam media kultur MS (Dimkpa, dkk., 2015).

Penelitian terkait respon tanaman terhadap penumpukan oksigen reaktif yang disebabkan oleh ion Cu^{2+} juga telah dilakukan oleh Ibrahim, dkk (2017) pada tanaman *Gynura procumbens* yang diberikan konsentrasi ion Cu^{2+} sebanyak 140 mg/L menyebabkan penurunan produksi fenolik total, flavonoid, dan saponin. Hal ini disebabkan oleh terjadinya penurunan aktivitas enzim fenilalanin ammonia liase (PAL) yang berperan dalam jalur biosintesis metabolit sekunder. Penurunan aktivitas enzim PAL menyebabkan tanaman mengurangi kemampuan untuk menghasilkan metabolit sekunder. Maka penting untuk menentukan konsentrasi yang tepat agar metabolit sekunder dalam tanaman dapat diproduksi dengan optimal.

Elisitor logam berat lainnya juga mampu untuk meningkatkan produksi senyawa metabolit sekunder pada tanaman in vitro. Misalnya penelitian yang dilakukan oleh Golkar, dkk (2018) pada kalus stevia yang diberikan konsentrasi 45 mg/L ion Ag mampu menghasilkan kadar steviosida sebanyak 41,04 mg/g. Penelitian lainnya dilakukan oleh B. Heta, dkk (2017) pada kalus stevia yang diberikan 1000 mg/L ion Mg menghasilkan kadar steviosida sebanyak 0,80%. Hal ini membuktikan bahwa pemberian cekaman logam berat pada kalus tanaman dapat meningkatkan produksi senyawa metabolit sekunder melalui pembentukan ROS yang mengaktifkan hormon pertahanan dan gen-gen terkait produksi senyawa metabolit sekunder (Lucho, dkk., 2018).

4.4 Tinjauan Hasil Penelitian dalam Perspektif Al-Qur`an

Al-Qur`an merupakan kitab yang diturunkan untuk memberikan petunjuk dan bimbingan untuk umat manusia, termasuk juga dalam konteks pertumbuhan dan perkembangan tanaman yang sangat dipengaruhi oleh media tempat tumbuh tanaman tersebut. Hal ini telah Allah SWT dalam QS. Al-A`raf ayat 58:

وَالْبَلَدُ الطَّيِّبُ يَخْرِجُ نَبَاتَهُ بِإِذْنِ رَبِّهِ وَالَّذِي خَبَثَ لَا يَخْرِجُ إِلَّا نَكِدًا ۚ كَذَلِكَ نُصَرِّفُ الْآيَاتِ لِقَوْمٍ يَشْكُرُونَ

Artinya : “*Dan tanah yang baik, tanaman-tanamannya tumbuh subur dengan izin Tuhan; dan tanah yang buruk, tanaman-tanamannya tumbuh merana. Demikianlah Kami menjelaskan berulang-ulang tanda-tanda (kebesaran Kami) bagi orang-orang yang bersyukur*” (QS. Al-A`raf [7]:58).

Shihab (2002) dalam Tafsir Al-Mishbah menafsirkan ayat tersebut dengan kalimat *Dan tanah baik* yaitu tanah yang subur dan selalu dipelihara, *tanaman-tanamannya tumbuh subur dengan seizin* yaitu berdasar pada kehendak Allah yang ditetapkan oleh Allah melalui hukum-hukum alam *dan tanah yang buruk* yaitu tanah yang tidak subur. Allah tidak memberikannya potensi untuk menumbuhkan tanaman yang baik, sehingga *tanaman-tanamannya hanya tumbuh merana*, tanaman tersebut menghasilkan buah yang sedikit dan kualitasnya tidak baik. Kata بِإِذْنِ رَبِّهِ dapat dimaknai dengan arti, tanaman tersebut dapat tumbuh dengan sangat baik sebab mendapatkan *anugerah khusus* dari Allah SWT.

Ayat diatas menjelaskan terkait dengan pentingnya media tanam terhadap pertumbuhan tanaman. Jika media tanam tersebut memiliki kandungan yang baik maka tanaman yang ditanam pada media tersebut akan tumbuh dengan baik. Sebaliknya, jika media tanam yang digunakan tidak subur maka tanaman yang ditanam juga akan terhambat pertumbuhannya. Namun kemudian Allah tekankan bahwa pertumbuhan tanaman tersebut juga seatas izin-Nya. Dengan kata lain,

meskipun manusia telah mengupayakan media tanam yang terbaik jika Allah tidak mengizinkan tanaman tersebut untuk tumbuh, maka tanaman tersebut tidak akan tumbuh. Hal ini menunjukkan betapa kuasanya Allah SWT dalam mengatur alam semesta ini.

Segala sesuatu di bumi ini telah Allah SWT atur dengan sebaik-baiknya. Baik itu dalam fungsi, ukuran, maupun kadarnya. Salah satunya dapat terlihat melalui penelitian kalus stevia yang ditumbuhkan dalam media elisitasi ion Cu^{2+} yang menunjukkan bahwa kadar ion Cu^{2+} yang diberikan pada kalus dapat berpengaruh baik pada kuantitas, kualitas maupun kandungan senyawa penting di dalamnya dengan kadar yang sesuai. Hal ini selaras dengan firman Allah SWT dalam QS. Al-Qamar [54]: 49 berikut:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ

Artinya: “*Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu sesuai dengan ukuran.*”(QS. Al-Qamar [54]:49)

Tafsir Al-Mishbah karangan Shihab (2002) menyatakan bahwa tidak ada satu pun yang Allah ciptakan itu sia-sia ataupun tanpa tujuan yang benar. Semuanya yang telah Allah SWT ciptakan diberi potensi yang sesuai dengan kadar yang cukup untuk melaksanakan fungsinya. Seluruhnya saling berkaitan dan menunjang dalam satu keseimbangan. Terbukti dengan pemberian ion Cu^{2+} pada media pertumbuhan kalus stevia jika pemberian ion Cu^{2+} sesuai dengan kadar yang dapat diterima oleh kalus stevia, pertumbuhannya akan bagus. Sebaliknya jika kadar ion Cu^{2+} yang diberikan semakin tinggi konsentrasinya maka kalus yang ditumbuhkan akan mengalami penurunan baik secara kuantitas, kualitas, maupun kandungan senyawa penting didalamnya. Hal ini membuktikan bahwa kadar yang diberikan pada kalus stevia sangat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan kalus stevia.

Peningkatan kandungan senyawa penting pada kalus stevia nyataanya dilakukan untuk memenuhi kebutuhan umat manusia terhadap bahan pemanis yang memiliki nilai kesehatan yang lebih baik. Hal ini diperbolehkan dengan catatan produk bioteknologi yang dihasilkan dapat bermanfaat dan tidak membahayakan bagi umat manusia. Selaras dengan hadis Rasulullah SAW berikut yang artinya:

“Telah menceritakan kepada kami [Ali bin Muhammad] berkata: telah menceritakan kepada kami [Ubaidullah bin Musa] dari [Isra'il] dari [Simak] Bahwasanya ia mendengar [Musa bin Thalhah bin Ubaidullah] menceritakan dari [Bapaknya] ia berkata: "Aku bersama Rasulullah shallallahu 'alaihi wa sallam melewati kebun kurma, beliau melihat orang-orang mengawinkan kurma. Lalu beliau bersabda: "Apa yang mereka lakukan?" para sahabat menjawab, "Mereka mengambil yang laki-laki untuk digabungkan dengan yang perempuan." Beliau bersabda: "Aku melihat bahwa perbuatan mereka tidak ada gunanya." Perkataan beliau itu sampai ke telinga mereka hingga mereka meninggalkannya sehingga hasil panen mereka pun gagal. Kejadian tersebut akhirnya juga sampai kepada Nabi shallallahu 'alaihi wa sallam, beliau lalu bersabda: "Ucapan itu hanya perkiraan, jika memang pengawinan itu bermanfaat hendaklah mereka melakukannya. Aku hanyalah manusia biasa sebagaimana kalian, perkiraan itu bisa benar dan bisa salah. Tetapi apa yang aku katakan kepada kalian adalah firman Allah, maka sekali-kali aku tidak akan berdusta kepada Allah.”” (Sunan Ibnu Majah 2461).

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pemberian konsentrasi ion Cu^{2+} mempengaruhi berat basah kalus stevia dengan perlakuan optimal terdapat pada konsentrasi 2 mg/l ion Cu^{2+} . Pemberian ion Cu^{2+} dengan konsentrasi yang lebih tinggi akan menurunkan berat basah kalus.
2. Ion Cu^{2+} yang ditambahkan pada media pertumbuhan kalus mempengaruhi warna yang dihasilkan oleh kalus stevia. Semakin tinggi konsentrasi ion Cu^{2+} yang diberikan maka akan semakin gelap atau tua warna yang dihasilkan oleh kalus stevia. Tekstur kalus stevia yang ditumbuhkan dalam media elisitasi ion Cu^{2+} menghasilkan tekstur kalus yang kompak. Menandakan bahwa konsentrasi ion Cu^{2+} yang ditambahkan pada media tidak menghambat pertumbuhan kalus stevia.
3. Penambahan ion Cu^{2+} pada media tanam kalus mampu meningkatkan kandungan steviosida. Perlakuan optimal terdapat pada konsentrasi 2 mg/L ion Cu^{2+} yang menghasilkan kadar steviosida sebesar 639,760 $\mu\text{g/ml}$, 12795,20 $\mu\text{g/ml}$ untuk kadar ekstrak, dan kadar sampel sebesar 12,80%. Konsentrasi ion Cu^{2+} yang lebih tinggi menyebabkan penurunan terhadap produksi steviosida pada kalus stevia.

5.2 Saran

Saran dari penelitian ini adalah perlakuan konsentrasi 2 mg/L ion Cu^{2+} merupakan perlakuan optimal yang dapat meningkatkan kandungan steviosida pada

kalus stevia, sehingga dapat diterapkan pada penelitian serupa terkait dengan peningkatan kandungan senyawa metabolit sekunder. Hal ini tentu dapat diterapkan dalam skala besar dengan mempertimbangkan beberapa hal seperti menguji kembali dosis elisitor optimal dengan menggunakan uji skala pilot dan memastikan kembali waktu penambahan elisitor yang sesuai dengan fase pertumbuhan terbaik untuk sintesis metabolit sekunder.

DAFTAR PUSTAKA

- Adabiyah, R., Ratnadewi, D., & Ermayanti, T. M. (2019). Evaluasi Pertumbuhan *Stevia rebaudiana* Bert. Tetraploid Secara In Vitro dan di Lapang untuk Produksi Steviosida dan Rebaudiosida-A (Growth Evaluation of *Stevia rebaudiana* Bert. Tetraploid Cultured In Vitro and in the Field for Production of Stevioside and. *Jurnal Biologi Indonesia*, 15(2), 153165.
- Adabiyah, R., Ratnadewi, D., Ermayanti, T. M., Hafiizh, E. Al, & Susanti, E. M. (2023). Morphological and Anatomical Comparison between Tetraploid *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni and its Parental Diploid. *HAYATI Journal of Biosciences*, 30(2), 321–335. <https://doi.org/10.4308/hjb.30.2.321-335>
- Agus, L. (2019). *Stevia*, Pemanis Pengganti Gula dari Tanaman *Stevia rebaudiana*. *Jurnal Kedokteran Meditek*, 23(61), 1–12.
- Ahmad, M. A., Rabia, J., Muhammad, A., Muhammad, R., Qiang, H., & Yuesuo, Y. (2020). Engineered ZnO and CuO Nanoparticles Ameliorate Morphological and Biochemical Responses in Tissue Culture Regenerants of Candy leaf (*Stevia rebaudiana*). *molecules*, 25,1356
- Al-Khayri, J. M., Alnaddaf, L. M., & Jain, S. M. (2023). Nanomaterial Interactions with Plant Cellular Mechanisms and Macromolecules and Agricultural Implications. In *Nanomaterial Interactions with Plant Cellular Mechanisms and Macromolecules and Agricultural Implications*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-20878-2>
- AL-Mayahi, A. M. W. (2013). Effect of copper sulphate and cobalt chloride on growth of the in vitro culture tissues for date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Ashgar. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 9(1), 6–18. <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2014.6.18>
- Amin, S., Mursadad, A., & Ibrahim, S. (2016). Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Untuk Analisis Senyawa Diuretik Yang Disalahgunakan Sebagai Doping Dalam Urin. *Jurnal Sains Keolahragaan dan Kesehatan*, 1(2), 34. <https://doi.org/10.5614/jskk.2016.1.2.1>
- Anggraito, Y. U., Susanti, R., Iswari, R. S., Yuniastuti, A., Lisdiana, WH, N., Habibah, N. A., & Bintari, S. H. (2018). Metabolit sekunder dari tanaman. In *Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang*.
- Anwar, N., & Isda, M. N. (2021). Respons Pembentukan Kalus Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb.) dengan Penambahan Naphtalene Acetic Acid dan Benzyl Amino Purin Secara In Vitro. *Biota : Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*, 5(2), 136–142. <https://doi.org/10.24002/biota.v5i3.3232>

- Apriliyani, R., & Wahidah, B. F. (2021). Perbanyak anggrek *Dendrobium* sp. secara in vitro: Faktor-faktor keberhasilannya. *Filogeni: Jurnal Mahasiswa Biologi*, 1(2), 33–46. <https://doi.org/10.24252/filogeni.v1i2.21992>
- Ariningsih, I., Solichatun, S., & Anggarwulan, E. (2003). Callus growth and anthraquinones production of Indian mulberry (*Morinda citrifolia* L.) in Murashige-Skoog's medium (MS) supplemented with Ca^{2+} and Cu^{2+} . *Biofarmasi Journal of Natural Product Biochemistry*, 1(2), 39–43. <https://doi.org/10.13057/biofar/f010201>
- Artono., Hananto, W., & Arianto, N. (2024). Masa Krisis Perkebunan Tebu Dan Industri Gula Di Wilayah Gerbang Kertasusila Paska Pemerintahan Soeharto (1998-Sekarang). *Kronik: Journal of History and Historiography*. 8(1), 1–14.
- Asmono, S. L., Sari, V. K., & Wardana, R. (2017). Induksi Tunas Stevia (*Stevia Rebaudiana* Bertoni) pada Beberapa Jenis Sitokinin. *Seminar Nasional Hasil Penelitian 2017*, 277–280.
- Azizi, A., Mahboobullah, M., Abdul, W. M., Mohammad, H. H., Sayedwali, S., & Parwiz, N. (2023). The role of plants in human health. *British Journal of Biology Studies*, 3(1), 08-12
- B. Heta, D., Desai, C., Suthar, K. P., Singh, D., & Suthar, H. G. (2017). Effect of magnesium nanoparticles on physiology and stevioside in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *European Journal Of Biomedical And Pharmaceutical Sciences*, 4(9), 642-646
- Bano, A. M., Abdul, B., Syed, T. S., Naveed, A., Syed, A. Q. G., Izhar, U., Sumera, S., Heba, I. M. (2022). Callus induction, proliferaatin, enhanced secondary metabolites production and antioxidants activity of *Salvia moorcroftiana* L. as influenced by combinations of auxin, cytokinin, and melatonin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 65, 1-16
- Baroni-nezhad, H., Karimi, M., Motaghian, H., & Direkvand-moghadam, F. (2021). Response of stevia (*stevia rebaudiana*) to copper, iron and zinc. *Journal of Plant Nutrition*, 44(6), 875–884. <https://doi.org/10.1080/01904167.2021.1871753>
- Buana, A. S. (2020). Induksi Kalus Stevia Rebaudiana Bertoni M. Dengan Pemberian Kombinasi Zpt Naa (Naphtalene Asetic Acid), 2,4-D (2,4 Diclorophenoxy Asetic Acid) Dan Bap (Benzil Amino Purin). *Jurnal Teknologi Terapan: G-Tech*, 1(2), 78–83. <https://doi.org/10.33379/gtech.v1i2.272>
- Busono, E., & Dini, M. (2015). *Panduan Budidaya Stevia Sebagai Penghasil Gula Rendah Kalori*. Koperasi Nukita
- Cahyono, E. H., & Riani Ningsih. (2023). Pengembangan Metode Teknik Sterilisasi Eksplan Guna Meningkatkan Keberhasilan Kultur Jaringan Tanaman Stevia (*Stevia Rebaudiana* Bertoni). *Jurnal Pengembangan Potensi Laboratorium*, 2(2), 60–68. <https://doi.org/10.25047/plp.v2i2.3685>
- Cardoso, J. C., de Oliveira, M. E. B. S., & Cardoso, F. de C. I. (2019). Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. *Horticultura Brasileira*, 37(2), 124–132. <https://doi.org/10.1590/s0102-053620190201>
- Chawla, G., & Ranjan, C. (2016). Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatography. *Open Chemistry Journal*, 3(1), 1–16. <https://doi.org/10.2174/1874842201603010001>

- Chiew, M. S., Lai, K. S., Hussein, S., & Abdullah, J. O. (2016). A Review on Induced Mutagenesis of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *The Pertanika Journal of Scholarly Research Reviews*, 2(3), 77–85. <http://mymedr.afpm.org.my/publications/58688>
- Chou, C., Vivian, C., Mai, A. L., Min-Lang, T., & Shang-Ta, W. (2025). Effects of light condition on the leaf growth and steviol glycoside yields of hydroponically cultivated stevia across growth stages. *Horticulturae*, 11, 316, 1-21
- Chung, I., Rajakumar, G., Subramanian, U., & Venkidasamy, B. (2019). Impact of Copper Oxide Nanoparticles on Enhancement of Bioactive Compounds Using Cell Suspension. *Applied Science*, 9(10), 1–17.
- Dabuwat Benjamin, E., Adamu Ishaku, G., Andrew Peingurta, F., & Samuel Afolabi, A. (2019). Callus Culture for the Production of Therapeutic Compounds. *American Journal of Plant Biology*, 4(4), 76. <https://doi.org/10.11648/j.ajpb.20190404.14>
- Darmawan, W. (2023). Pengaruh metode pengeringan terhadap aktivitas antioksidan ekstrak *Stevia rebaudiana* Bertoni melalui ekstraksi berbantuan gelombang mikro. *Jurnal Ilmu Farmasi dan Kesehatan*, 1(3), 117–128.
- Darki, B. S., Leila, S., Reyhaneh, P., & Seyed, M. G. (2019). Effect of CuSO_4 and AgNO_3 on artemisinin and phenolic compound in shoot culture of *Artemisia annua* L. *Journal of Plant Process and Function*, 8(31)
- Dey, A., Kundu, S., Bandyopadhyay, A., & Bhattacharjee, A. (2013). Efficient micropropagation and chlorocholine chloride induced stevioside production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Comptes Rendus - Biologies*, 336(1), 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2012.11.007>
- Dimkpa, C. O., McLean, J. E., Britt, D. W., & Anderson, A. J. (2015). Nano-CuO and interaction with nano-ZnO or soil bacterium provide evidence for the interference of nanoparticles in metal nutrition of plants. *Ecotoxicology*, 24(1), 119–129. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1364-x>
- Djajadi. Pengembangan Tanaman Pemanis *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Di Indonesia. (2013). *Perspektif*, 13(1), 25-33
- Dwiyani, R. (2015). *Kultur Jaringan Tanaman*. Bali: Pelawa Sari
- Efferth, T. (2019). Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering*, 5(1), 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>
- Ekawati, Y., Anggraeni, A., Dyah Prawestri, A., & Nurtjahya, E. (2022). Induksi Kalus Sisik Umbi *Lilium longiflorum* Thunb. oleh Auksin dan Sitokinin, serta Respons Pertumbuhannya Secara In Vitro. *AGROSAINSTEK: Jurnal Ilmu dan Teknologi Pertanian*, 6(2), 28–37. <https://doi.org/10.33019/agrosainstek.v6i2.316>
- Elateeq, A. A., Sun, Y., Nxumalo, W., & Gabr, A. M. M. (2020). Biotechnology production of silymarin in *Silybum marianum* L.: A review. *Biocatal. Agric. Biotechnol*, 29, 101775
- Fadilah. (2023). Pengaruh Elisitor $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Terhadap Pertumbuhan Serta Produksi Flavonoid Dan Fenolik Kultur Kalus Tanaman Insulin (*Tithonia diversifolia*). *Skripsi*. Program Studi Biologi Jurusan Sains Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya. Surabaya
- Faizah, H., Tanjung, M., Purnobasuki, H., & Manuhara, Y. S. W. (2018). Biomass and flavonoid production of *Gynura procumbens* (L.). merr adventitious root

- culture in balloon-type bubble-bioreactor influenced by elicitation. *Asian Journal of Plant Sciences*, 17(2), 107–119. <https://doi.org/10.3923/AJPS.2018.107.119>
- Gao, L., & Zhang, A. (2023). Copper-instigated modulatory cell mortality mechanisms and progress in oncological treatment investigations. *Frontiers in Immunology*, 14(August), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1236063>
- Ghazal, B., Saif, S., Farid, K., Khan, A., Rehman, S., Reshma, A., Fazal, H., Ali, M., Ahmad, A., Rahman, L., & Ahmad, N. (2018). Stimulation of secondary metabolites by copper and gold nanoparticles in submerge adventitious root cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.). *IET Nanobiotechnology*, 12(5), 569–573. <https://doi.org/10.1049/IET-NBT.2017.0093>
- Ghose, A. K., Abdullah, S. N. A., Md Hatta, M. A., & Megat Wahab, P. E. (2022). In Vitro Regeneration of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) and Evaluation of the Impacts of Growth Media Nutrients on the Biosynthesis of Steviol Glycosides (SGs). *Agronomy*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/agronomy12081957>
- Gupta, E., Purwar, S., Sundaram, S., Tripathi, P., & Rai, G. (2016). Stevioside and rebaudioside a - Predominant ent-kaurene diterpene glycosides of therapeutic potential: A review. *Czech Journal of Food Sciences*, 34(4), 281–299. <https://doi.org/10.17221/335/2015-CJFS>
- Golkar, P., Mahsa, M., & Ghasem, A. G. (2018). Elicitation of stevia glycosides using salicylic acid and silver nanoparticles under callus culture. *Sugar Tech*, 21(4), 569–577
- Habibah, N. A., Rahayu, E. S., & Anggraito, Y. U. (2021). *Buku Ajar Kultur Jaringan Tumbuhan*. Sleman:deepublish
- Hajar, E. W. I., Sulaiman, A. Z. Bin, & Sakinah, A. M. M. (2014). Assessment of Heavy Metals Tolerance in Leaves, Stems and Flowers of *Stevia Rebaudiana* Plant. *Procedia Environmental Sciences*, 20, 386–393. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2014.03.049>
- Halder, M., Sayantika, S., & Sumita, J. (2019). Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Eng Life Sci*, 19(12), 880–895
- Heinisch, M., Jacome, J., & Miricescu, D. (2019). Current Experience with Application of Metal-based Nanofertilizers. *MATEC Web of Conferences*, 290. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201929003006>
- Hendawey, M. H., Abo, R. E., & Fadl, E. (2014). Biochemical Studies on the Production of Active Constituents in *Stevia rebaudiana* L. Callus. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 9(3), 76–93.
- Hindarti, D., & Larasati, A. W. (2019). Copper (Cu) and Cadmium (Cd) toxicity on growth, chlorophyll-a and carotenoid content of phytoplankton *Nitzschia* sp. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 236(1), 0–9. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/236/1/012053>
- Humbal, A., & Pathak, B. (2023). Influence of exogenous elicitors on the production of secondary metabolite in plants: A review ('“VSI: secondary metabolites”'). *Plant Stress*, 8(November 2022), 100166. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100166>
- Husna, F. K., Budiyo, S., & Sutarno, D. (2018). Pertumbuhan dan produksi tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* b.) pada persentase naungan dan umur

- panen berbeda di dataran rendah (Growth and production of Stevia (Stevia rebaudiana B.) on shade percentage and different harvest time in lowland). *J. Agro Complex*, 2(3), 269–274. <http://ejournal2.undip.ac.id/index.php/joac>
- Hutami, S. (2008). 2_2008_Masalah Pencoklatan pada Kultur Jaringan. *Jurnal AgroBiogen*, 4(2), 83–88.
- Ibrahim, M. H., Kong, Y. C., & Zain, N. A. M. (2017). Effect of cadmium and copper exposure on growth, secondary metabolites and antioxidant activity in the medicinal plant sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr). *Molecules*, 22(10). <https://doi.org/10.3390/molecules22101623>
- Illahi, A. K., Ratnasari, E., & Dewi, S. K. (2022). Pengaruh 2, 4-D terhadap pertumbuhan kalus daun *Diospyros discolor* Willd pada media MS secara in vitro. *Lentera Bio: Berkala Ilmiah Biologi*, 11(3), 369–377.
- Indah, P. N., & Ermavitalini, D. (2013). Induksi kalus daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) pada beberapa kombinasi konsentrasi 6-Benzylaminopurine (BAP) dan 2,4-Dichlorophenpxyacetic Acid (2,4-D). *Jurnal Sains dan Seni Pomits*, 2(1), 1–6.
- Isda, M. N., & Salsabilla, M. J. (2022). In Vitro Callus Induction in Tacca (*Tacca chantrieri* Andre) Leaf Explants on Murashige and Skoog Media with Different Concentrations of Sucrose. *Jurnal Biologi UNAND*, 10(1), 1. <https://doi.org/10.25077/jbioua.10.1.1-9.2022>
- Iqbal, Z., Sumera, J., Shagufta, N., Anis, A. S., Adnan, N. S., Bilal, A. P., Aneela, G., & Nader, R. A. (2022). Elicitation of the in vitro culture of selected varieties of *Vigna radiata* L. with zinc oxide and copper oxide nanoparticles for enhanced phytochemicals production. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1-16
- Jańczak-Pieniążek, M., Cichoński, J., Michalik, P., & Chrzanowski, G. (2023). Effect of Heavy Metal Stress on Phenolic Compounds Accumulation in Winter Wheat Plants. *Molecules*, 28(1). <https://doi.org/10.3390/molecules28010241>
- Jannah, R., Suwirman., & Zozy, A. N (2016). Pengaruh pemberian elisitor Cu²⁺ terhadap kalus *Artemisia vulgaris* dalam upaya penyediaan artemisinin sebagai antimalaria. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*, 2(2010), 155–158. <https://doi.org/10.13057/psnmbi/m020206>
- Janarthanam, B., Gopalakrishnan, M., & Sekar, T. (2010). Secondary metabolite production in callus cultures on *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Bangladesh Journal Of Scientific and Industrial Research*, 45(3), 243-248
- Javed, R., Mohamed, A., Yücesan, B., Gürel, E., Kausar, R., & Zia, M. (2017). CuO nanoparticles significantly influence in vitro culture, steviol glycosides, and antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 131(3), 611–620. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1312-6>
- Javed, R., Yucesan, B., Zia, M., & Gurel, E. (2018). Elicitation of Secondary Metabolites in Callus Cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown Under ZnO and CuO Nanoparticles Stress. *Sugar Tech*, 20(2), 194–201. <https://doi.org/10.1007/s12355-017-0539-1>
- Jdayea, N. A., & Neamah, S. I. (2024). Copper Nanoparticles and Culture Media Elicit Biomass, Secondary Metabolites, and Antioxidant Activity in the Cell Suspension Culture of *Momordica charantia* L. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 17(2), 259–267. <https://doi.org/10.54319/jjbs/170205>
- Julianto, T. S. (2019). Fitokimia Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining fitokimia. In *Jakarta penerbit buku kedokteran EGC* (Vol. 53, Nomor 9).

- Jurić, S., Sopko Stracenski, K., Król-Kilińska, Ż., Žutić, I., Uher, S. F., Dermić, E., Topolovec-Pintarić, S., & Vinceković, M. (2020). The enhancement of plant secondary metabolites content in *Lactuca sativa* L. by encapsulated bioactive agents. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60690-3>
- Kadapi, M., Sunarso, C., Erizon, M. S., Maharani, N. D., Hakim, M. S., & Az Zahra, I. H. (2024). Teknologi Kultur in vitro untuk Meningkatkan Produksi Metabolit Sekunder pada Berbagai Tanaman Obat. *Jurnal Agrosains dan Teknologi*, 9(1), 18–29. <https://jurnal.umj.ac.id/index.php/ftan/article/view/21623%0Ahttps://jurnal.umj.ac.id/index.php/ftan/article/download/21623/10569>
- Karakas, F. P., & Turker, A. U. (2016). Improvement of shoot proliferation and comparison of secondary metabolites in shoot and callus cultures of *Phlomis armeniaca* by lc-esi-ms/ms analysis. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 52, 608–618
- Kartikasari, D., Nurkhasanah, N., & Pramono, S. (2018). Penetapan Kadar Steviosida Pada Simplisia Dan Ekstrak Daun Stevia Rebaudiana Dari Tiga Daerah Berbeda. *JIFFK : Jurnal Ilmu Farmasi dan Farmasi Klinik*, 15(2), 18. <https://doi.org/10.31942/jiffk.v15i2.2574>
- Kazmi, A., Khan, M. A., Mohammad, S., Ali, A., & Ali, H. (2019). Biotechnological Production of Natural Calorie Free Steviol Glycosides in *Stevia rebaudiana*: An Update on Current Scenario. *Current Biotechnology*, 8(2), 70–84. <https://doi.org/10.2174/2211550108666191210100751>
- Kumar, V., Pandita, S., Singh Sidhu, G. P., Sharma, A., Khanna, K., Kaur, P., Bali, A. S., & Setia, R. (2021). Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: A comprehensive review. *Chemosphere*, 262, 127810. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127810>
- Kumari, A., Nagpal, A. K., & Katnoria, J. K. (2022). Effect of copper, nickel and lead on callus growth dynamics of *Solanum lycopersicum*. *Journal of Applied and Natural Science*, 14(4), 1449–1455. <https://doi.org/10.31018/jans.v14i4.3913>
- Kurnianingsih, R., Ghazali, M., Rosidah, S., Muspiah, A., Astuti, S. ., & Nikmatullah, A. (2020). Pelatihan Teknik Dasar Kultur Jaringan Tumbuhan. *JMM (Jurnal Masyarakat Mandiri)*, 4(5), 888–896. <http://journal.ummat.ac.id/index.php/jmm/article/view/3049>
- Kusbiantoro, D. Y. Purwaningrum. (2018). Pemanfaatan kandungan metabolit sekunder pada tanaman kunyit dalam mendukung peningkatan pendapatan masyarakat Utilization of secondary metabolite in the turmeric plant to increase community income. *Jurnal Kultivasi*, 17(1), 544–549.
- Laila, F. N. (2014). Produksi Metabolit Sekunder Steviosida Pada Kultur Kalus *Stevia* (*Stevia Rebaudiana* Bert. M.) Dengan Penambahan Zpt 2,4-D Dan Peg (Polyethylene Glykol) 6000 Pada Media MS (Murashige & Skoog). *el-Hayah*, 4(2), 57. <https://doi.org/10.18860/elha.v4i2.2627>
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148(June 2019), 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>
- Libik-Konieczny, M., Capecka, E., Tuleja, M., & Konieczny, R. (2021). Synthesis

- and production of steviol glycosides: recent research trends and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(10), 3883–3900. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11306-x>
- Liu, H., Zhang, B., Wu, T., Ding, Y., Ding, X., & Chu, Z. (2015). Copper ion elicits defense response in *Arabidopsis thaliana* by activating salicylate- and ethylene-dependent signaling pathways. *Molecular Plant*, 8(10), 1550–1553. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.07.008>
- Lucho, S. R., do Amaral, M. N., Milech, C., Ferrer, M. Á., Calderón, A. A., Bianchi, V. J., & Braga, E. J. B. (2018). Elicitor-Induced Transcriptional Changes of Genes of the Steviol Glycoside Biosynthesis Pathway in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37(3), 971–985. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9795-x>
- Lukatkin, A., Egorova, I., Michailova, I., Malec, P., & Strzałka, K. (2014). Effect of copper on pro- and antioxidative reactions in radish (*Raphanus sativus* L.) in vitro and in vivo. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28(1), 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2013.11.002>
- Lutfiah, A., & Habibah, N. A. (2022). Pengaruh Pemberian Elisitor Ekstrak Khamir pada Pertumbuhan Kultur Kalus Gembili dengan Penambahan ZPT 2,4-D dan Kinetin. *Indonesian Journal of Mathematics and Natural Sciences*, 45(2), 77–83. <https://doi.org/10.15294/ijmns.v45i2.39728>
- Mahadi, I., Syafi'i, W., & Sari, Y. (2016). Callus Induction of Calamansi (*Citrus microcarpa*) Using 2,4-D and BAP Hormones by in vitro Methods. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 21(2), 84–89. <https://doi.org/10.18343/jipi.21.2.84>
- Mahendran, G., & Bai, V. N. (2014). Micropropagation, antioxidant properties and phytochemical assessment of *Swertia corymbosa* (Griseb) wight ex cb clarke: A medicinal plant. *Acta Physiol. Plant*, 36, 589–603
- Malik, W. A., Mahmood, I., Razzaq, A., Afzal, M., Shah, G. A., Iqbal, A., Zain, M., Ditta, A., Asad, S. A., Ahmad, I., Mangi, N., & Ye, W. (2021). Exploring potential of copper and silver nano particles to establish efficient callogenesis and regeneration system for wheat (*Triticum aestivum* L.). *GM Crops and Food*, 12(1), 564–585. <https://doi.org/10.1080/21645698.2021.1917975>
- Marcinek, K., & Krejpcio, Z. (2015). *Stevia Rebaudiana bertonii* - chemical composition and functional properties. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 14(2), 145–152. <https://doi.org/10.17306/j.afs.16>
- Margaretha Tinungki, M., Pontoh, J., & Fatimawati. (2018). Analisis Komponen Kimia pada Berbagai Tingkat Perkembangan Daun Benalu Langsung (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) Menggunakan Metode Kromatografi Gas. *PHARMACONJurnal Ilmiah Farmasi-UNSRAT*, 7(4), 108–114.
- Martono, Y., Trihandaru, S., & Rondonuwu, F. S. (2018). Determination of stevioside and rebaudioside a in *stevia rebaudiana bertonii* leaves using near infrared spectroscopy and multivariate data analysis. *Indonesian Journal of Chemistry*, 18(4), 664–671. <https://doi.org/10.22146/ijc.25580>
- Miguel, J. F. (2023). Influence of High Concentrations of Copper Sulfate on In Vitro Adventitious Organogenesis of *Cucumis sativus* L. *International Journal of Plant Biology*, 14(4), 974–985. <https://doi.org/10.3390/ijpb14040071>
- Millenia, F. K., Suminar, E., Nuraini, A., & Pitaloka, G. G. (2022). Induksi Kalus Eksplan Daun Stroberi (*Fragaria x ananassa* Duch) dengan Pemberian NAA

- dan CaP Secara In Vitro Callus. *Jurnal Galung Tropika*, 11(3), 317–329. <https://doi.org/10.31850/jgt.v11i3.1023>
- Miroshnichenko, D., Klementyeva, A., & Dolgov, S. (2021). The effect of daminozide, dark/light schedule and copper sulphate in tissue culture of triticum timopheevii. *Plants*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/plants10122620>
- Muhammad Heriyanto, N., & Gunawan, H. (2020). Buletin Kebun Raya. *Buletin Kebun Raya*, 23(3). <https://doi.org/10.55981/bkr.2022.201>
- Mydy, L. S., Chigumba, D. N., & Kersten, R. D. (2021). Plant Copper Metalloenzymes As Prospects for New Metabolism Involving Aromatic Compounds. *Frontiers in Plant Science*, 12(November), 1–25. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.692108>
- Naik, P. M., & Al-Khayri, J. M. (2016). Abiotic and Biotic Elicitors–Role in Secondary Metabolites Production through In Vitro Culture of Medicinal Plants. *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*, February. <https://doi.org/10.5772/61442>
- Narayani, M., & Srivastava, S. (2017). Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. *Phytochemistry Reviews*, 16(6), 1227–1252. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9534-0>
- Nawrot-Chorabik, K. (2017). Response of the callus cells of fir (*Abies nordmanniana*) to in vitro heavy metal stress. *Folia Forestalia Polonica, Series A*, 59(1), 25–33. <https://doi.org/10.1515/ffp-2017-0003>
- Ningsih, N. N. D. R., Raka, I. G. N., Siadi, I. K., & Wirya, G. N. A. S. (2018). Mutu Benih Beberapa Jenis Tanaman Hortikultura yang Beredar di Bali. *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika*, 7(1), 64–65.
- Ng Mei, T. L., Rezaul, K., Yew, S. T., Huey, F. T., Asma, D. D., Li, S. H., Norzulaani, K., David, R. K., & Jennifer, A. H. (2016). Amino acid and secondary metabolite production in embryogenic and non-embryogenic callus of fingerroot ginger (*Boesenbergia rotunda*). *Plos one*, 11(6), 1-19
- Numba, S., Syam, N., & Imaniar, M. (2024). Peningkatan Senyawa Flavonoid Melalui Penggunaan Elisitor Pada Kultur Kalus Tapak Dara (*Catharanthus roseus* L .) Increasing Flavonoid Compounds Through The Use of Elicitors in Callus Culture *Catharanthus roseus* L . *Jurnal Penelitian Terapan*, 24(3), 366–374.
- Nurchayani, N., Solichatun, S., & Anggarwulan, E. (2008). The Reserpine Production and Callus Growth of Indian Snake Root (*Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. Ex Kurz) Culture by Addition of Cu²⁺. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 9(3), 177–179. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d090305>
- Nurchayati, Y., Santosa, S., Nugroho, L. H., & Indrianto, A. (2016). Growth Pattern and Copper Accumulation in Callus of *Datura metel*. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 8(2), 135. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v8i2.5177>
- Oktafiana, N., Umayyah, S., Ningtyas, W. N., & Sugiharto, B. (2022). Regenerasi Kalus Embriogenik Sorgum (*Sorghum bicolor*) menggunakan Kombinasi ZPT dan Mikronutrien. *Agriprima : Journal of Applied Agricultural Sciences*, 6(1), 54–61. <https://doi.org/10.25047/agriprima.v6i1.463>
- Orellana-Paucar, A. M. (2023). Steviol Glycosides from *Stevia rebaudiana*: An Updated Overview of Their Sweetening Activity, Pharmacological Properties,

- and Safety Aspects. *Molecules*, 28(3).
<https://doi.org/10.3390/molecules28031258>
- Ozyigit, I. I., Dogan, I., Hocaoglu-Ozyigit, A., Yalcin, B., Erdogan, A., Yalcin, I. E., Cabi, E., & Kaya, Y. (2023). Production of secondary metabolites using tissue culture-based biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 14(June), 1–28. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1132555>
- Pandey, S. (2018). Morphology, Chemical Composition and Therapeutic Potential of Stevia Rebaudiana. *Iajps*, 05(04), 2260–2266. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1217075>
- Parnidi, RS, T. H., Murianingrum, A. R. M., & Marjani. (2022). Morfologi Bunga dan Daya Kecambah Benih Tanaman Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni M). *Artikel Pemakalah Paralel*, 7, 132–139.
- Peñarrubia, L., Romero, P., Carrió-Seguí, A., Andrés-Bordería, A., Moreno, J., & Sanz, A. (2015). Temporal aspects of copper homeostasis and its crosstalk with hormones. *Frontiers in Plant Science*, 6(APR), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00255>
- Perangin-Angin, Y., Purwaningrum, Y., Asbur, Y., Rahayu, M. S., & Nurhayati. (2019). Pemanfaatan kandungan metabolit sekunder yang dihasilkan tanaman pada cekaman biotik. *Agriland*, 7(1), 39–47.
- Park, J., Zuh-Kyung, S., Mi-Sun, K., Jang-Ho, H., Ki-Boem, M., Hyo-Jun, L., Hyeong-Kyu, L., Jae-Heung, J., Sang-Un, P., & Hyun-Soon, K. (2020). Production of flavonoids incallus cultures of *Saphora flavescens* Aiton. *Plants*, 9, 688, 1-13
- Peteliuk, V., Rybchuk, L., Bayliak, M., Storey, K. B., & Lushchak, O. (2021). Natural sweetener stevia rebaudiana: Functionalities, health benefits and potential risks. *EXCLI Journal*, 20, 1412–1430. <https://doi.org/10.17179/excli2021-4211>
- Piter, Z. B. Y. (2021). Metode Perbanyak Tanaman Ubi Jalar Ungu (Ipomea Batatas Poiret) Dengan Teknik Kultur Jaringan Atau Stek Planlet. *Jurnal Inovasi Penelitian*, 2(3), 1037–1046.
- Pono, P., Restiani, R., & Adityarini, D. (2021). Elisitasi Saponin dalam Kultur Kalus Ginseng Jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) Menggunakan Asam Salisilat. *Sciscitatio*, 2(2), 45–53. <https://doi.org/10.21460/sciscitatio.2021.22.66>
- Prashariska, K., Pitoyo, A., & Solichatun, S. (2021). Pengaruh Indole-3-Acetic Acid (Iaa) Dan Benzyl Amino Purine (Bap) Terhadap Induksi Dan Deteksi Alkaloid Kalus Kamilen (*Matricaria chamomilla* L.). *Innofarm: Jurnal Inovasi Pertanian*, 23(2), 104–114. <https://doi.org/10.33061/innofarm.v23i2.5916>
- Pražák, R., & Molas, J. (2015). Effect of copper concentration on micropropagation and accumulation of some metals in the dendrobium kingianum bidwill orchid. *Journal of Elementology*, 20(3), 693–703. <https://doi.org/10.5601/jelem.2014.19.4.748>
- Purba, R. V, Yuswanti, H., & Astawa, I. N. G. (2017). Induksi Kalus Eksplan daun Tanaman Anggur (*Vitis vinifera* L.) dengan Aplikasi 2,4-D Secara in Vitro. *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika*, 6(2), 218–228. <http://ojs.unud.ac.id/index.php/JAT>
- Purwaningrum, Y. (2018). Kultur Kalus Sebagai Penghasil Metabolit Sekunder Berupa Pigmen. *Agriland*, 2(2), 117–127. <http://penelitian.uisu.ac.id/wp->

content/uploads/2019/09/16.-Kultur-Kalus.pdf

- Putu Merthaningsih, N., Yuswanti, H., & Made Astiningsih, D. A. (2018). Induksi Kalus pada Kultur Pollen Phalaenopsis dengan Menggunakan Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat. *Agrotrop*, 8(1), 47–55.
- Rai, A., & Han, S. S. (2022). Critical Review on Key Approaches to Enhance Synthesis and Production of Steviol Glycosides: A Blueprint for Zero-Calorie Sweetener. *Applied Sciences (Switzerland)*, 12(17). <https://doi.org/10.3390/app12178640>
- Rasud, Y., & Bustaman, B. (2020). In Vitro Callus Induction from Clove (*Syzigium aromaticum* L.) Leaves on Medium Containing Various Auxin Concentrations. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 25(1), 67–72. <https://doi.org/10.18343/jipi.25.1.67>
- Ratih Restiani, Kaban, S. M. P., Sekar, A. A., & Matheos, J. H. (2024). Respon Pertumbuhan dan Toleransi Kalus *Talinum paniculatum* terhadap Cekaman Logam Berat Krom (Cr). *Jurnal Biologi Papua*, 16(1), 71–78. <https://doi.org/10.31957/jbp.3590>
- Retnaningati, D., Hermanto, H., Purwijantiningsih, E., & Solle, H. R. L. (2021). Pertumbuhan Kalus dan Produksi Katekin pada Kultur In Vitro Kalus Teh (*Camelia Sinensis* L.) dengan Penambahan Elisitor Ca^{2+} dan Cu^{2+} . *Biota : Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*, 6(September), 192–202. <https://doi.org/10.24002/biota.v6i3.5278>
- Sahin, G., Verma, S. K., & Gurel, E. (2017). Investigation of Relationship Between Chemical Stress Factors and Certain Metabolites Including Cardenolides in Callus Cultures of Endemic Turkish *Digitalis* L. Species. *International Journal of Secondary Metabolite*, 4(1), 26–35. <https://doi.org/10.21448/ijsm.356249>
- Salamah, N., & Guntarti, A. (2023). Analisis Instrumen: Kromatografi dan Elektroforesis. *Uad Press*, viii–42.
- Samanhudi, S., Tetrani Sakya, A., & Tri Retnosari, I. (2021). Multiplikasi *Aquilaria Malaccensis* dengan Naa Dan Ragi Pada Kultur In Vitro. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 15(1), 51–59. <https://doi.org/10.20886/jpth.2021.15.1.51-59>
- Sari, N., Suwarsi, E. R., & Sumadi. (2014). Optimization of type and concentration of PGR in embryogenic callus induction and regeneration into plantlets on carica pubescens (Lenne & K.Koch). *Biosantifika*, 6(1), 52–59. <http://journal.unnes.ac.id/nju/index.php/biosaintifika>
- Schmitt, O. J., Brunetto, G., Chassot, T., Tiecher, T. L., Marchezan, C., Tarouco, C. P., De Conti, L., Lourenzi, C. R., Nicoloso, F. T., Kreutz, M. A., & Andriolo, J. L. (2020). Impact of Cu concentrations in nutrient solution on growth and physiological and biochemical parameters of beet and cabbage and human health risk assessment. *Scientia Horticulturae*, 272(June), 109558. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109558>
- Septembre-Malaterre, A., Rakoto, M. L., Marodon, C., Bedoui, Y., Nakab, J., Simon, E., Hoarau, L., Savriama, S., Strasberg, D., Guiraud, P., Selambarom, J., & Gasque, P. (2020). *Artemisia annua*, a traditional plant brought to light. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 1–34. <https://doi.org/10.3390/ijms21144986>
- Setiawati, T., Astuti, A. L., Nurzaman, M., Ratningsih, N., & Biologi, D. (2021). Analisis Pertumbuhan Dan Kandungan Total Flavonoid Kultur Kalus Krisan

- (Chrysanthemum Morifolium Ramat) Dengan Pemberian Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) Dan Air Kelapa. *Jurnal Pro-Life*, 8(1), 32–44.
- Setiawati, T., Ayalla, A., Nurzaman, M., Kusumaningtyas, V. A., & Bari, I. (2020). Analisis Metabolit Sekunder Kultur Pucuk , Kalus , dan Tanaman Lapang Chrysanthemum morifolium Ramat Analysis of Secondary Metabolites of Shoot , Callus Culture and Field Plant of Chrysanthemum morifolium Ramat. *Jurnal ILMU DASAR*, 21(1), 1–10. <https://jurnal.unej.ac.id/index.php/JID>
- Shahzadi, A., Altaf, A., & Afrasiab, H. (2022). Effect of Cadmium and Copper on Morphological and Physiological Parameters of Stevia rebaudiana Bert. Under in Vitro Conditions. *Advancements in Life Sciences*, 9(4), 473–482.
- Sharma, S., Gupta, S., Kumari, D., Kothari, S. L., Jain, R., & Kachhwaha, S. (2023). Exploring Plant Tissue Culture and Steviol Glycosides Production in Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni: A Review. *Agriculture (Switzerland)*, 13(2), 1–30. <https://doi.org/10.3390/agriculture13020475>
- Shihab, M. Q. (2002). *Tafsir Al Misbah Jilid 1: Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Quran*. Jakarta: Lentera Hati
- Shihab, M. Q. (2002). *Tafsir Al Misbah Jilid 4: Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Quran*. Jakarta: Lentera Hati
- Shihab, M. Q. (2002). *Tafsir Al Misbah Jilid 9: Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Quran*. Jakarta: Lentera Hati
- Shihab, M. Q. (2002). *Tafsir Al Misbah Jilid 13: Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Quran*. Jakarta: Lentera Hati
- Shihab, M. Q. (2002). *Tafsir Al Misbah Jilid 13: Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Quran*. Jakarta: Lentera Hati
- Sila, V. U. R., Masing, F. A., & Santiari, M. (2022). Identifikasi Dan Karakterisasi Senyawa Metabolit Sekunder Tumbuhan Endemik Asal Desa Fatunisuan Kabupaten Timor Tengah Utara. *JST (Jurnal Sains dan Teknologi)*, 11(1), 184–191. <https://doi.org/10.23887/jstundiksha.v11i1.44995>
- Sinta, M. M., & Sumaryono, D. (2019). Pertumbuhan, Produksi Biomassa, dan Kandungan Glikosida Steviol pada Lima Klon Stevia Introduksi di Bogor, Indonesia. *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*, 47(1), 105–110. <https://doi.org/10.24831/jai.v47i1.20653>
- Siringoringo, R., Budi, S., Abduh, M., Bintoro, V. P., & Priyo Bintoro, V. (2022). Pengaruh Penambahan Daun Stevia (Stevia Rebaudiana) Effect of Adding Stevia Leaves (Stevia Rebaudiana) on Antioxidant Activities, Water Content, Ash Content and Sensory Attributes of Centella Asiatica L. Urban Leaf Tea. *Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia* , 15(02), 93–98. <https://doi.org/10.17969/jtipi.v15i2.26478>
- Sulandari, U., Hendrawati, L. S., Purba, Y. S., Arjuni, D., & Lestari, P. W. (2024). Penerapan HACCP Gula Sehat Stevia di PT Tri Arga Makmur Sentosa. *Journal Abdimas Mutiara*, 5(1), 15–23. <http://e-journal.sari-mutiara.ac.id/index.php/JAM>
- Sukma, F. F., & Fajri, R. (2019). Identifikasi Asam Dehidroasetat dalM Produk Kosmetika dengan Menggunakan HPLC (High Performance Liquid Cromatography). *Quimica: Jurnal Kimia Sains dan Terapan*, 1(2), 15-17

- Syamsuhidayat, S., & Hutapea, J. (1991). *Inventaris Tanaman Obat Indonesia (1)*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI
- Tappy, L. (2018). Fructose-containing caloric sweeteners as a cause of obesity and metabolic disorders. *Journal of Experimental Biology*, 121. <https://doi.org/10.1242/jeb.164202>
- Tarigan, S. D. S., Astarini, I. A., & Astiti, N. P. A. (2023). Inisiasi Kalus Bangle (*Zingiber purpureum* Roscoe) pada Beberapa Kombinasi 2.4-D dan Kinetin. *Jurnal Hortikultura Indonesia*, 14(2), 93–99. <https://doi.org/10.29244/jhi.14.2.93-99>
- Tavarini, S., Clemente, C., Bender, C., & Angelini, L. G. (2020). Health-Promoting Compounds in Stevia: The Effect of Mycorrhizal Symbiosis, Phosphorus Supply and Harvest Time. *Molecules*, 25(22), 1–18. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25225399>
- Tia, S., Auliya, Z., Rully, B., & Mohamad, N. (2018). Perbanyak Tanaman Kentang dengan Modifikais media MS. *Journal of Biological Sciences*, 48(3), 752.
- Tretel, J. R., Zilda, C. G., José, E. G., Juliana, S., & Hélida, M. M. (2018). Effect of copper sulphate (CuSO₄) elicitation on the chemical constitution of volatile compounds and the *in vitro* development of Basil. *Scientia Horticulturae*, 234, 19-26
- Tumanduk, R., Massi, M. N., Agus, R., Sarjana, S. P., Studi, P., Biomedik, I., & Hasanuddin, U. (2023). Analisis residu amoksisilin pada hepar dan ventrikulus ayam petelur di Pasar Tradisional Makassar. *Jurnal Ilmu Alam dan Lingkungan*, 14(2), 20–28.
- Ulva, M., Nurchayati, Y., Prihastanti, E., & Setiari, N. (2019). Pertumbuhan Kalus Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Varietas Permata F1 dari Jenis Eksplan dan Konsentrasi Sukrosa yang Berbeda secara In Vitro. *Life Science*, 8(2), 160–169. <http://journal.unnes.ac.id/sju/index.php/LifeSci>
- Unique, A. (2016). Tinjauan Aplikasi High Performance Liquid Chromatography (HPLC) dalam Analis Farmasi. *Jurnal Ilmiah Wahana Pendidikan*, 10(0), 1–23.
- Xu, E., Liu, Y., Gu, D., Zhan, X., Li, J., Zhou, K., Zhang, P., & Zou, Y. (2024). Molecular Mechanisms of Plant Responses to Copper: From Deficiency to Excess. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(13). <https://doi.org/10.3390/ijms25136993>
- Yadav, A. K., Singh, S., Yadav, S. C., Dhyani, D., Bhardwaj, G., Sharma, A., & Singh, B. (2013). Induction and morpho-chemical characterization of *Stevia rebaudiana* colchiploids. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 83(2), 159–165.
- Yadav, A. K., Singh, S., Dhayani, D., & Ahuja, P. S. (2011). A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Canadian Journal of Plant Science*, 91, 1-27
- Yruela, I. (2009). Copper in plants: Acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology*, 36(5), 409–430. <https://doi.org/10.1071/FP08288>
- Yusnita. (2015). Kultur Jaringan Tanaman Sebagai Teknik Penting Bioteknologi untuk Menunjang Pembangunan Pertanian. *Penerbit Aura Publishing*, 1–86.
- Zafar, H., Ali, A., & Zia, M. (2017). CuO Nanoparticles Inhibited Root Growth from *Brassica nigra* Seedlings but Induced Root from Stem and Leaf Explants.

- Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181(1), 365–378.
<https://doi.org/10.1007/s12010-016-2217-2>
- Zakiah, Z., & Turnip, M. (2024). Pertumbuhan Kalus dari Daun Belimbing Merah (*Baccaurea angulata*) dengan Penambahan 2 , 4-D (Dichlorophenoxy Acetic Acid) dan Kinetin *Jurusan Biologi FMIPA Universitas Tanjungpura* , Kota Pontianak. 5(1), 1–14.
- Zarad, M., Elateeq, A., Toaima, N. M., K. A. Refaey, K. A., & Atta, R. F. (2021). Copper sulfate and Cobalt chloride effect on total phenolics accumulation and antioxidant activity of *Artemisia annua* L. callus cultures. *Al-Azhar Journal of Agricultural Research*, 46(2), 26–40.
<https://doi.org/10.21608/ajar.2021.245610>
- Zlotek, U., Michalak-Majewska, M., & Szymanowska, U. (2016). Effect of Jasmonic acid elicitation on the yield chemical composition, and antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oil of lettuce leaf absil (*Ocimum basilicum* L.). *Food Chem*, 213, 1-7
- Zulhamdi, Z. (2020). Analisa Studi Kelayakan Bisnis Gula Alternatif Stevia di PT. Mitra Kerinci. *Jurnal Ilmu Manajemen*, 8(3), 700.
<https://doi.org/10.26740/jim.v8n3.p700-716>
- Zulharmita, Ummil K., & Harrizul, R., (2012). Pembuatan dan karakteristik ekstrak kering daun jambu biji (*Psidium guajava* L.), *Jurnal Farmasi Higea*, 4(2)

LAMPIRAN

- Lampiran 1 Uji SPSS *One way anava* dan Uji Lanjut DMRT 5%
- Uji normalitas

Tests of Normality

	dosis cu2+	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
berat kalus stevia	perlakuan 0 mg/l cu2+	.244	5	.200*	.871	5	.272
	perlakuan 1 mg/l cu2+	.273	5	.200*	.852	5	.201
	perlakuan 2 mg/l cu2+	.372	5	.022	.828	5	.135
	perlakuan 5 mg/l cu2+	.231	5	.200*	.881	5	.314
	perlakuan 10 mg/l cu2+	.349	5	.046	.771	5	.046

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

- Uji homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

berat kalus stevia

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.811	4	20	.053

- Uji Anava

ANOVA

berat kalus stevia

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.011	4	.003	15.076	.000
Within Groups	.004	20	.000		
Total	.015	24			

- Uji lanjut Duncan 5%

berat kalus stevia

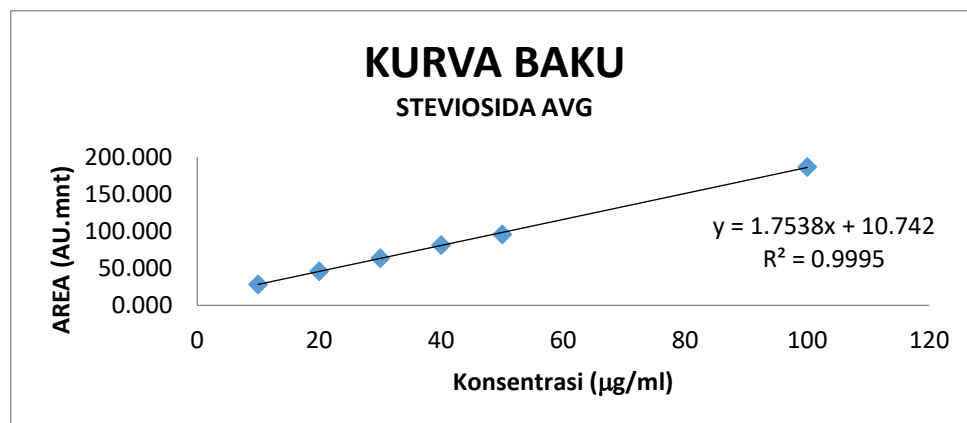
Duncan^a

dosis cu2+	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
perlakuan 0 mg/l cu2+	5	.0780		
perlakuan 10 mg/l cu2+	5		.1160	
perlakuan 5 mg/l cu2+	5		.1220	
perlakuan 1 mg/l cu2+	5		.1240	
perlakuan 2 mg/l cu2+	5			.1420
Sig.		1.000	.389	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

- Lampiran 2 Perhitungan kadar steviosida
- Standar baku steviosida



- Luas area larutan standar steviosida

STEVIOSIDA AVG		
Konsentrasi (µg/ml)	Area (mAU.mnt)	Area (AU.mnt)
10	28509	28.509
20	46338	46.338
30	63785	63.785
40	81411	81.411
50	95963	95.963
100	186891	186.891

- Perhitungan kadar steviosida

No	Kode Sampel	fp	Senyawa	Area (mAU)	Area (AU)	Kadar Uji (µg/ml)	Kadar ekstrak (µg/ml)	Kadar Sampel (% b/b)
1	A	20	Steviosida	204532	204.532	110.549	2210.98	2.21
2	B	20	Steviosida	694512	694.512	390.058	7801.16	7.80
3	C	20	Steviosida	1132239	1132.239	639.760	12795.20	12.80
4	D	20	Steviosida	1007736	1007.736	568.737	11374.74	11.37
5	E	20	Steviosida	734720	734.720	412.995	8259.90	8.26
6	Marker		Steviosida	1150741	1150.741	650.314	650.31	100.05

Keterangan :

fp = faktor pengenceran
 Konsentrasi ekstrak = 5g/50ml = 100000 µg/ml
 Konsentrasi marker steviosida = 650 µg/ml

- Hasil Kromatografi HPLC Steviosida

A

UV Detector
2500 Results

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height	Resolution (USP)	Asymmetry (10%)	S/N (ASTM)
1	Steviosida	10.500	1150741	64701	0.00000	1.18620	7.156897
2		12.783	30470	1521	4.60722	1.06676	5.251499

B

UV Detector
2500 Results

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height	Resolution (USP)	Asymmetry (10%)	S/N (ASTM)
1		8.000	111623	8517	0.00000	1.30134	0.135151
2		8.967	136667	8116	2.58063	1.34842	0.128788
3		9.817	1042914	59248	1.96553	1.20926	0.940173
4	Steviosida	10.633	204532	11410	1.77855	0.00000	0.181059
5		12.333	171363	8273	3.07076	0.00000	20.429932
6		12.700	113763	5817	0.47923	0.00000	14.364912
7		13.667	77308	2703	1.16471	1.05395	6.674980

C

UV Detector
2500 Results

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height	Resolution (USP)	Asymmetry (10%)	S/N (ASTM)
1		7.583	33286	2947	0.00000	1.47060	0.044461
2		8.100	106549	7943	1.57306	1.31367	0.119834
3		9.200	143214	9457	2.87416	0.00000	0.142675
4		9.750	558530	32120	1.27052	1.11041	0.484586
5	Steviosida	10.567	694512	37733	1.75460	1.14351	0.569267
6		12.517	177083	5436	2.98637	0.86060	9.667160
7		13.450	59269	2839	1.34781	0.00000	5.048761

D

UV Detector
2500 Results

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height	Resolution (USP)	Asymmetry (10%)	S/N (ASTM)
1		7.200	40094	4021	0.00000	2.29651	0.028135
2		7.550	52248	5118	0.00000	1.38820	0.035811
3		8.083	198025	14276	1.67992	1.32098	0.099890
4		9.133	449320	24113	2.53352	1.30322	0.168721
5		9.867	489724	27602	1.57965	1.20347	0.193134
6	Steviosida	10.717	1132239	61393	1.81419	1.15107	0.429572
7		11.950	39571	1744	2.36473	0.00000	0.012203
8		12.800	156162	5583	1.37050	0.79831	0.039065
9		13.700	78185	3453	1.39758	0.00000	0.024161

E

UV Detector
2500 Results

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height	Resolution (USP)	Asymmetry (10%)	S/N (ASTM)
1		7.133	135777	12992	0.00000	1.32633	0.071188
2		7.983	240507	17413	2.64235	1.28285	0.095412
3		8.883	109431	5930	2.21505	1.05424	0.032492
4		9.883	278733	14771	2.10751	1.22011	0.080935
5	Steviosida	10.750	1007736	54095	1.76281	1.12618	0.296405
6		12.867	60825	3074	4.12656	0.00000	8.863387
7		13.567	32945	1686	1.30492	1.13271	4.861311
8		14.433	51062	2389	1.54537	0.89210	6.888299

F

UV Detector
2500 Results

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height	Resolution (USP)	Asymmetry (10%)	S/N (ASTM)
1		7.233	30229	3249	0.00000	2.21787	0.029064
2		7.583	41482	3931	0.00000	1.41355	0.035165
3		8.100	161066	12115	1.62202	1.24670	0.108376
4		9.117	268588	17461	2.68655	1.21865	0.156199
5		9.800	378127	22398	1.62390	1.17008	0.200363
6	Steviosida	10.633	734720	40068	1.82932	1.14075	0.358432
7		12.383	98120	5002	0.00000	0.00000	13.047305
8		12.650	122524	5505	0.00000	0.00000	14.359339
9		13.550	56401	2508	0.00000	1.29600	6.541911

Keterangan: (A) sampel standar, (B) 0 mg/L, (C) 1 mg/L, (D) 2 mg/L, (E) 5 mg/L, (F) 10mg/.

- Lampiran 3 Persentase peningkatan berat basah kalus (%)

Perlakuan	Berat Basah (g)	Kenaikan berat basah (%)
Kontrol (0 mg/L)	0.078	-
1 mg/L Cu ²⁺	0.124	58.97
2 mg/L Cu ²⁺	0.142	82.05
5 mg/L Cu ²⁺	0.122	56.41
10 mg/L Cu ²⁺	0.116	48.72