

Peningkatan Pertumbuhan Kultur Tunas *Stevia rebaudiana* Bertoni pada Media dengan Peningkatan Kadar Vitamin dan Glisin serta Penggunaan Jenis Tutup Tabung Berbeda

(Growth Acceleration of *Stevia rebaudiana* Bertoni Shoot Culture on Medium with Increased Levels of Vitamins and Glycine and The Use of Different Types of Test Tube Covers)

Tri Muji Ermayanti *, Deritha Elly Rantau, Erwin Al Hafizh & Evan Maulana

Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI
Jl. Raya Bogor KM 46, Cibinong, 16911
*Email: trimujiermayanti@gmail.com

Memasukkan: Februari 2017, Diterima: Mei 2017

ABSTRACT

Stevia rebaudiana is plant species producing natural sweetener with has low calories. The species propagation could be done by tissue culture technique to obtain propagules with high quality and sustainability. Modification of media composition and *in vitro* environment will increase growth and vigority of explants so that they have high survival rate during acclimatization. The aim of this research was to increase growth of stevia shoot culture by increasing the level of vitamins in combination with different type of test tube covers. Stevia shoot tips were cultured on MS medium containing normal concentration of its vitamins (control treatment; Myo-inositol 100 mg/l; Nicotinic acid 0.5 mg/l; Pyridoxine-HCl 0.5 mg/l; Thiamine-HCl 0.5 mg/l and Glycine 2 mg/l), twice and 4 folds of vitamin levels, they were grown on culture tubes with Al-foil and ventilated-plastic with filter (2 cm diameter and pore size at 0,22 micron). Height of shoots, number of nodes, number of leaves, number of roots were observed every week till 8 weeks of culture. Biomass (fresh and dry weights) and chlorophyll level and acclimatization were done 8 weeks of culture. The results showed that type of culture tube covers affected significantly to all growth parameters, biomass as well as level of chlorophyll, meanwhile level of vitamins only affected number of nodes, shoots and roots. Interaction between vitamin level and covers types only occured for height of shoots and number of roots. Plantlets grown on medium containing 4 fold of vitamin level (Myo-inositol 400 mg/l; Nicotinic acid 2 mg/l; Pyridoxine-HCl 2 mg/l; Thiamine-HCl 2 mg/l and Glycine 8 mg/l) with ventilated-plastic cover had larger leaves compared to other treatments. All plantlets survived in a greenhouse.

Keywords: *Stevia rebaudiana*, *in vitro* growth, increase in vitamin concentration.

ABSTRAK

Stevia rebaudiana merupakan pemanis alami dengan kalori rendah. Perbanyak tanaman ini dapat dilakukan secara kultur jaringan untuk memperoleh bibit berkualitas dan berkelanjutan. Modifikasi media dan lingkungan tumbuh *in vitro* diperlukan untuk meningkatkan pertumbuhan dan ketegaran eksplan sehingga mempunyai keberhasilan tinggi selama proses aklimatisasi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk meningkatkan pertumbuhan kultur tunas stevia dengan peningkatan kadar vitamin dan penggunaan jenis tutup tabung berbeda. Tunas pucuk stevia dikulturkan pada media MS dengan konsentrasi vitamin normal (kontrol; Myo-inositol 100 mg/l; Asam nikotinat 0,5 mg/l; Piridoksin-HCl 0.5 mg/l; Tiamin-HCl 0,5 mg/l and Glisin 2 mg/l) dan peningkatan konsentrasi vitamin 2 dan 4 kali konsentrasi normal, ditumbuhkan pada tabung kultur dengan tutup Al-foil dan plastik transparan berventilasi filter diameter 2 cm dengan ukuran pori 0,22 mikron. Tinggi tunas, jumlah daun, jumlah buku, jumlah akar diamati setiap minggu hingga kultur berumur 8 minggu. Biomassa (bobot basah dan bobot kering) dan kadar klorofil serta aklimatisasi dilakukan pada saat kultur berumur 8 minggu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis tutup tabung kultur berpengaruh terhadap semua parameter pertumbuhan, biomassa dan kadar klorofil, sedangkan konsentrasi vitamin hanya berpengaruh terhadap jumlah buku, tunas, daun dan akar. Interaksi antara jenis tutup tabung dan konsentrasi vitamin hanya terjadi untuk tinggi tunas dan jumlah akar. Planlet yang ditanam media dengan 4 kali konsentrasi normal vitamin (Myo-inositol 400 mg/l; Asam nikotinat 2 mg/l; Piridoksin-HCl 2 mg/l; Tiamin-HCl 2 mg/l and Glisin 8 mg/l) dan pada tabung dengan tutup berventilasi mempunyai ukuran daun yang lebih besar dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Semua planlet dapat tumbuh di rumah kaca.

Kata Kunci : *Stevia rebaudiana*, pertumbuhan *in vitro*, peningkatan kadar vitamin.

PENDUHLUAN

Stevia rebaudiana Bertoni (famili Compositae), sering disebut stevia, adalah tanaman asal Amerika Selatan yaitu Brazil dan Paraguay banyak diteliti karena daunnya mengandung bahan pemanis alami yaitu glikosida steviosida (Hussain *et al.* 1988; Ahmed *et al.* 2011; Ferrazzano *et al.* 2016). Senyawa ini mempunyai kadar manis 300 kali lebih tinggi dibandingkan dengan sukrosa. Karena pemanis ini rendah kalori, maka stevia sering dimanfaatkan untuk keperluan pengobatan penyakit yang berhubungan dengan metabolisme gula dan untuk penderita diabetes melitus. Kandungan kimia lainnya pada stevia yaitu Rebausida A dan isosteviol juga berkhasiat obat (Takahashi *et al.* 2001; Boonkaewwan *et al.*; 2006; Jayaraman *et al.* 2008).

Produksi bibit tanaman unggul banyak dilakukan dengan teknik kultur jaringan. Penelitian perbanyakan dengan kultur jaringan seringkali dilakukan dengan memanipulasi media dengan penambahan zat pengatur tumbuh untuk meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Demikian juga pada *S. rebaudiana*, mikropropagasi antara lain dilakukan dengan perlakuan kombinasi zat pengatur tumbuh sitokinin dan auksin seperti BAP dan NAA untuk pembentukan kalus dari eksplan buku kemudian dilanjutkan dengan organogenesis, serta pemberian IBA untuk perakaran (Karim *et al.* 2008); atau menggunakan eksplan akar dikulturkan pada media MS yang mengandung BAP dan TDZ (Ghauri *et al.* 2013); atau dengan kombinasi kinetin dan BAP dari eksplan tunas pucuk, tunas samping dan buku (Anbazhagan *et al.* 2010; Das *et al.* 2011). Setelah tahap perbanyakan tunas, setiap tunas perlu dipindahkan perakaran sebelum tahap aklimatisasi. Anbazhagan *et al.* (2010) melaporkan bahwa setelah tahap perbanyakan tunas pada media yang mengandung sitokinin, tunas perlu dipindahkan ke media Nitsch dengan penambahan auksin IAA untuk perakaran. Nower (2014), Autade *et al.* (2014) dan Bhingradiya *et al.* (2016) juga melaporkan bahwa sitokinin diperlukan untuk multiplikasi tunas, sedangkan auksin diperlukan untuk perakaran stevia. Pada penelitian berbeda Gupta *et al.* (2010) melaporkan bahwa auksin IAA lebih sesuai untuk pembentukan akar, sedangkan NAA dan IBA lebih responsif untuk

pembentukan kalus.

Pada stevia, penggunaan zat pengatur tumbuh sitokinin dapat menyebabkan pembentukan kalus pada pangkal tunas (Nower 2014) sehingga eksplan perlu dipindahkan secara bertahap pada media yang berbeda sebelum dipindahkan pada media perakaran (Ghauri *et al.* 2013). Modifikasi lingkungan tumbuh *in vitro* seperti pemilihan jenis tutup tabung yang tepat dapat meningkatkan pertumbuhan dan ketegaran planlet. Penggunaan tutup botol kultur berventilasi (menggunakan filter) meningkatkan pertukaran udara dari dan ke dalam tabung sehingga dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman pada media tanpa penambahan zat pengatur tumbuh. Manipulasi dan mengontrol lingkungan *in vitro* diperlukan untuk meningkatkan kemampuan eksplan berfotosintesis, mengubah kondisi mikrotropik (menggunakan gula, zat pengatur tumbuh dan intensitas cahaya relatif rendah) menjadi ototropik (tanpa gula, meningkatkan konsentrasi gas CO₂, dan cahaya relatif tinggi) (Kozai 2010). Pada kondisi ini tunas dapat membentuk akar dengan baik tanpa dipindahkan pada media perakaran maupun *hardening*, planlet siap dilakukan aklimatisasi (Hazarika 2003). Konsentrasi vitamin berpengaruh terhadap organogenesis beberapa jenis tanaman (Abrahamian & Kantharajah 2011).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk meningkatkan pertumbuhan tunas *S. rebaudiana* yang dikulturkan pada media MS tanpa penambahan zat pengatur tumbuh dengan peningkatan kadar vitamin dan glisin yang ditanam pada tabung dengan jenis tutup tabung berbeda.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan tanaman yang digunakan adalah tunas pucuk dari kultur stevia berumur 4-5 minggu yang ditumbuhkan pada media MS (Murashige & Skoog, 1962) tanpa penambahan zat pengatur tumbuh. Media mengandung 30g/l gula, dipadatkan dengan 8g/l agar.

Rancangan penelitian adalah faktorial, sebagai faktor pertama adalah 3 level vitamin + glisin (asam amino) MS yaitu konsentrasi normal (kontrol; Myo-inositol 100 mg/l; Asam nikotinat 0,5 mg/l; Piridoksin-HCl 0,5 mg/l; Tiamin-HCl 0,5 mg/l and Glisin 2 mg/l), 2 dan 4 kali konsentrasi normal. Faktor kedua adalah jenis tutup tabung Al-foil (kontrol) dan plastik

tranparan berventilasi filter dengan ukuran pori 0,22 mikron, dengan diameter filter sebesar 2 cm. Masing-masing perlakuan mempunyai 12 ulangan. Media dasar yang digunakan adalah MS yang mengandung 30 g/l gula, dan zat pematat 3% agar (Gellex, Caisson). Tabung kultur yang digunakan adalah tabung kaca dengan tinggi 15cm, diameter 5cm. Media disterilisasi dengan otoklaf pada suhu 121⁰C, tekanan 1 atm selama 15 menit.

Tunas pucuk stevia ukuran panjang sekitar 1 cm ditanam pada media perlakuan. Masing-masing tabung berisi 4 eksplan. Semua kultur diinkubasi di dalam ruang kultur pada suhu 26-28⁰C dengan pencahayaan kontinyu pada intensitas cahaya 1000-1200 lux. Pengamatan pertumbuhan tunas dilakukan setiap minggu sampai umur 8 minggu. Parameter yang diamati adalah tinggi tunas, jumlah buku, jumlah daun, jumlah tunas total dan jumlah akar. Pada akhir pengamatan (umur 8 minggu), biomassa planlet dihitung dengan cara menimbang bobot basah dan bobot keringnya (kering angin). Aklimatisasi dilakukan dengan cara mengeluarkan planlet dari botol kultur kemudian ditanam pada media tanah:pasir:kompos (1:1:1). Planlet pada polibag diberi tutup plastik, kemudian ditempatkan di dalam rumah kaca. Setelah tumbuh daun baru, tutup plastik dibuka. Setelah 3 minggu, dihitung jumlah tanaman yang tumbuh.

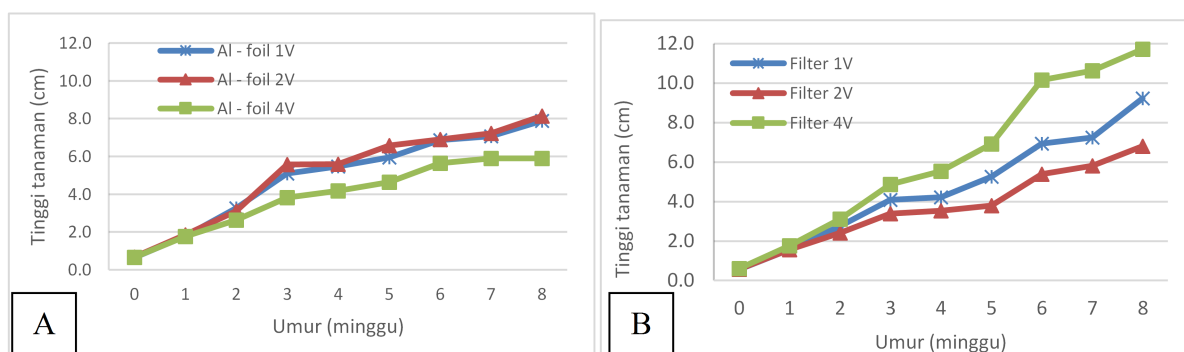
Parameter lain yang diamati adalah total klorofil daun dari planlet stevia berumur 8 minggu. Analisis klorofil dilakukan dengan cara menggerus halus sampel daun steviasegar sebanyak 0.25 -

0.075 g, kemudian sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan ditambah 10ml aseton 80%. Setelah dikocok selama 5 menit (menggunakan vortex), sampel disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang dihasilkan selanjutnya diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang (λ) 645 dan 663nm. Kadar klorofil dihitung mengikuti metode Meeks (1974). Klorofil a = $[(12,7 \times A_{663}) - (2,69 \times A_{645})] \times \text{volume (ml)}/\text{bobot daun (g)}$. Klorofil b = $[(22,9 \times A_{645}) - (4,68 \times A_{663})] \times \text{volume (ml)}/\text{bobot daun (g)}$. A₆₄₅ adalah nilai absorbansi pada $\lambda=645$, sedangkan A₆₆₃ adalah nilai absorbansi pada $\lambda = 663$.

Data hasil pengamatan dianalisis secara statistik menggunakan ANOVA dengan Software DSAASTAT, kemudian dilanjutkan dengan uji lanjut DMRT jika berbeda nyata.

HASIL

Tunas stevia yang ditanam pada tabung kultur dengan tutup Al-foil mempunyai pertumbuhan tinggi yang berbeda dengan tunas yang ditanam pada tabung dengan tutup plastik transparan berventilasi filter (Gambar 1). Pada tabung dengan tutup Al-foil, pertumbuhan tinggi tanaman pada media MS yang mengandung semua kadar vitamin + glisin mempunyai pertumbuhan tinggi tunas yang serupa hingga minggu ke 2, namun kemudian tunas pada media dengan konsentrasi vitamin + glisin normal dan 2 kali lipat mempunyai pertumbuhan tunas lebih tinggi dibandingkan dengan tunas pada media yang



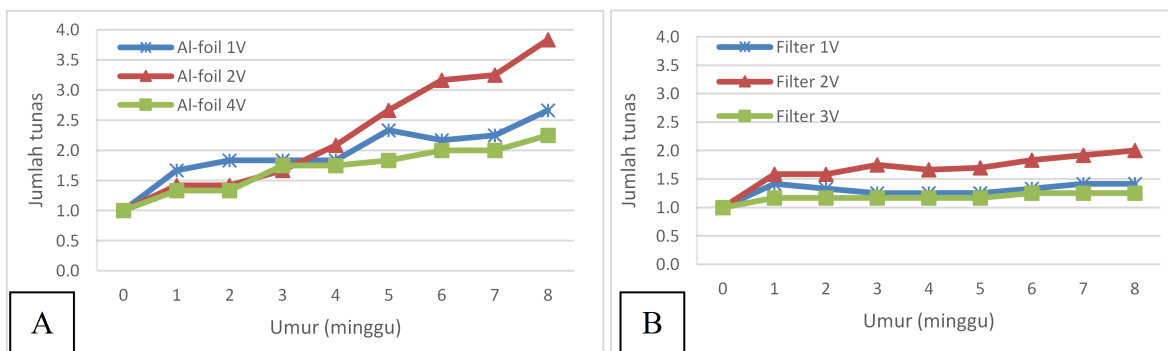
Gambar 1. Rata-rata tinggi tunas *S. rebaudiana* umur 0-8 minggu pada media MS dengan penambahan vitamin + glisin 1, 2 dan 4 kali kadar normal menggunakan tutup kultur Al-foil (A) dan plastik berventilasi filter (B). Konsentrasi normal vitamin+glisin: Myo-inositol 100 mg/l; Asam nikotinat 0,5 mg/l; Piridoksin-HCl 0,5 mg/l; Tiamin-HCl 0,5 mg/l dan Glisin 2 mg/l.

mengandung 4 kali konsentrasi vitamin + glisin (Gambar 1A). Pertumbuhan tinggi tunas stevia pada media dengan tutup plastik transparan berventilasi filter dengan peningkatan vitamin + glisin 4 kali konsentrasi normal lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi vitamin + glisin normal dan konsentrasi vitamin + glisin 2 kali lipat. Setelah tunas berumur 2 minggu perbedaan tinggi tunas stevia mulai berbeda (Gambar 1B).

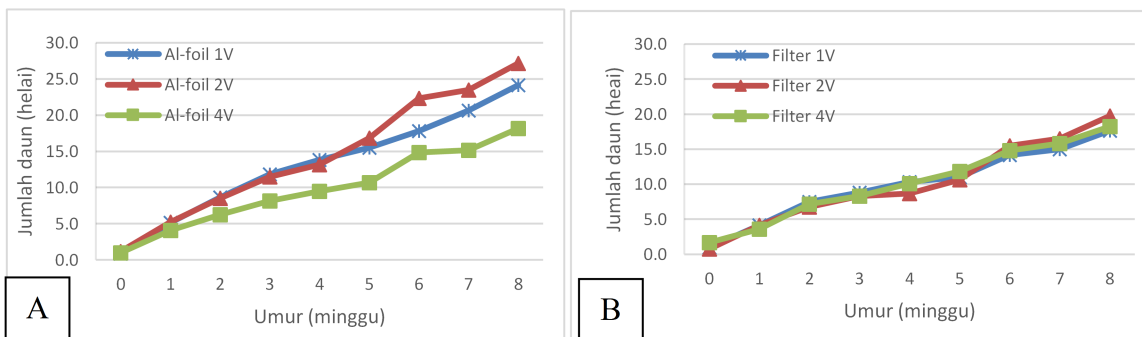
Jumlah tunas stevia yang diamati mulai tanam hingga umur tunas 8 minggu pada media dengan peningkatan vitamin + glisin dan penggunaan tutup tabung berventilasi tertera pada Gambar 2. Peningkatan konsentrasi menjadi 2 kali lipat meningkatkan jumlah tunas mulai minggu ke 5 pada media dengan tutup Al-foil (Gambar 2A). Stevia pada media dengan tutup berventilasi mempunyai pertumbuhan jumlah tunas yang

lebih rendah dibandingkan dengan tunas pada tabung dengan tutup Al-foil. Peningkatan vitamin+ glisin 2 kali lebih tinggi dari konsentrasi normalnya hanya sedikit meningkatkan pertumbuhan jumlah tunas mulai minggu ke-3 (Gambar 2B).

Jumlah daun stevia pada media dengan peningkatan vitamin + glisin hanya berpengaruh terhadap tunas yang ditanam pada tabung kultur bertutup Al-foil (Gambar 3). Pada tabung bertutup Al-foil, peningkatan vitamin + glisin menjadi 2 kali lipat meningkatkan jumlah daun setelah minggu ke-5, sedangkan peningkatan vitamin+glisin menjadi 4 kali lipat menurunkan jumlah daun mulai minggu pertama (Gambar 3A). Jumlah daun pada tunas stevia yang ditanam pada tabung dengan tutup plastik berventilasi filter hingga minggu ke-8 tidak berbeda (Gambar 3B). Pola pertumbuhan jumlah buku stevia sejak ditanam sampai umur 8 minggu sama seperti pola



Gambar 2. Rata-rata jumlah tunas *S. rebaudiana* umur 0-8 minggu pada media MS dengan penambahan vitamin + glisin 1, 2 dan 4 kali kadar normal menggunakan tutup kultur Al-foil (A) dan plastik berventilasi filter (B). Konsentrasi normal vitamin+glisin: Myo-inositol 100 mg/l; Asam nikotinat 0,5 mg/l; Piridoksin-HCl 0,5 mg/l; Tiamin-HCl 0,5 mg/l dan Glisin 2 mg/l.



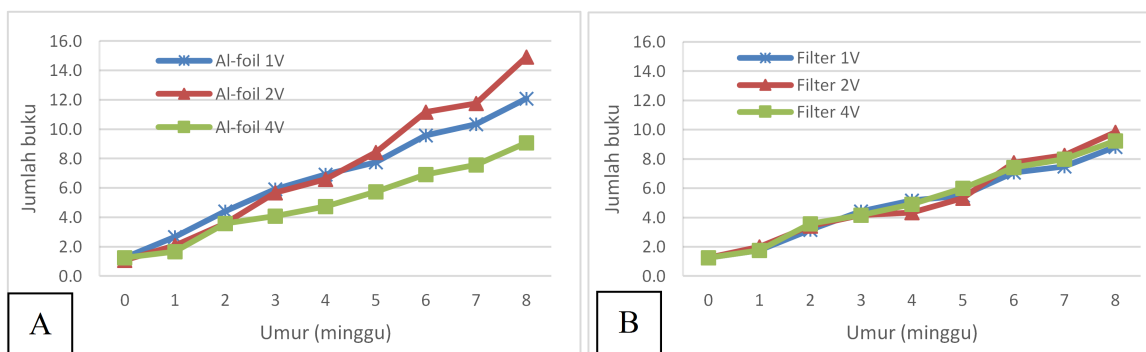
Gambar 3. Rata-rata jumlah daun *S. rebaudiana* umur 0-8 minggu pada media MS dengan penambahan vitamin+glisin 1, 2 dan 4 kali kadar normal menggunakan tutup kultur Al-foil (A) dan plastik berventilasi filter (B). Konsentrasi normal vitamin+glisin: Myo-inositol 100 mg/l; Asam nikotinat 0,5 mg/l; Piridoksin-HCl 0,5 mg/l; Tiamin-HCl 0,5 mg/l dan Glisin 2 mg/l.

pertumbuhan jumlah daun. Peningkatan vitamin + glisin hanya berpengaruh terhadap tunas yang ditanam pada tabung dengan tutup Al-foil (Gambar 4).

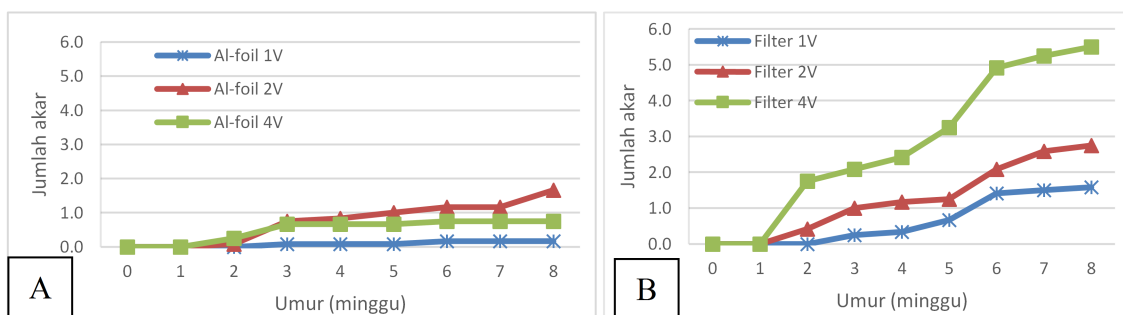
Peningkatan kadar vitamin+glisin meningkatkan jumlah akar yang terbentuk baik pada tunas stevia yang ditanam pada tabung dengan tutup Al-foil maupun plastik berventilasi filter (Gambar 5). Peningkatan jumlah akar pada tunas yang ditanam pada tabung bertutup Al-foil terjadi setelah minggu kedua (Gambar 5A), sedangkan pada tabung dengan tutup berventilasi terjadi setelah minggu pertama (Gambar 5B). Pada tabung dengan tutup plastik berventilasi peningkatan jumlah akar lebih tinggi dibandingkan dengan akar pada tabung dengan tutup Al-foil.

Analisis statistik parameter pertumbuhan tinggi tunas, jumlah tunas, jumlah daun dan

jumlah buku pada kultur tunas stevia umur 8 minggu disajikan pada Tabel 1. Tunas tertinggi diperoleh pada kultur yang ditanam pada media dengan konsentrasi vitamin+glisin 4 kali konsentrasi normal pada tabung kultur bertutup plastik berventilasi namun tidak berbeda nyata dengan media dengan vitamin + glisin konsentrasi normal dan tutup tabung Al-foil konsentrasi vitamin 2 kali lipat. Kisaran tunas tertinggi diperoleh pada kultur yang ditanam pada media dengan konsentrasi vitamin + glisin 4 kali lipat pada tabung pertutup plastik berventilasi. Tunas terendah terdapat pada media dengan konsentrasi vitamin+glisin 4 kali lipat pada tabung dengan tutup Al-foil. Jumlah tunas, jumlah daun dan jumlah stevia tertinggi pada umur 8 minggu terdapat pada kultur yang ditanam pada media dengan konsentrasi vitamin + glisin 2 kali pada



Gambar 4. Rata-rata jumlah buku *S. rebaudiana* umur 0-8 minggu pada media MS dengan penambahan vitamin+glisin 1, 2 dan 4 kali kadar normal menggunakan tutup kultur Al-foil (A) dan plastik berventilasi filter (B). Konsentrasi normal vitamin+glisin: Myo-inositol 100 mg/l; Asam nikotinat 0,5 mg/l; Piridoksin-HCl 0,5 mg/l; Tiamin-HCl 0,5 mg/l dan Glisin 2 mg/l



Gambar 5. Rata-rata jumlah akar *S. rebaudiana* umur 0-8 minggu pada media MS dengan penambahan vitamin+glisin 1, 2 dan 4 kali kadar normal menggunakan tutup kultur Al-foil (A) dan plastik berventilasi filter (B). Konsentrasi normal vitamin + glisin: Myo-inositol 100 mg/l; Asam nikotinat 0,5 mg/l; Piridoksin-HCl 0,5 mg/l; Tiamin-HCl 0,5 mg/l dan Glisin 2 mg/l.

tabung tertutup Al-foil, berbeda nyata dengan semua perlakuan lainnya. Pada media ini kisaran ketiga parameter pertumbuhan tersebut juga tertinggi (Tabel 1).

Persentase terbentuknya akar stevia terbesar pada umur 8 minggu diperoleh pada kultur tunas yang ditanam pada media yang mengandung vitamin + glisin konsentrasi 2 kali pada tabung tertutup plastik berventilasi, namun jumlah akar terbanyak diperoleh pada media dengan konsentrasi vitamin + glisin 4 kali lipat, berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Pada media ini kisaran jumlah akar

juga terbanyak. Persentase pembentukan akar, jumlah akar dan kisaran jumlah akar terendah diperoleh pada kultur tunas yang ditanam pada media yang mengandung konsentrasi vitamin + glisin normal pada tabung tertutup Al-foil (Tabel 2).

Uji statistik biomassa yaitu bobot basah dan bobot kering planlet stevia berumur 8 minggu menunjukkan bahwa konsentrasi vitamin + glisin normal dan dua kali lipat menghasilkan bobot basah dan bobot kering tertinggi berbeda nyata dengan semua perlakuan lainnya. Biomassa terendah diperoleh pada kultur yang ditumbuhkan

Tabel 1. Pertumbuhan *S. rebaudiana* minggu ke-8 pada media MS dengan penambahan vitamin + glisin 1, 2 dan 4 kali kadar normal menggunakan tutup kultur Al-foil dan plastik berventilasi filter

Tutup	Kadar Vitamin (kelipatan kadar normal)*	Rata-rata tinggi tunas (cm)	Kisaran tinggi tunas (cm)	Rata-rata Jumlah tunas	Kisaran jumlah tunas	Rata-rata Jumlah daun (helai)	Kisaran jumlah daun (helai)	Rata-rata Jumlah buku	Kisaran jumlah buku
Al-foil	1	7,8 bc	3,0-10,5	2,7c	2-5	24,2 bc	14-38	12,1 b	7-19
	2	8,1de	5,0-10,3	3,8d	1-7	27,2 c	14-42	14,9 c	7-30
	4	5,9 a	4,0-10,5	2,3bc	1-4	18,2 a	6-30	9,1 a	3-15
Plastik berfilter	1	9,2 de	4,0-11,5	1,4 a	1-2	17,7 a	6-30	8,8 a	3-15
	2	6,8 ab	3,5-10,8	2,0b	1-3	19,8 ab	10-32	9,8 a	4-16
	4	11,7 e	6,0-17,0	1,3 a	1-2	18,3 ab	12-23	9,3 a	6-12

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT (P=0,05). *Konsentrasi normal vitamin + glisin : Myo-inositol 100 mg/l; Asam nikotinat 0.5 mg/l; Piridoksin-HCl 0.5 mg/l; Tiamin-HCl 0.5 mg/l and Glisin 2 mg/l

Tabel 2. Perakaran *S. rebaudiana* minggu ke-8 pada media MS dengan penambahan vitamin + glisin 1, 2 dan 4 kali kadar normal menggunakan tutup kultur Al-foil dan

Tutup	Kadar Vitamin (kelipatan kadar normal)*	Persen pembentukan akar	Rata-rata Jumlah akar
Al-foil	1	16,7	0,2 a
	2	58,3	1,7 bc
	4	33,3	0,8 b
Plastik berfilter	1	33,3	1,6 bc
	2	83,3	2,8 c
	4	75,0	5,5 d

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom jumlah akar tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT (P=0,05). *Konsentrasi normal vitamin + glisin : Myo-inositol 100 mg/l; Asam nikotinat 0,5 mg/l; Piridoksin-HCl 0,5 mg/l; Tiamin-HCl 0,5 mg/l and Glisin 2 mg/l

Tabel 3. Biomassa dan kadar klorofil *S. rebaudiana* minggu ke-8 pada media MS dengan penambahan vitamin + glisin 1, 2 dan 4 kali kadar normal menggunakan tutup kultur Al-foil dan plastik berventilasi filter

Tutup	Peningkatan Kadar Vitamin*	Bobot Basah (g)	Bobot Kering (g)	Klorofil Total
Al-foil	1	0,177 c	0,027 b	0,864 a
	2	0,120 b	0,017 b	1,001 a
	4	0,095 a	0,008 a	1,168 a
Plastik berfilter	1	0,299 d	0,058 c	1,287 a
	2	0,153 bc	0,025 b	1,479 b
	4	0,351 d	0,059 c	1,707 b

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom jumlah akar tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT (P=0,05). *Konsentrasi normal vitamin + glisin : Myo-inositol 100 mg/l; Asam nikotinat 0,5 mg/l; Piridoksin-HCl 0,5 mg/l; Tiamin-HCl 0,5 mg/l and Glisin 2 mg/l

Tabel 4. Anova parameter pertumbuhan dan kadar klorofil *Stevia rebaudiana* umur 8 minggu pada media MS yang mengandung vitamin+glisin 1, 2 dan 4 kali kadar normal menggunakan tutup kultur Al-foil dan plastik berventilasi filter.

No	Variabel	F Hitung dan Signifikansi			CV (%)
		Tutup	Vitamin	Tutup vs Vitamin	
1.	Tinggi tunas	6.99 (*)	1.24 (ts)	8.07 (**)	37.76
2.	Jumlah tunas	30.67 (**)	8.14 (**)	1.01 (ts)	46.63
3.	Jumlah buku	8.13 (**)	3.81 (*)	2.60 (ts)	37.96
4.	Jumlah daun	7.71 (**)	3.33 (*)	2.02(ts)	33.76
5.	Jumlah akar	16.26 (**)	4.75 (*)	3.81 (*)	122.87
6.	Bobot basah	7.97(*)	1.69(ts)	1.76 (ts)	59.85
7.	Bobot kering	14.45(**)	2.44(ts)	2.38(ts)	60.19
8.	Klorofil total	10.84 (**)	2.06 (ts)	0.05 (ts)	24.70

Keterangan : *: signifikan pada taraf $\alpha=5\%$, **: sangat signifikan pada taraf $\alpha=1\%$, ts: tidak signifikan

pada tabung bertutup Al-foil dengan media yang mengandung vitamin + glisin konsentrasi 4 kali konsentrasi normalnya, berbeda nyata dengan semua perlakuan lainnya (Tabel 3). Kultur tunas stevia pada media dengan konsentrasi vitamin + glisin 2 dan 4 kali konsentrasi normal yang ditumbuhkan pada tabung bertutup plastik berventilasi memiliki kandungan klorofil total tertinggi berbeda nyata dengan perlakuan lainnya.

Tabel 4 menunjukkan hasil perhitungan ANOVA bahwa jenis tutup tabung yaitu Al-foil dan Plastik transparan berventilasi filter memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap semua variabel pertumbuhan dan total klorofil stevia, sedangkan peningkatan kadar vitamin+glisin hanya berpengaruh nyata terhadap variabel jumlah tunas, buku, daun dan akar. Terhadap parameter bobot basah, bobot kering dan total klorofil tidak berbeda nyata. Interaksi antara konsentrasi vitamin + glisin dan jenis tutup tabung kultur hanya berbeda nyata terhadap variabel tinggi tunas dan jumlah akar.

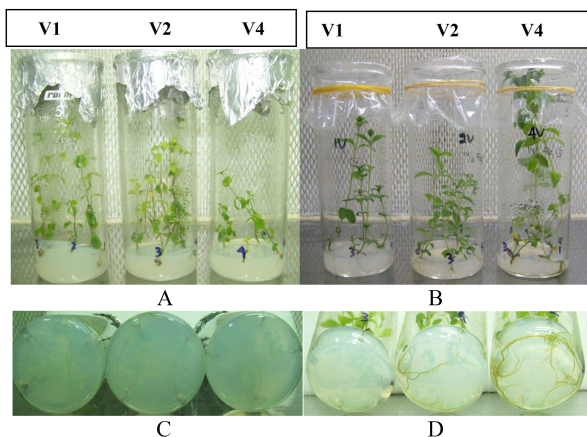
Gambar 6 menunjukkan planlet stevia umur 8 minggu yang ditanam pada media dengan peningkatan kadar vitamin + glisin dan tabung dengan tutup Al-foil dan plastik berventilasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pertumbuhan tanaman menurun pada peningkatan vitamin+glisin dengan penggunaan tutup tabung Al-foil, sedangkan pertumbuhan meningkat dengan peningkatan kadar vitamin + glisin pada tabung kultur dengan tutup plastik berventilasi filter, perakaran juga berbeda.

Pada media dengan tutup tabung Al-foil dengan peningkatan kadar vitamin + glisin, ukuran daun planlet stevia umur 9 minggu secara visual

tidak banyak berbeda, sedangkan pada tutup tabung plastik transparan berventilasi dengan peningkatan konsentrasi vitamin + glisin berbeda. Secara visual peningkatan kadar vitamin 2 kali tidak menunjukkan perbedaan, namun peningkatan kadar vitamin + glisin 4 kali konsentrasi normalnya meningkatkan ukuran daun secara signifikan (Gambar 7).

PEMBAHASAN

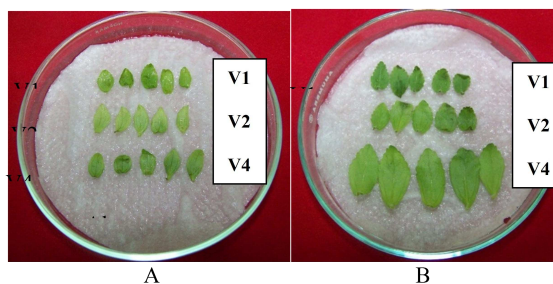
Komposisi dan konsentrasi vitamin + glisin pada media MS dengan konsentrasi normal yang dipergunakan sebagai perlakuan kontrol adalah Myo-inositol 100 mg/l; Asam nikotinat 0.5 mg/l; Piridoksin-HCl 0.5 mg/l; Tiamin-HCl 0.5 mg/l and Glisin 2 mg/l. Komposisi media MS (Murashige & Skoog 1962) dengan konsentrasi normal mengandung komponen vitamin yang tidak terpisahkan dengan glisin. Oleh karena itu pada penelitian ini perlakuan peningkatan konsentrasi vitamin juga dibarengi dengan peningkatan konsentrasi glisin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dengan penggunaan jenis tutup tabung kultur yang sesuai yang dikombinasikan dengan peningkatan kadar vitamin + glisin pada media tanpa penambahan zat pengatur tumbuh pada *Stevia rebaudiana* dapat diperoleh pertumbuhan tunas yang baik, perakaran dapat terbentuk, dan aklimatisasi dengan daya tumbuh maksimal. Peningkatan konsentrasi vitamin + glisin berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan tunas stevia (Tabel 4). Vitamin termasuk myo-inositol merupakan prekursor yang mempengaruhi biosintesis tanaman. Peningkatan kadar myo-inositol secara terpisah hingga 350 mg/l meningkatkan pertumbuhan



Gambar 6. Tampilan planlet *Stevia rebaudiana* umur 8 minggu pada media MS yang mengandung vitamin + glisin 1 (V1), 2 (V2) dan 4 (V4) kali kadar normal menggunakan tutup kultur Al-foil (A) dan plastik berventilasi filter (B), dan tampilan perakaran pada perlakuan yang sama (C dan D).

kalus tanaman *Vitis*, dengan pertumbuhan optimum pada konsentrasi myo-inositol 250 mg/l (Staundt 1984). dan beberapa genotipe kedelai (Barwale *et al.* 1986). Hal ini juga terjadi pada stevia sehingga pertumbuhan dapat meningkat, secara statistik berpengaruh nyata terhadap jumlah tunas, buku dan tunas (Tabel 4) dengan penambahan myo-inositol hingga 400 mg/l (4 kali konsentrasi normal).

Beberapa peneliti melaporkan bahwa multiplikasi tunas stevia memerlukan sitokinin dan untuk induksi perakaran diperlukan penambahan auksin pada media MS (Karim *et al.* 2008; 2011; Anbazhagan *et al.* 2010; Gupta *et al.* 2010; Das *et al.* 2011; Ghauri *et al.* 2013; Bhingradiya *et al.* 2016). Pada penelitian ini, media tanpa zat pengatur tumbuh dapat menghasilkan pertumbuhan tunas (Gambar 2-4) dan perakaran lebih baik (Gambar 5), ukuran (Gambar 7) serta biomassa tinggi (Tabel 3), serta tidak ditemukan adanya variasi somaklonal. Dengan demikian penggunaan sitokinin untuk multiplikasi tunas, dan auksin untuk induksi perakaran dapat ditiadakan. Tanpa penambahan zat pengatur tumbuh, terbentuknya kalus yang sering terjadi pada stevia akibat penggunaan sitokinin dan auksin (Ghauri *et al.* 2013) juga dapat dihindari, sehingga tidak terjadi variasi somaklonal. Pertumbuhan tunas *Coprosma brassii* meningkat pada media dengan peningkatan konsentrasi vitamin 4 dan 8 kali



Gambar 7. Daun planlet *S. rebaudiana* umur 8 minggu pada media MS yang mengandung vitamin + glisin 1 (V1), 2 (V2) dan 4 kali (V4) kadar normal menggunakan tutup kultur Al-foil (A) dan plastik berventilasi filter (B).

konsentrasi normalnya. Penambahan sitokinin (BA) pada media konsentrasi vitamin tinggi menurunkan pertumbuhan tunas (Ermayanti *et al.* 2015).

Pada stevia, dengan menggunakan tutup tabung berventilasi filter, terutama dengan peningkatan vitamin + glisin hingga 4 kali lebih tinggi dari konsentrasi normal dapat meningkatkan perakaran secara signifikan (Gambar 5), dengan demikian penambahan auksin yang biasa dilakukan untuk induksi perakaran stevia (Anbazhagan *et al.* 2010) dapat ditiadakan. Pada *Tacca leontopetaloides*, peningkatan vitamin + glisin pada media MS (tanpa penambahan auksin) menjadi 2 dan 4 kali konsentrasi normalnya juga meningkatkan perakaran (Martin *et al.* 2016). Hal ini menunjukkan bahwa satu tahap dalam produksi bibit dapat dikurangi sehingga menjadi lebih praktis, lebih singkat, bahkan lebih ekonomis. Peningkatan vitamin + glisin terlalu tinggi hingga 8 kali konsentrasi normal menurunkan perakaran *T. leontopetaloides* (Martin *et al.* 2016) dan 10 kali konsentrasi normalnya juga menurunkan perakaran jeruk (Wulandari *et al.* 2013).

Hasil penelitian Deshmukh & Ade (2012) menunjukkan bahwa penggunaan zat pengatur tumbuh pada stevia tidak mendukung ketegaran planlet sehingga memerlukan tahap *hardening* selama 7-8 hari agar planlet lebih adaptif terhadap lingkungan *ex vitro* sehingga mempunyai daya hidup tinggi selama proses aklimatisasi. Pada penelitian ini dengan meniadakan zat pengatur tumbuh, terutama pada penggunaan tutup plastik transparan berventilasi dan meningkatkan konsentrasi vitamin, vigor planlet stevia dapat meningkat yang ditunjukkan dengan



Gambar 8. Tanaman *S. rebaudiana* hasil aklimatisasi umur 2 minggu di rumah kaca

pertumbuhan tunas, perakaran (Gambar 6) dan ukuran daun yang meningkat (Gambar 7). Akibatnya tidak terjadi permasalahan selama tahap aklimatisasi (Gambar 8), sehingga tidak memerlukan tahap *hardening* sebelum proses aklimatisasi (Hazarika 2003).

Gambar 6 dan 7 menunjukkan bahwa planlet stevia yang dikulturkan pada tabung kultur dengan tutup berventilasi mempunyai pertumbuhan lebih baik, perakaran lebih banyak dan ukuran daun lebih besar dibandingkan dengan tutup Af-foil. Penggunaan tutup tabung berventilasi meningkatkan ketegaran planlet karena pertukaran oksigen dan karbondioksida dari dan ke dalam tabung lebih tinggi dibandingkan dengan tutup tabung tanpa ventilasi. Konsekuensinya bahwa fotosintesis menjadi meningkat, sehingga pertumbuhan lebih baik (Kozai 2010). Hal ini, pada stevia ditunjukkan juga dari hasil pengamatan biomassa dan kadar klorofil yang tinggi pada planlet yang dikulturkan pada tabung dengan tutup plastik berventilasi (Tabel 3). Penggunaan tutup tabung berventilasi telah berhasil diterapkan pada berbagai jenis tanaman untuk meningkatkan pertumbuhan, laju fotosintesis dan keberhasilan aklimatisasi karena planlet tumbuh pada kondisi lingkungan *in vitro* yang mendekati kondisi lingkungan ototropik (Kozai 2010). Kondisi ini sangat menguntungkan apabila diterapkan pada skala besar seperti dengan menggunakan bioreaktor (Ramirez-Mosqueda *et al.* 2016).

KESIMPULAN

Pertumbuhan kultur tunas *S. rebaudiana* dapat meningkat pada media MS tanpa penambahan zat pengatur tumbuh dengan memanipulasi konsentrasi vitamin + glisin dan jenis tutup tabung. Stevia meningkat ketegarannya yang ditunjukkan dari ukuran daun besar dan jumlah

akar meningkat pada saat ditumbuhkan pada media MS yang mengandung konsentrasi vitamin + glisin menjadi 4 kali konsentrasi normalnya dengan menggunakan tabung kultur bertutup plastik transparan berventilasi filter. Dengan meningkatnya ketegaran meningkatkan daya hidup di lingkungan *ex vitro*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Tita Siti Nurhasanah SP yang telah membantu dalam pengolahan statistik. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada PT Tapanuli Investasi Agro dan PT GoEn Enzim Internasional yang telah mengizinkan menggunakan tanaman Stevia koleksinya sebagai bahan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Abrahamian, P. & A Kantharajah. 2011. Effect of vitamin on *in vitro* organogenesis of plant. *American Journal of Plant Science*. 2:669-674.
- Ahmed, B., M. Hossain, R. Islam, A. Kumar Saha, & A. Mandal. 2011. A review on natural sweetener plant-Stevia having medicinal and commercial importance. *Agronomski Glasnik*. 1(2): 75-92.
- Anbazhagan M., M. Kalpana, R. Rajendran, V. Natarajan, & D. Dhanavel. 2010. *In vitro* production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 22(3): 216-222.
- Autade RH., SR. Fargade, PG. Borhade, SK. Udmale, & RS. Choudhary. 2014. *In vitro* Propagation of *Stevia rebaudiana* (Bert.) A natural, non caloric sweetener herb. *Journal of Cell and Tissue Culture Research*. 14(3): 4659-4664.
- Barwale, UB., HR. Kerns, & JM. Widholm. 1986. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta*. 167: 473-481.
- Bhingradiya, V., A. Mankad, R. Patel, & S. Mathur. 2016. *In vitro* shoot multiplicatuin of *Stevia rebaudiana* (BERT) through plant tissue culture. *International Journal of Advanced Research*. 4(11): 2300-2307.
- Boonkaewwan, C., C. Toskulkaeo, & MJ Vongsakul. 2006. Antinflammatory and immunomodulatory activities of stevioside and its metabolite steviol on THP-1 cells. *Journal of*

- Agriculture and Food Chemistry*. 54: 785–789.
- Das, K., R. Dang, & PE. Rajasekharan. 2006. Establishment and maintenance of callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni under aseptic environment. *Natural Product Radiance*. 5(5): 373-376.
- Deshmukh, S & R Ade. 2012. *In vitro* rapid multiplication of *Stevia rebaudiana*: An important natural sweetener herb. *Bioscience*. 4(3): 105-108.
- Ermayanti, TM., E. Al-Hafiih, A. Mandessy, G. Setyadi & A. Mukhsia. 2015. Pengaruh peningkatan vitamin dan penambahan benzil adenin terhadap pertumbuhan kultur tunas *Coprosma brassii* Merrill & Perry. Prosiding Seminar Nasional XXIII, “Kimia dalam Industri dan Lingkungan. Yogyakarta, 13 November 2014. Hal : 389–396.
- Ferrazzano, GF., T. Cantile, B. Alcidi, M. Coda, A. Ingenito, A. Zarrelli, G. Di Fabio & A. Pollio. 2016. Is *Stevia rebaudiana* Bertoni a non cariogenic sweetener? *A review. Molecules*. 21(38): 1-12.
- Ghauri, EG., MS. Afridi, GA. Marwat, I. Rahman, & M. Akram. 2013. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni through root explants. *Pakistan Journal of Botany*. 45 (4):1411-1416.
- Gupta, P., Sharma, S. & Saxena, S. 2010. Callusing in *Stevia rebaudiana* (Natural Sweetener) for Steviol Glycoside Production. *World Academy of Science, Engineering and Technology*. 4: 12-25.
- Hazarika, BN. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants (review articles). *Current Science*. 85(12) : 1704-1712.
- Hussain, RA., AD. Kinghorn, & DD. Soejarto. 1988. Sweeting agent of plant origin : Literature search for candidate sweet plants. *Economic Botany*. 42(2):267-283.
- Jayaraman, S., MS. Manoharan, & S Illanchezian. 2008. *In-vitro* Antimicrobial and antitumor activities of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaf extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 7: 1143–1149.
- Kozai, T. 2010. Photoautotrophic micropropagation-Environmental control for promoting photosynthesis. *Propagation of Ornamental Plants*. 10(4): 188-204.
- Martin, AF., BW. Hapsari, Rudiyanto, DR. Wulandari & TM. Ermayanti. 2016. Pengaruh Peningkatan Konsentrasi Vitamin terhadap Pertumbuhan *Tacca leontopetaloides* secara *In Vitro*. Prosiding Seminar Nasional XIX “Kimia dalam Pembangunan”. Yogyakarta, 26 Mei 2016. Hal. 349-354.
- Meeks, JC. 1974. Chlorophyll. In : *Algal Physiology and Biochemistry*. Botanical Monographs. Vol. 10. (Ed. Stewart, WDP). University of California Press. Pp. 161-175.
- Nower, AA. 2014. *In vitro* propagation and synthetic seeds production: an efficient method for *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Sugar Technology*. 16: 100–108.
- Ramirez-Mosqueda, MA., LG.Iglesias-Andreu, G. Ramirez-Madero, & EU. Hernandez-Rincon. 2016. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bert. In temporary immersion system and evaluation of genetic fidelity. *South African Journal of Botany*. 106:238-243.
- Takahashi, K., M. Matsuda, K. Ohashi, K. Taniguchi, O. Nakagomi, Y. Abe, S Mori, NK. Okutani, & S. Shigeta. 2001. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. *Antiviral Research*. 49:15–24.
- Wulandari, DR., & TM. Ermayanti. 2013. Pengaruh konsentrasi BAP pada media MS yang mengandung vitamin tinggi terhadap pertumbuhan kultur tunas pucuk jeruk. Prosiding Seminar Nasional XVI “Kimia dalam Pembangunan. Yogyakarta, 20 Juni 2013. 751–758.