

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Sistematika dan Morfologi Tanaman Stevia

Stevia rebaudiana merupakan tanaman herba yang tumbuh pada ketinggian 500 -1500 m di atas permukaan laut dengan suhu 14,9-26,7°C dan curah hujan 1658-1860 mm/tahun, tanaman ini dapat tumbuh di Tawangmangu pada ketinggian 1000 m di atas permukaan laut (Lutony, 1993; Ertis, 1990).

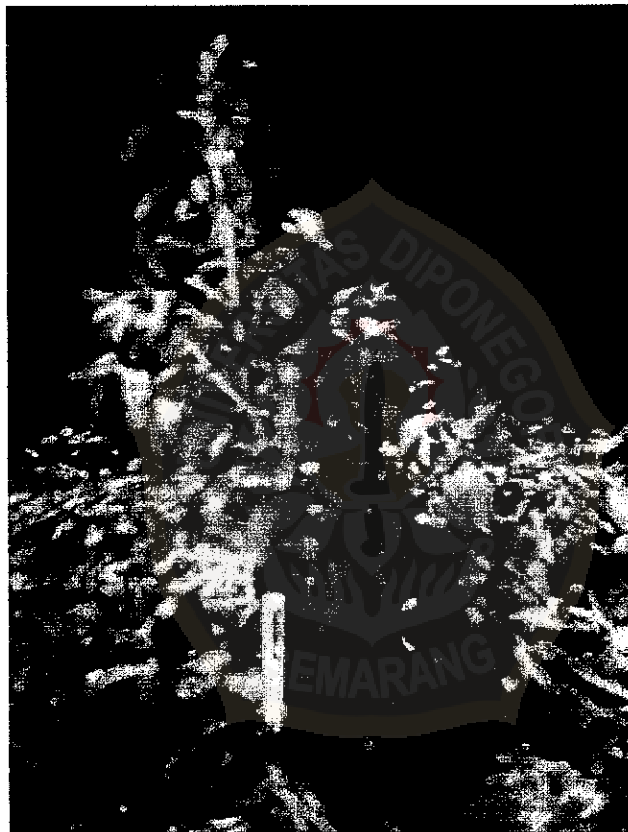
Sistematika tanaman stevia menurut Tjitrosoepomo (1996) adalah sebagai berikut :

Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Asterales
Famili	: Compositae
Genus	: Stevia
Spesies	: <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni (M)

Morfologi tanaman stevia berupa tanaman herba basah dengan tinggi tanaman 60-90 cm, batang berbentuk bulat, berbulu dan bercabang. Daunnya termasuk daun tunggal berbentuk bulat telur, terletak berhadapan pada bagian tepi bergerigi halus dengan panjang helaian daun 2-4 cm dan lebar 1-5 cm, tulang daun menyirip dan terdapat bulu-bulu halus. Bunga termasuk bunga majemuk berbentuk malai dengan kelopak bentuk tabung, tangkai benang sari dan putik pendek, kepala sari berwarna

kuning putik berwarna putih berbentuk silindris. Bentuk buah kotak berambut dan berwarna coklat. Bijinya berbentuk jarum berwarna putih. Akar stevia termasuk akar tunggang berwarna putih (Hutapea, 1991; Lutony,1993).

Perbanyakan tanaman stevia melalui dua cara yaitu secara generatif menggunakan biji dan secara vegetatif dengan stek, pemisahan anakan dan kultur 'in vitro' (Lutony,1993).



Gambar 1. Tanaman *Stevia rebaudiana* umur 6 bulan

B. Komposisi Daun Stevia

Rasa manis pada daun stevia disebabkan adanya kandungan beberapa bahan pemanis di dalamnya. Pada tahun 1931 telah berhasil diisolasi pemanis terbanyak dari daun stevia yaitu steviosida yang merupakan senyawa glikosida diterpen dengan rumus molekul $C_{38}H_{60}O_{18}$. Selain itu juga terdapat senyawa pemanis yang lain yaitu senyawa rebausida A,B,C,D,E. Kandungan steviosida dalam daun kering stevia antara 5-15%, rebausida A 3-6%, sedangkan untuk senyawa rebausida yang lain jumlahnya lebih sedikit (Tanaka, 1980 dalam Irawan, 1990).

Bahan-bahan lain yang terkandung dalam daun stevia antara lain adalah senyawa protein, fibers, karbohidrat, besi, K, Ca, Na, Mg, Zn, senyawa flavonoid, vitamin A, vitamin C, 53% minyak dan air (Tanaka, 1980 dalam Irawan, 1990).

C. Kultur 'In Vitro'

Menurut Pierik (1987) kultur in vitro berasal dari kata *culture* yang berarti budidaya dan *vitrous* yang berarti transparan. Jadi kultur 'in vitro' berarti menumbuhkan sel, jaringan atau organ tanaman di dalam suatu wadah kultur yang transparan (botol) menjadi tanaman kecil yang lengkap atau planlet dibawah kondisi lingkungan yang dapat diatur secara aseptis dan steril.

Menurut Gunawan (1995) teknik kultur 'in vitro' mempunyai beberapa manfaat, yaitu :

1. membantu dalam proses perbanyakan secara vegetatif tanaman untuk penyediaan bibit dalam skala besar.

2. Membantu mendapatkan bibit-bibit baru yang lebih unggul dan bebas dari virus yang dibawa oleh induknya.
3. Membantu program pemuliaan tanaman untuk mendapatkan tanaman yang kualitasnya lebih baik.
4. Membantu proses preservasi dan konservasi plasma nutfah tanaman.
5. Produksi senyawa kimia untuk keperluan farmasi dan bahan pewarna untuk industri makanan dan kosmetik.
6. Sebagai sarana bagi perbanyakan tanaman yang bijinya mempunyai daya berkecambah rendah.

Prinsip dasar teknik kultur 'in vitro' adalah apabila eksplan yang berupa sel, jaringan, atau organ tanaman dipelihara dalam media padat atau cair pada kondisi yang cocok dan steril maka sebagian sel-sel dari eksplan akan mengalami proliferasi membentuk massa sel yang belum terdiferensiasi yang disebut kalus, kemudian apabila kalus ini dipindahkan kedalam media differensiasi yang cocok akan membentuk plantlet, hal ini disebut sebagai morfogenesis tak langsung. Sedangkan apabila dari eksplan yang ditanam dalam medium akan langsung membentuk bagian-bagian atau organ tanaman seperti tunas atau akar maka proses ini disebut morfogenesis secara langsung (Street, 1977; Wattimena, 1991; dan Wetherell, 1982).

Faktor-faktor yang mempengaruhi kultur 'in vitro'

Keberhasilan teknik kultur 'in vitro' dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu : eksplan, media kultur, zat pengatur tumbuh, dan faktor lingkungan kultur.

a. Eksplan

Eksplan adalah bagian tanaman yang digunakan dalam kultur 'in vitro'. Menurut Gunawan (1995) umur tanaman, ukuran eksplan, dan jenis tanaman yang diambil dapat mempengaruhi keberhasilan kultur 'in vitro'. Eksplan yang baik diambil dari bagian tanaman yang masih muda karena pada bagian ini sel-selnya masih aktif membelah dibanding pada jaringan yang lebih tua. Menurut Wattimena (1991) eksplan tunas dari tanaman dewasa mempunyai daya multiplikasi yang rendah dibandingkan tunas dari tanaman yang muda atau kecambah.

Keberhasilan kultur 'in vitro' ditentukan juga oleh ukuran eksplan. Menurut Street (1977) eksplan dengan ukuran yang terlalu besar maupun terlalu kecil prosentase kegagalannya lebih besar, karena eksplan yang terlalu kecil mempunyai daya tahan hidup yang rendah, sedangkan ukuran eksplan yang terlalu besar meskipun lebih tahan saat dipindahkan dalam kondisi 'in vitro', pertumbuhannya lebih cepat dan lebih banyak menghasilkan mata tunas aksilar, eksplan yang terlalu besar akan kesulitan dalam sterilisasinya dan mudah terkontaminasi oleh mikroorganisme.

b. Media kultur

Media yang digunakan dalam kultur 'in vitro' ada dua macam yaitu media padat dan media cair. Media cair biasanya digunakan untuk kultur suspensi sel, sedangkan media padat digunakan untuk kultur kalus dan kultur organ tanaman. Media yang sering digunakan pada tanaman dikotil adalah media MS (Murashige dan

Skoog) karena jenis media ini mempunyai keistimewaan yaitu mengandung makronutrien dan mikronutrien yang tinggi dibandingkan dengan media yang lain.

Kebutuhan tanaman akan nutrisi sangat penting sehingga komponen penyusun media sangat mempengaruhi keberhasilan dalam kultur 'in vitro'. Menurut Gunawan (1995) media MS tersusun atas mineral anorganik, zat organik, dan biasanya dalam media ditambahkan zat pengatur tumbuh untuk merangsang pertumbuhan eksplan.

Mineral anorganik digolongkan menjadi dua yaitu makronutrien dan mikronutrien. Makronutrien dibutuhkan oleh tanaman dalam jumlah besar, unsur-unsur yang termasuk kedalam golongan ini antara lain adalah C, H, O, N, S, P, K, Ca, dan Mg. Sedangkan mikronutrien terdiri dari B, Cl, Mn, Fe, Cu, Zn, dan Mo yang dibutuhkan oleh tanaman dalam jumlah kecil (Daisy, 1994). Unsur besi dibutuhkan lebih banyak dibandingkan unsur mikro lainnya, biasanya unsur ini pada medium dalam bentuk $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dan $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot \text{H}_2\text{O}$. Menurut Street (1977) senyawa EDTA diberikan bersama-sama dengan unsur Fe karena senyawa ini berfungsi sebagai "Chelating agent" yang dapat mencegah pembentukan dan pengendapan ferrihidroksi ($\text{Fe}(\text{OH})_2$) yang tidak terlarut dan dapat menyebabkan defisiensi unsur Fe dari media.

Zat-zat organik yang biasa digunakan dalam medium kultur 'in vitro' antara lain sukrosa, moi-inositol, asam amino, dan zat pengatur tumbuh. Sebagai zat organik campuran dalam media kultur biasanya ditambahkan ekstrak yeast, air kelapa, ekstrak pisang, ekstrak ragi dan lain- lain.

Sukrosa dibutuhkan oleh eksplan yaitu dalam proses fotosintesis, dalam hal ini sukrosa berfungsi sebagai pengganti karbon (CO_2) yang biasanya didapatkan dari

atmosfer. Menurut Pierik (1987) kebutuhan sukrosa dalam media kultur 2-5%. Sedangkan vitamin yang biasa ditambahkan dalam medium adalah thiamin (B1), piridoksin (B6), niasin, dan asam askorbat. Menurut Staba (1980) asam-asam amino tertentu seperti asam aspartat, asparagin, alanin, asam glutamat, glutamin atau campuran alami misalnya kasein hidrolisat dapat merangsang pertumbuhan eksplan.

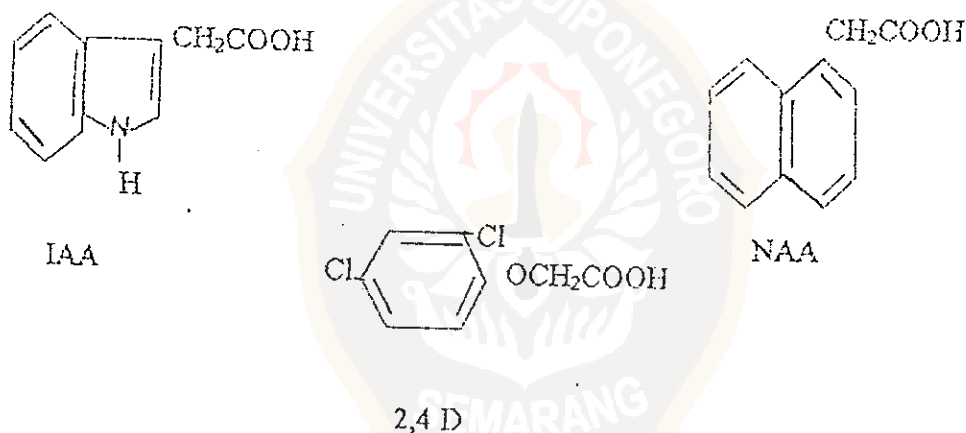
c. Zat Pengatur Tumbuh

Menurut Abidin (1995) zat pengatur tumbuh pada tanaman adalah senyawa organik bukan hara (nutrien) yang dalam jumlah sedikit dapat memacu pertumbuhan, menghambat, maupun merubah proses fisiologi tumbuhan. Golongan zat pengatur tumbuh yang bersifat memacu pertumbuhan dan perkembangan tanaman antara lain : auksin, sitokinin, dan giberalin, sedangkan yang bersifat menghambat pertumbuhan (inhibitor) adalah asam absisat, gas etilen, dan senyawa-senyawa fenolik. Zat pengatur tumbuh yang biasa digunakan dalam propagasi secara 'in vitro' adalah dari golongan auksin dan sitokinin (Wattimena,1991).

Auksin berperan dalam merangsang pembesaran sel yang terdapat pada bagian tanaman yang bersifat meristematik seperti pada ujung tanaman. Secara alami beberapa eksplan memproduksi auksin dalam jumlah yang cukup didalam jaringannya sendiri (auksin endogen), akan tetapi untuk induksi eksplan perlu penambahan auksin dalam konsentrasi tertentu. Menurut Sriyanti dan Wijayani (1994) auksin alami yang sering digunakan dalam organogenesis adalah IAA karena pengaruh yang ditimbulkan lebih kecil dibandingkan auksin sintetis, tetapi IAA dalam media apabila ikut disterilisasi dengan autoklave akan mudah mengalami

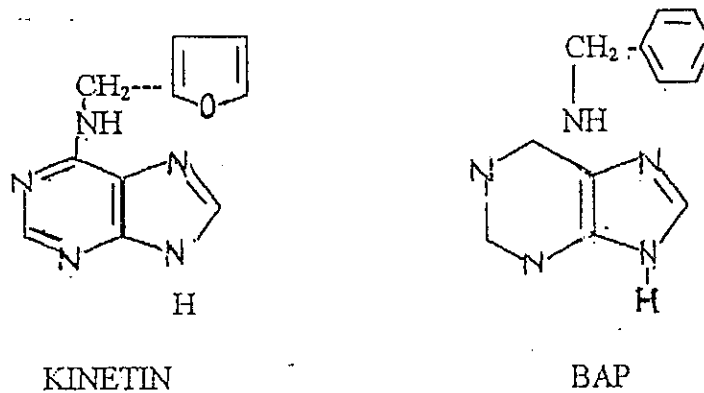
kerusakan karena sifatnya yang kurang stabil jika dibandingkan auksin sintetis seperti NAA. Menurut Pierik (1987) NAA lebih stabil dibandingkan dengan IAA karena tidak mudah terurai oleh enzim-enzim yang dikeluarkan sel, NAA juga mempunyai titik leleh 135°C sehingga tidak rusak oleh pemanasan saat sterilisasi dengan autoclave dengan suhu 121°C , disamping itu NAA ini juga lebih aman digunakan dibandingkan dengan 2,4-D (jenis auksin yang digunakan sebagai herbisida) karena NAA tidak bersifat toksik dan bukan termasuk auksin herbisida. Konsentrasi NAA yang biasa digunakan untuk merangsang multiplikasi tunas secara langsung adalah 0,1 sampai 10 mg/l (Wattimena, 1991).

Rumus bangun auksin :



Sitokinin merupakan ZPT yang penting untuk mengatur pertumbuhan dan morfogenesis. Menurut Abidin (1985) sitokinin mempunyai peranan dalam proses pembelahan sel yaitu meningkatkan sintesis RNA dalam inti sel. Konsentrasi yang optimal dari sitokinin untuk pertumbuhan tunas dapat menghambat pertumbuhan dan pembentukan akar. BAP adalah salah satu jenis sitokinin yang sering dipakai dalam kultur *in vitro* dengan kisaran konsentrasi 0,1 -10 mg/l (Pierik, 1987).

Rumus bangun sitokinin :



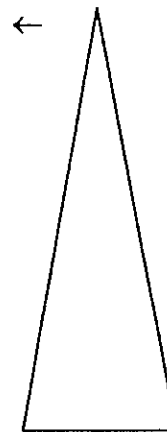
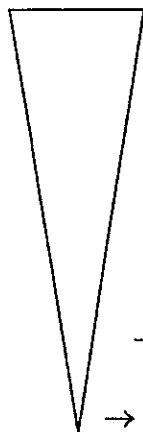
George dan Sherrington (1984) mengemukakan bahwa morfogenesis eksplan tergantung dari interaksi dan keseimbangan antara auksin dan sitokinin yang diberikan. Keseimbangan antara auksin dan sitokinin dalam memacu proses morfogenesis tanaman ini dapat dilihat dari skema sebagai berikut :

KONSENTRASI AUKSIN

KONSENTRASI SITOKININ

TINGGI

RENDAH



→ Pembentukan akar pada stek *in vitro* ←

→ Embriogenesis ←

→ Pembentukan tunas adventif dari Kalus ←

→ Inisiasi kalus tanaman dikotil ←

→ Pembentukan tunas adventif ←

→ Multiplikasi tunas aksilar ←

RENDAH

TINGGI

Menurut Narayanaswamy (1994) untuk menumbuhkan eksplan tunas apikal dari tanaman herba yang menghasilkan multiplikasi tunas secara langsung

menggunakan kombinasi konsentrasi auksin 0,1-1 mg/l dan sitokinin 1-2 mg/l. Hal ini dibuktikan dalam beberapa hasil penelitian dalam Wattimena (1991) yaitu untuk merangsang multiplikasi tunas yang terbanyak. Pada tanaman *Gerbera jasmesonii* membutuhkan kombinasi konsentrasi NAA 0,1 ppm dan BAP 2 ppm, sedangkan untuk tanaman *Nicotiana tobaccum* membutuhkan konsentrasi IAA 0,2 mg/l dan kinetin 2,0 mg/l. Menurut Harney (1983 dalam Arnold, et al., 1992) spesies, nutrien, jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh, serta kondisi lingkungan kultur sangat mempengaruhi laju multiplikasi tunas terbanyak.

d. Faktor Lingkungan Kultur

Faktor lingkungan kultur yang berpengaruh terhadap keberhasilan kultur 'in vitro' adalah cahaya, suhu, pH, kelembaban relatif dan terjaganya lingkungan kultur dalam keadaan steril.

1. pH

Sel tanaman yang dikembangkan secara 'in vitro' dapat hidup dalam media dengan kisaran pH media antara 5.0-6.0, apabila eksplan mulai tumbuh dan menggunakan nutrien dari media, maka ketika nutrien mulai habis pH akan naik. Pengukuran pH dilakukan pada saat pembuatan media dengan menggunakan pH meter, untuk mendapatkan pH yang normal dilakukan dengan penambahan NaOH pada saat pembuatan media (Wetherell, 1982).

2. Kelembaban

Kelembaban relatif dalam ruang kultur perlu diatur sebaik mungkin agar dapat mendukung pertumbuhan eksplan dalam botol kultur. Apabila kelembaban rendah

maka penguapan air dari dalam media kultur akan menjadi sangat besar sehingga kelembaban ruangan perlu dinaikkan, tetapi apabila kelembabannya terlalu tinggi (diatas 95%) akan menyebabkan terjadinya pertumbuhan mikrobia di luar wadah kultur sehingga menaikkan derajat kontaminasi. Penguapan yang berlebihan dapat dihindari dengan memasukkan rak-rak wadah kultur ke dalam kantong plastik, karena kantong ini juga dapat mengurangi terjadinya kontaminasi (Wetherell, 1982). Menurut George dan Sherrington (1994) kelembaban ruang kultur sebaiknya lebih dari 70 %.

3. Suhu

Menurut beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa setiap jenis tanaman berdasarkan habitatnya memiliki toleransi yang berbeda-beda terhadap kisaran suhu, sehingga masing-masing tanaman mempunyai suhu optimum untuk pertumbuhan dan perkembangannya. Dalam lingkungan kultur 'in vitro' suhu antara siang dan malam hampir sama yaitu berkisar antara 22 – 26 ° C(George dan Sherrington, 1994).

4. Cahaya

Pengaruh cahaya yang dibutuhkan dalam kultur tergantung kualitas cahaya dan intensitasnya. Sumber cahaya yang sering digunakan dalam kultur 'in vitro' adalah lampu fluoresensi yang berwarna putih. Menurut Wetherell (1982) lampu jenis ini mempunyai kelebihan yaitu cahaya lebih merata dan suhu yang ditimbulkan relatif lebih rendah yaitu 20-28°C yang sesuai untuk pertumbuhan eksplan yang dikulturkan. Intensitas cahaya yang digunakan adalah 1000-2000 lux.

e. Pertumbuhan Tanaman

Pertumbuhan dapat didefinisikan sebagai penambahan secara teratur semua komponen sel hidup suatu organisme. Pertumbuhan pada tanaman meliputi proses proliferasi sel, yaitu sel mengalami penambahan jumlah yang kemudian diikuti dengan pembesaran sel dan perkembangan yaitu diferensiasi ke arah morfogenesis organ tanaman. Pertumbuhan ini bersifat 'irreversible'. Menurut Salisbury dan Ross (1995) konsep pertumbuhan bersifat universal yang menyangkut semua reaksi biokimia, biofisika, serta proses fisiologis yang berlangsung di dalam tubuh tanaman, penambahan ukuran dan volume yang bisa diukur merupakan parameter pertumbuhan yang utama. Jumlah sel dan organ-organ merupakan salah satu yang dapat diukur dari parameter tersebut, dalam hal ini pengukuran bisa dilakukan dengan mengukur jumlah daun, akar, tunas, bunga dan buah. Parameter pertumbuhan yang berupa penambahan volume atau massa yang meliputi berat basah dan berat kering merupakan parameter yang dapat diukur juga, sedangkan untuk parameter pertumbuhan yang berupa penambahan ukuran dapat diketahui dengan mengukur tinggi tanaman, lebar daun, dan diameter batang tanaman.