

Peningkatan laju multiplikasi tunas dan keragaan planlet *Stevia rebaudiana* pada kultur *in vitro*

Increasing shoot multiplication rate and plantlet vigor of Stevia rebaudiana in vitro culture

SUMARYONO & Masna Maya SINTA

Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Jl. Taman Kencana No. 1, Bogor 16151, Indonesia

Diterima tanggal 4 Oktober/Disetujui tanggal 25 Nopember 2011

Abstract

Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) is a natural zero-calorie sweetener plant grown in a high population density. Tissue culture technique is useful for rapid mass propagation of plants to provide superior planting materials. Experiments were conducted to increase growth and multiplication of shoots and vigor of plantlets of *stevia*. Explants used were apical and axillary buds from plantlets grown on MS medium without plant growth regulators. Combinations of BA and IAA at different concentrations were used for shoot growth and multiplication, whereas plant growth retardants (ancymidol and paclobutrazol) and light intensity were used for plantlet vigor. The results showed that *stevia* explants cultured on MS medium without plant growth regulators produced the highest shoots (4.5 cm) with two shoots per explant. The best multiplication rate of shoots were found on MS medium added with 1.13 mg/L BA combined with 0.35 mg/L IAA which produced on average 4.5 shoots and 11.9 nodes per initial explant. Ancymidol and paclobutrazol concentrations affected significantly growth and vigor of *stevia* plantlets. Increasing the concentration of ancymidol and paclobutrazol decreased plantlet height and biomass fresh weight, but increased stem diameter. Paclobutrazol at 0.1 mg/L was the best treatment to increase the vigor of *stevia* plantlets. Light intensity at 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ gave better plantlet vigor than other light intensities. It can be concluded that multiplication of *stevia* shoots should be grown on MS medium supplemented with 1.13 mg/L BA + 0.35 mg/L IAA and the vigor of the shoots can be increased by culturing on MS medium containing 0.1 mg/L paclobutrazol under fluorescence lamps with 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ light intensity.

[Key words: *Stevia*, natural sweetener, *in vitro* culture, micropropagation, BA, IAA, plantlet vigor]

Abstrak

Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) adalah tanaman pemanis alami nir-kalori yang ditanam dengan kerapatan populasi yang sangat tinggi. Teknik kultur jaringan dapat digunakan untuk memperbanyak tanaman secara massal dan cepat untuk menyediakan bahan tanam unggul. Penelitian telah dilakukan untuk meningkatkan pertumbuhan dan multiplikasi tunas dan keragaan planlet *stevia*. Eksplan yang digunakan adalah tunas pucuk dan tunas samping dari planlet yang ditumbuhkan pada medium MS tanpa zat pengatur tumbuh. Kombinasi BA dan IAA dengan konsentrasi yang berbeda digunakan untuk pertumbuhan dan multiplikasi tunas, sedangkan zat penghambat tumbuh (ansimidol dan

paklobutrazol) serta intensitas cahaya digunakan untuk keragaan planlet. Hasil penelitian menunjukkan bahwa eksplan *stevia* yang ditumbuhkan pada medium MS tanpa zat pengatur tumbuh menghasilkan tunas paling tinggi (4,5 cm) dengan dua tunas per eksplan. Multiplikasi tunas terbaik diperoleh pada medium dengan BA 1,13 mg/L yang dikombinasikan dengan IAA 0,35 mg/L yang menghasilkan 4,5 tunas dan 11,9 ruas per eksplan awal. Konsentrasi ansimidol dan paklobutrazol berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan dan keragaan planlet *stevia*. Meningkatnya konsentrasi ansimidol dan paklobutrazol menurunkan tinggi planlet dan bobot basah biomassa, tetapi meningkatkan diameter batang. Paklobutrazol pada konsentrasi 0,1 mg/L merupakan perlakuan terbaik untuk meningkatkan keragaan planlet *stevia*. Intensitas cahaya pada 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{detik}$ memberikan keragaan planlet yang lebih baik dibandingkan intensitas cahaya yang lain. Dapat disimpulkan bahwa multiplikasi tunas *stevia* sebaiknya dilakukan pada medium MS ditambah BA 1,13 mg/L + IAA 0,35 mg/L dan keragaan planlet dapat ditingkatkan dengan menanam planlet pada medium MS ditambah paklobutrazol 0,1 mg/L di bawah lampu fluoresen dengan intensitas cahaya 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{detik}$.

[Kata kunci: *Stevia*, pemanis alami, kultur *in vitro*, mikropropagasi, BA, IAA, keragaan planlet]

Pendahuluan

Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) merupakan tanaman perdu famili Compositae yang berasal dari Paraguay. Daun *stevia* menghasilkan rasa manis yang disebabkan oleh adanya glikosida dengan tingkat kemanisan 200 – 300 kali lebih tinggi dibandingkan gula tebu atau sukrosa (Geuns, 2003; Megeji *et al.*, 2005; Mogra & Dashora, 2009). Glikosida dalam daun *stevia* terdiri dari steviosida, beberapa rebaudiosida termasuk rebaudiosida A (reb-A), dulkosida, dan beberapa senyawa lainnya (Kennelly, 2002; Geuns, 2003). Glikosida tidak mengandung kalori dan mempunyai indeks glikemat hampir nol sehingga sesuai untuk penderita diabetes dan seseorang yang sedang melakukan diet makanan untuk menurunkan berat badan (Jeppesen *et al.*, 2002; Gregersen *et al.*, 2004). *Stevia* digunakan pada minuman ringan rendah-kalori, bahan makanan, pasta gigi, bahan kosmetika, antioksidan, antihipertensi, zat pengatur tumbuh, dan berbagai produk lain (Midmore & Rank, 2002).

Populasi tanaman dalam budidaya stevia sangat tinggi 60 ribu sampai 100 ribu tanaman per ha dan diremajakan setiap dua atau tiga tahun. Oleh karena itu, diperlukan bahan tanam dalam jumlah banyak dan berkesinambungan. Perbanyak stevia dengan biji kurang efektif karena rendahnya persentase perkecambahan biji (Goettemoeller & Ching, 1999) dan terjadinya inkompatibilitas-sendiri yang menyebabkan turunannya sangat beragam. Perbanyak stevia paling umum adalah dengan stek batang yang menghasilkan benih yang seragam tetapi jumlahnya terbatas. Teknik kultur jaringan diperlukan untuk menghasilkan bibit unggul stevia klonal secara massal dan cepat, terutama pada tahap awal pembibitan.

Kultur jaringan stevia dilakukan melalui multiplikasi tunas, organogenesis dan embriogenesis somatik. Prosedur multiplikasi tunas lebih sederhana dan kemungkinan terjadinya keragaman somaklonal lebih rendah dibandingkan dengan organogenesis dan embriogenesis somatik karena digunakan eksplan yang telah terdiferensiasi. Media MS (Murashige & Skoog, 1962) pada umumnya digunakan sebagai medium baku untuk kultur *in vitro* stevia. Sebagai bahan eksplan bagi multiplikasi tunas adalah tunas pucuk dan tunas samping.

Untuk meningkatkan laju multiplikasi tunas stevia, pada umumnya digunakan sitokinin atau kombinasi sitokinin dan auksin. Sivaram & Mukundan (2003) menggunakan ujung tunas sebagai sumber eksplan dan mendapatkan 11,2 tunas per eksplan pada perlakuan BA 2 mg/L + IAA 1 mg/L, sedangkan Anbazhagan *et al.* (2010) mendapatkan rata-rata 16 tunas tiap eksplan pada medium MS dengan BA 1 mg/L + IAA 0,5 mg/L. Rafiq *et al.* (2007) melaporkan bahwa BA 2 mg/L dapat menginduksi tunas 78% dari eksplan dengan rata-rata 8 tunas per eksplan. Mencelupkan sebentar tunas stevia dalam larutan BA 250 atau 500 mg/L sebelum dikultur pada medium MS meningkatkan multiplikasi tunas 2 – 5 kali (Manjusha & Sathyanarayana, 2010). Peningkatan konsentrasi BA dan kinetin dilaporkan meningkatkan laju multiplikasi tunas stevia, namun planlet yang diperoleh kecil-kecil dan tidak vigor (Ibrahim *et al.*, 2008).

Peningkatan keragaan planlet dapat dilakukan dengan merubah komposisi medium dan faktor lingkungan *in vitro*. Penambahan senyawa penghambat aktivitas giberelin seperti ansimidol dan paklobutrazol pada medium dapat menghambat perpanjangan batang dan menghasilkan planlet yang dapat beradaptasi lebih baik di lingkungan luar (Ziv, 1995). Sebagai contoh penggunaan ansimidol 3 mg/L meningkatkan daya hidup planlet stevia saat aklimatisasi (Manjusha & Sathyanarayana, 2010). Salah satu faktor lingkungan *in vitro* yang berperan dalam pertumbuhan dan keragaan planlet adalah intensitas cahaya (Chen, 2004; Huang &

Chen, 2005). Keragaan planlet yang baik berkorelasi positif dengan daya hidup dan pertumbuhannya pada tahap aklimatisasi di lingkungan *ex vitro* (Hazarika, 2003).

Tujuan penelitian ini adalah menetapkan pengaruh BA dan IAA terhadap pertumbuhan dan multiplikasi tunas stevia serta pengaruh paklobutrazol, ansimidol dan intensitas cahaya terhadap keragaan planlet stevia.

Bahan dan Metode

Sumber dan sterilisasi eksplan

Eksplan awal yang digunakan adalah tunas pucuk dan tunas samping dari batang perdu tanaman stevia varietas lokal yang ditanam di Kebun Percobaan Ciomas, Bogor. Batang eksplan dibersihkan dalam air mengalir, kemudian dicuci menggunakan disinfektan Desogerme 0,5% dan dibilas dengan akuades steril. Batang kemudian direndam dalam larutan antioksidan (asam sitrat 150 mg/L dan asam askorbat 100 mg/L) selama dua jam (Ibrahim *et al.*, 2008). Selanjutnya batang disterilisasi dengan fungisida Benlate 0,2% selama 15 menit dan Na hipoklorit Clorox 12,5% selama 15 menit. Setiap tahap sterilisasi dilakukan pembilasan dengan akuades steril beberapa kali.

Batang dengan satu ruas dipotong dengan ukuran 1-2 cm kemudian ditumbuhkan dalam medium MS dengan 30 g/L sukrosa, 3 g/L gelrite, tanpa zat pengatur tumbuh. Tingkat pH medium diatur 5,7 sebelum disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 kg/cm² selama 20 menit. Kultur diletakkan pada ruang kultur terang. Planlet yang tumbuh *in vitro* disubkultur tiga kali sebelum digunakan sebagai sumber eksplan untuk penelitian selanjutnya.

Multiplikasi tunas

Tunas samping satu ruas panjang 1 – 1,5 cm dari planlet *in vitro* digunakan untuk penelitian multiplikasi tunas. Potongan tunas ditumbuhkan pada medium MS dengan 30 g/L sukrosa dan 3 g/L gelrite. Sebanyak lima tunas ditanam dalam satu botol kultur (diameter 6 cm, tinggi 9 cm) berisi 40 mL medium. Zat pengatur tumbuh yang digunakan adalah kombinasi BA (0; 0,45; 1,13; 2,25 mg/L) dan IAA (0; 0,18; 0,35 mg/L). Setiap perlakuan terdiri dari empat botol kultur berisi masing-masing lima eksplan. Pengamatan dilakukan empat minggu setelah kultur meliputi tinggi tunas, serta jumlah tunas dan total ruas per eksplan.

Keragaan planlet stevia in vitro

Bahan yang digunakan dalam penelitian untuk mendapatkan planlet yang vigor ini berupa tunas pucuk satu ruas dari planlet *in vitro*. Eksplan ditanam dalam tabung kultur (diameter 2,5 cm, tinggi 15 cm) berisi

medium MS dengan penambahan paklobutrazol atau ansimidol 0; 0,1; 1 dan 10 mg/L. Masing-masing perlakuan terdiri dari 20 ulangan (tabung kultur). Pengamatan dilakukan empat minggu setelah kultur meliputi bobot segar biomassa planlet, tinggi planlet, jumlah ruas, jumlah daun, diameter batang, dan daya hidup planlet.

Penelitian untuk meningkatkan keragaan planlet stevia dilakukan juga dengan perlakuan intensitas cahaya yang berbeda. Eksplan yang digunakan adalah tunas pucuk satu ruas setinggi 1 – 1,5 cm dari planlet yang telah ditumbuhkan pada medium MS. Sebanyak lima tunas ditanam dalam satu botol kultur (diameter 6 cm, tinggi 9 cm) berisi 40 mL medium MS dengan 30 g/L sukrosa, 3 g/L gelrite dan paklobutrazol 0,1 mg/L. Jenis penutup botol yang digunakan adalah tutup ulir berbahan prolipropilen dan dibalut plastik *wrap*. Sebanyak enam botol kultur digunakan setiap perlakuan. Botol kultur diletakkan di bawah lampu fluoresen putih dengan intensitas cahaya 10; 20; 30 dan 40 $\mu\text{mol foton/m}^2/\text{detik}$, dengan fotoperiode 12 jam per hari. Pengukuran intensitas cahaya dilakukan menggunakan *lightmeter* (Licor-250) dengan sensor kuantummeter. Parameter yang diamati pada empat minggu setelah kultur adalah bobot segar biomassa planlet, tinggi planlet, jumlah daun, ukuran daun (panjang x lebar), kelas warna daun (diukur dengan bagan warna daun dari *International Rice Research Institute*) dan diameter batang. Intensitas cahaya serta suhu di luar dan di dalam botol kultur akibat perlakuan intensitas cahaya juga diamati. Suhu di dalam botol diukur dengan menempatkan ujung sensor dari termometer digital Fluke 51 K/J dalam botol kultur yang berisi planlet.

Kondisi kultur

Kultur diinkubasikan dalam ruang kultur terang pada suhu $26 \pm 1^\circ\text{C}$ dan diletakkan di bawah lampu TL fluoresen putih 40 W dengan intensitas cahaya 20 $\mu\text{mol foton/m}^2/\text{detik}$ dan fotoperiode 12 jam per hari, kecuali pada penelitian intensitas cahaya disesuaikan dengan perlakuan.

Rancangan percobaan

Penelitian diatur menggunakan rancangan acak lengkap. Data yang diperoleh diolah dengan analisis keragaman (*analysis of variance* = Anova) menggunakan program SPSS versi 17. Apabila terdapat perbedaan faktor perlakuan yang nyata, maka perbedaan antar-perlakuan diuji dengan uji jarak berganda Duncan dengan tingkat kepercayaan $\alpha \leq 0,05$.

Hasil dan Pembahasan

Pengaruh BA dan IAA terhadap multiplikasi tunas stevia

Perlakuan BA dan IAA berpengaruh sangat nyata secara statistik terhadap pertumbuhan dan multiplikasi tunas stevia, empat minggu setelah kultur (Tabel 1; Gambar 1). Penambahan BA menurunkan tinggi rata-rata tunas; pada perlakuan tanpa BA dengan IAA 0; 0,18 dan 0,35 mg/L tinggi rata-rata tunas mencapai 38 mm, sedangkan pada perlakuan BA tinggi tunas hanya antara 3 – 6 mm, bahkan pada BA 2,25 mg/L pertumbuhan planlet sangat terhambat (Gambar 1D). Tanpa BA setiap eksplan menghasilkan rata-rata dua tunas, sedangkan dengan penambahan BA 0,45 dan 1,13 mg/L pembentukan tunas meningkat menjadi 3,5 – 3,6 tunas per eksplan. Jumlah tunas tertinggi diperoleh pada perlakuan BA 1,13 mg/L + IAA 0,35 mg/L yakni sebesar 4,5 tunas per eksplan. Pada perlakuan kontrol, walaupun hanya diperoleh dua tunas per eksplan tetapi setiap tunas mempunyai banyak ruas karena tunasnya tinggi (47,6 mm) sehingga jumlah ruas yang mampu disubkultur adalah 6,8 ruas per eksplan. Jumlah ruas yang dapat disubkultur ini mencerminkan laju multiplikasi planlet. Walaupun tinggi tunas rata-rata pada perlakuan BA 1,13 mg/L + IAA 0,35 mg/L hanya 20,3 mm tetapi karena jumlah tunas per eksplan sebanyak 4,5 maka total ruas yang dapat disubkultur mencapai 11,9 ruas per eksplan. Jadi, pada perlakuan BA 1,13 mg/L + IAA 0,35 mg/L dari satu ruas awal setelah 4 minggu diperoleh sebanyak rata-rata 11,9 ruas yang dapat disubkultur (Tabel 1; Gambar 2A).

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa penambahan BA meningkatkan laju multiplikasi tunas stevia, namun diperlukan juga penambahan IAA untuk memperoleh tingkat multiplikasi tertinggi. Nampaknya perlu adanya perimbangan antara sitokinin (BA) dan auksin (IAA) untuk meningkatkan laju multiplikasi tunas stevia, seperti yang dilaporkan juga oleh Sivaram & Mukundan (2003) yang mendapatkan rata-rata 11,2 tunas tiap eksplan dengan BA 2 mg/L dan IAA 1 mg/L serta oleh Anbazhagan *et al.* (2010) yang mendapatkan rata-rata 16 tunas tiap eksplan pada medium MS dengan BA 1 mg/L dan IAA 0,5 mg/L. Kedua hasil penelitian tersebut menunjukkan laju multiplikasi tunas setara atau lebih tinggi dari hasil yang diperoleh pada penelitian ini, namun planlet yang dihasilkan kecil, pendek dan tidak vigor sehingga tidak mampu tumbuh dengan baik ketika disubkultur.

BA banyak digunakan untuk meningkatkan jumlah tunas stevia (Rafiq *et al.*, 2007; Ibrahim *et al.*, 2008; Sairkar *et al.*, 2009). BA lebih baik dibandingkan jenis sitokinin lain yaitu kinetin dalam pembentukan

tunas stevia (Anbazhagan *et al.*, 2010). Namun, pembentukan tunas yang banyak tidak diimbangi dengan keragaan tunas yang baik yakni tunas menjadi kecil, pendek dan tidak vigor sehingga tidak mampu hidup ketika ditransfer ke medium baru (Ibrahim *et al.*, 2008; Sairkar *et al.*, 2009). Pada penelitian ini

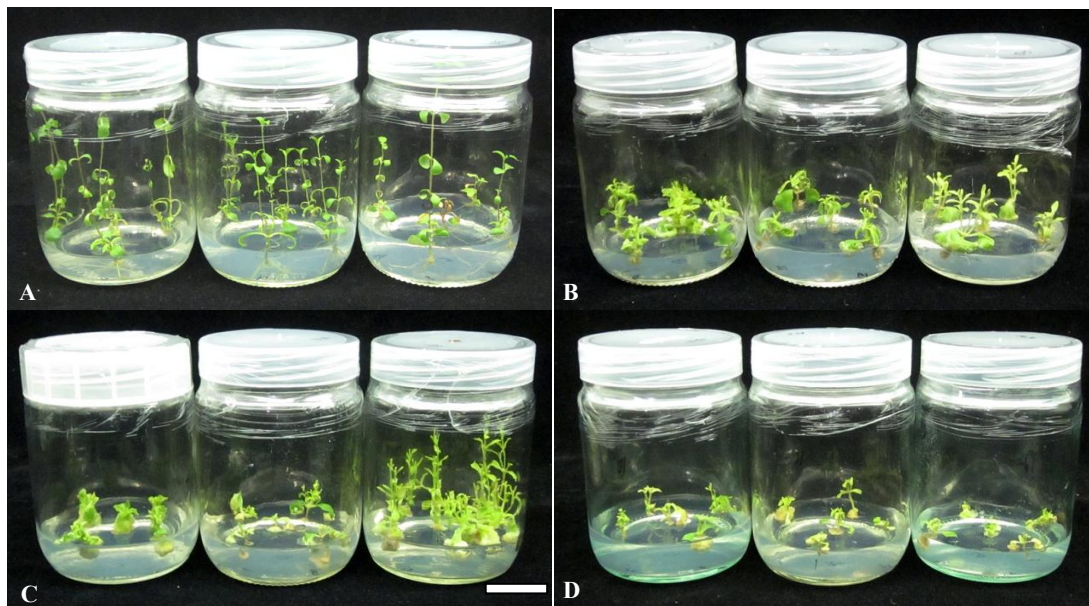
pembentukan tunas yang banyak pada perlakuan BA 1,13 mg/L + IAA 0,35 mg/L terlihat daunnya relatif kecil (Gambar 1A dan 1B) tetapi menjadi berukuran lebih besar dan normal setelah disubkultur pada medium MS dengan paklobutrazol 0,1 mg/L (Gambar 2B).

Tabel 1. Pengaruh BA dan IAA terhadap pertumbuhan dan multiplikasi tunas stevia, setelah kultur selama empat minggu.
Table 1. Effect of BA and IAA on the growth and multiplication of stevia shoots, after four weeks of culture.

Perlakuan Treatment		Tinggi tunas Shoot height (mm)	Jumlah tunas Shoot number	Jumlah ruas yang dapat dikultur Culturable node number
BA (mg/L)	IAA (mg/L)			
0	0	47,6 a*)	2,0 c	6,8 b
	0,18	33,6 b	2,0 c	6,7 b
	0,35	34,4 b	2,0 c	6,4 b
0,45	0	6,8 d	3,6 ab	3,6 c
	0,18	6,5 d	2,4 bc	3,1 c
	0,35	4,7 d	2,0 c	2,6 c
1,13	0	4,4 d	3,4 ab	3,5 c
	0,18	3,0 d	1,9 c	1,9 c
	0,35	20,3 c	4,5 a	11,9 a
2,25	0	3,8 d	2,5 bc	2,6 c
	0,18	2,9 d	2,3 bc	2,3 c
	0,35	2,8 d	2,1 c	2,1 c

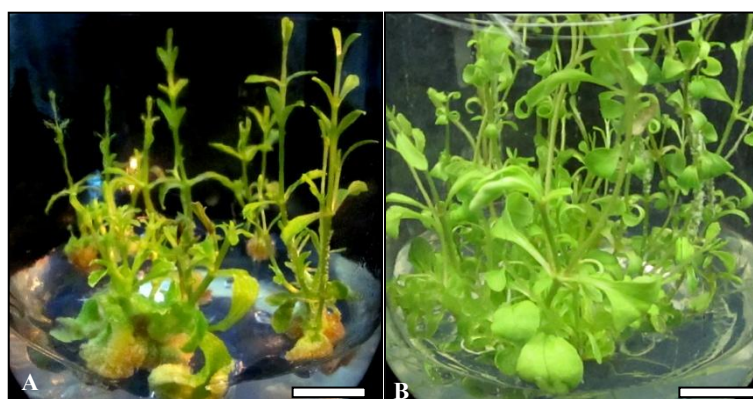
*) Angka dalam kolom yang sama diikuti oleh huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada $\alpha \leq 0,05$.

*) Means in the same column followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $\alpha \leq 0.05$.



Gambar 1. Pengaruh BA dan IAA terhadap pertumbuhan dan multiplikasi tunas stevia pada empat minggu setelah kultur. BA 0 mg/L, (B) BA 0,45 mg/L, (C) BA 1,13 mg/L, (D) BA 2,25 mg/L. Pada setiap gambar, dari kiri ke kanan berturut-turut adalah IAA 0; 0,18 dan 0,35 mg/L. Bar = 2 cm.

Figure 1. Effect of BA and IAA on the growth and multiplication of stevia shoots after four weeks of culture. 0 mg/L BA, (B) 0.45 mg/L BA, (C) 1.13 mg/L BA, (D) 2.25 mg/L BA. On each figure, from left to right are 0; 0.18 and 0.35 mg/L IAA, respectively. Bar = 2 cm.



Gambar 2. Pertumbuhan dan multiplikasi tunas stevia terbaik pada medium MS dengan BA 1,13 mg/L dan IAA 0,35 mg/L pada empat minggu setelah kultur (A) dan setelah disubkultur pada MS dengan paklobutrazol 0,1 mg/L (B). Bar = 1 cm.

Figure 2. The best growth and multiplication of stevia shoots on MS medium with 1.13 mg/L BA and 0.35 mg/L IAA after 4 weeks of culture (A) and after had been subcultured on MS medium with 0.1 mg/L paclobutrazol (B). Bar = 1 cm.

Pengaruh paklobutrazol dan ansimidol terhadap keragaan planlet stevia

Semakin tinggi konsentrasi zat penghambat tumbuh paklobutrazol dan ansimidol menurunkan secara nyata tinggi planlet, jumlah ruas, jumlah daun planlet stevia dan persentase planlet hidup, empat minggu setelah kultur (Tabel 2). Paklobutrazol dan ansimidol 10 mg/L meningkatkan diameter batang, namun planlet stevia sangat pendek dengan jumlah ruas dan daun sangat sedikit. Paklobutrazol 10 mg/L serta ansimidol 1 dan 10 mg/L menurunkan secara nyata daya hidup planlet stevia *in vitro*. Dari semua perlakuan yang diuji, paklobutrazol 0,1 mg/L memberikan pengaruh yang paling baik dalam pertumbuhan bagian atas dan keragaan planlet stevia, walaupun secara statistik tidak berbeda nyata dengan perlakuan tanpa zat penghambat tumbuh (Tabel 2). Pertumbuhan terbaik planlet stevia diperoleh pada medium MS ditambah paklobutrazol 0,1 mg/L yakni planlet paling tinggi, jumlah ruas dan daun terbanyak, diameter batang relatif besar dan persentase planlet hidup 100% (Tabel 2).

Keragaan planlet stevia yang baik ditunjukkan dengan batang yang besar dan tinggi, daun banyak, besar, tebal dan berwarna hijau tua, serta secara morfologi normal. Setelah tahap awal untuk multiplikasi ruas, planlet yang diperoleh selanjutnya disubkultur pada medium untuk meningkatkan keragaan (vigor) planlet. Penambahan paklobutrazol 0,1 mg/L terbukti mampu meningkatkan vigor planlet stevia. Penambahan paklobutrazol juga dilaporkan berpengaruh positif terhadap pertumbuhan dan keragaan planlet seperti meningkatkan pertumbuhan

planlet daylily (Chen *et al.*, 2005) serta meningkatkan ukuran daun dan memperbaiki ketegaran planlet belimbing (Supriati *et al.*, 2006).

Paklobutrazol dan ansimidol termasuk zat penghambat tumbuh yang bertindak sebagai penghambat enzim monooksigenase yang mengkatalisis tahap oksidasi dari *ent*-kaurene ke *ent*-asam kaurenoat dalam biosintesis giberelin (Rademacher, 2000). Zat penghambat tumbuh telah digunakan secara luas untuk membuat tanaman menjadi kompak dan kokoh terutama pada tanaman hias. Zat penghambat tumbuh yang berperan sebagai penghambat kerja giberelin, termasuk ansimidol dan paklobutrazol bermanfaat dalam mikropropagasi tanaman dengan menghambat perpanjangan batang dan menghasilkan planlet yang lebih kokoh sehingga meningkatkan daya hidupnya saat diaklimatisasi pada kondisi luar (Ziv, 1995).

Pengaruh intensitas cahaya terhadap kondisi lingkungan mikro

Perbedaan intensitas cahaya berpengaruh nyata terhadap intensitas cahaya yang diterima oleh planlet stevia di dalam botol kultur dan terhadap suhu di luar dan di dalam botol kultur. Intensitas cahaya di dalam botol lebih rendah dibandingkan di luar botol kultur (Tabel 3), hal ini karena penutup botol kultur dan kaca bening botol menghalangi masuknya cahaya ke dalam botol. Semakin tinggi intensitas cahaya, perbedaan intensitas cahaya di luar dan di dalam botol semakin tinggi. Pada intensitas cahaya 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{detik}$, perbedaan sebesar 1,6 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{detik}$, sedangkan pada intensitas cahaya 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{detik}$ sebesar 6,8 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{detik}$ (Tabel 3). Penutup botol dan kaca

Tabel 2. Pengaruh paklobutrazol dan ansimidol terhadap pertumbuhan, keragaan dan daya hidup planlet stevia, setelah kultur selama empat minggu.

Table 2. Effect of paclobutrazol and ancymidol on the growth, vigor and survival rate of stevia plantlets, after four weeks of culture.

Perlakuan Treatment	Bobot segar planlet Plantlet fresh weight (g)	Tinggi planlet Plantlet height (mm)	Jumlah ruas Node number	Jumlah daun Leaf number	Diameter batang Stem diameter (mm)	Daya hidup Survival rate (%)
Kontrol (Control)	0,07 a*)	55,9 ab	5,2 a	11,3 ab	0,72 bc	95 a
Paklobutrazol Paclobutrazol	0,1 mg/L 0,08 a	63,3 a	5,6 a	11,7 a	0,80 b	100 a
	1 mg/L 0,09 a	34,2 cde	4,8 a	10,7 ab	0,68 bc	90 a
	10 mg/L 0,06 a	18,9 e	2,5 b	6,2 c	1,01 a	65 b
Ansimidol Ancymidol	0,1 mg/L 0,06 a	46,7 abc	4,7 a	10,2 ab	0,58 c	100 a
	1 mg/L 0,10 a	40,8 bcd	4,6 a	9,2 b	0,74 bc	60 b
	10 mg/L 0,07 a	24,5 de	2,2 b	6,0 c	1,01 a	50 b

*) Angka dalam kolom yang sama diikuti oleh huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada $\alpha \leq 0,05$.

*) Means in the same column followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $\alpha \leq 0.05$.

Tabel 3. Kondisi lingkungan mikro pada intensitas cahaya yang berbeda.

Table 3. Microenvironmental conditions at different light intensities.

Intensitas cahaya Light intensity ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	Intensitas cahaya di luar botol kultur Light intensity outside the culture vessel ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	Intensitas cahaya di dalam botol kultur Light intensity inside the culture vessel ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	Perbedaan intensitas cahaya Light intensity difference ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	Suhu di luar botol kultur Temperature outside the vessel ($^{\circ}\text{C}$)	Suhu di dalam botol kultur Temperature inside the vessel ($^{\circ}\text{C}$)	Perbedaan suhu Temperature difference ($^{\circ}\text{C}$)
10	10,6	9,1	1,58 c*)	26,8 c	28,0 d	1,24 b
20	21,0	19,1	1,84 c	27,9 b	30,1 c	2,12 a
30	31,8	27,9	3,92 b	28,1 b	30,6 b	2,48 a
40	41,8	35,0	6,80 a	28,8 a	31,1 a	2,30 a

*) Angka dalam kolom yang sama diikuti oleh huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada $\alpha \leq 0,05$.

*) Means in the same column followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $\alpha \leq 0.05$.

botol kultur mengurangi intensitas cahaya yang dilewatkan ke dalam botol kultur (Chen, 2004).

Adanya cahaya yang berasal dari lampu fluoresen sejuk berwarna putih meningkatkan suhu di dalam ruang kultur. Semakin tinggi intensitas cahaya yang digunakan, suhu di luar botol kultur semakin tinggi, 26,7 $^{\circ}\text{C}$ pada intensitas 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{detik}$ dan 28,8 $^{\circ}\text{C}$ pada intensitas cahaya 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{detik}$ (Tabel 3). Suhu di dalam botol kultur selalu lebih tinggi dari suhu di luar botol selama periode penyinaran, dengan perbedaan suhu tergantung pada intensitas cahaya. Semakin tinggi intensitas cahaya, suhu di dalam botol kultur akan semakin tinggi bahkan mencapai 31,1 $^{\circ}\text{C}$ pada intensitas cahaya 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{detik}$ (Tabel 3). Peningkatan suhu di dalam botol kultur merupakan

efek rumah kaca dari adanya cahaya dari lampu (Chen, 2003). Penutup botol kultur pada penelitian ini yakni tutup ulir berbalut plastik *wrap* dilaporkan mampu menahan panas paling baik (Sinta *et al.*, 2011) karena terbatasnya sirkulasi udara dari dan ke dalam botol kultur.

Pengaruh intensitas cahaya terhadap keragaan planlet *stevia*

Perlakuan perbedaan intensitas cahaya tidak berpengaruh secara nyata terhadap bobot segar planlet, diameter batang, dan jumlah daun planlet *stevia* (Tabel4). Tinggi planlet *stevia* dipengaruhi secara nyata oleh intensitas cahaya, dengan tinggi rata-rata

Tabel 4. Pengaruh intensitas cahaya terhadap pertumbuhan dan keragaan planlet stevia, setelah kultur selama empat minggu.

Table 4. Effect of light intensity on the growth and vigor of stevia plantlets, after four weeks of culture.

Intensitas cahaya <i>Light intensity</i> ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	Bobot segar planlet <i>Plantlet fresh weight</i> (g)	Tinggi planlet <i>Plantlet height</i> (mm)	Diameter batang <i>Stem diameter</i> (mm)	Jumlah daun <i>Leaf number</i>	Kelas warna daun <i>Leaf color class</i>	Ukuran daun <i>Leaf size</i> (mm^2)
10	0,080 a*)	53,0 ab	0,58 a	13,1 a	2,7 a	37,5 b
20	0,133 a	70,9 a	0,57 a	15,1 a	1,9 b	80,9 a
30	0,119 a	57,3 ab	0,68 a	16,5 a	2,0 b	59,2 b
40	0,117 a	48,1 b	0,57 a	14,2 a	1,9 b	55,0 b

*) Angka dalam kolom yang sama diikuti oleh huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada $\alpha \leq 0,05$.

*) Means in the same column followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $\alpha \leq 0.05$.

planlet paling tinggi (7,09 mm) diperoleh pada botol kultur yang diletakkan di bawah lampu dengan intensitas 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{detik}$. Perlakuan intensitas cahaya yang paling rendah yakni 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{detik}$ menyebabkan daun stevia lebih hijau (kelas warna daun 2,7; semakin tinggi nilai bagan warna daun semakin hijau warna daunnya). Intensitas cahaya berpengaruh terhadap ukuran daun yang diperoleh dari hasil perkalian antara panjang dan lebar daun terbesar. Ukuran daun stevia terbesar diperoleh pada perlakuan intensitas cahaya 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{detik}$ (Tabel 4). Dari beberapa parameter pertumbuhan yang diamati terlihat bahwa perlakuan terbaik untuk meningkatkan keragaan planlet stevia adalah intensitas cahaya 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{detik}$. Hasil serupa juga dilaporkan pada planlet *Alocasia amazonica* yang tumbuh dan berkembang lebih baik pada intensitas cahaya rendah yakni 15 dan 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{detik}$ dibandingkan dengan intensitas cahaya yang lebih tinggi (Jo *et al.*, 2008).

Walaupun suhu ruang kultur diatur pada 26 ± 1 °C secara konstan namun suhu di dalam botol kultur dapat mencapai 31,1 °C (Tabel 3). Lingkungan tumbuh tanaman stevia yang optimal di lapang adalah antara 20 – 30 °C sehingga suhu yang digunakan dalam penelitian ini diperkirakan terlalu tinggi untuk pertumbuhan planlet stevia. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menetapkan kombinasi intensitas cahaya dengan suhu ruang kultur yang lebih rendah untuk mendapatkan lingkungan tumbuh *in vitro* yang terbaik bagi pertumbuhan dan keragaan planlet stevia.

Kesimpulan

1. Laju multiplikasi tunas stevia tertinggi yakni rata-rata sebanyak 4,5 tunas dan 11,9 ruas yang dapat disubkultur per eksplan awal dalam waktu empat

minggu diperoleh pada medium MS dengan penambahan BA 1,13 mg/L dan IAA 0,35 mg/L.

2. Keragaan planlet stevia lebih baik pada medium MS dengan penambahan paklobutrazol 0,1 mg/L dibandingkan dengan penambahan paklobutrazol dan ansimidol konsentrasi lainnya.
3. Keragaan planlet stevia terbaik diperoleh pada intensitas cahaya 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{detik}$ dibandingkan intensitas cahaya lainnya

Daftar Pustaka

- Anbazhagan M, M Kalpana, R Rajandran, V Natarajan & D Danavel (2010). *In vitro* production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Emir J Food Agric* 22(3), 216-222.
- Chen C (2003). Development of a heat transfer model for plant tissue culture vessels. *Biosystems Engin* 85(1), 67-77.
- Chen C (2004). Fluorescent lighting distribution for plant micropropagation. *Biosystems Engin* 90(3), 295-306.
- Chen J, DE Hall & V De Luca (2005). Effects of the growth retardant paclobutrazol on large-scale micropropagation of daylily (*Heimerocallis spp*). *In Vitro Cel Dev Biol* 41, 58-62.
- Geuns JMC (2003). Molecules of interest - stevioside. *Phytochem* 64, 913-921.
- Goettemoeller J & A Ching (1999). Seed germination in *Stevia rebaudiana*. In: J Janick (ed.) *Perspective on New Crops and New Uses*. ASHS Press, Alexandria, VA, p. 510-511.
- Gregersen S, PB Jeppesen, JJ Holst & K Hermansen (2004). Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism* 53(1), 73-76.
- Hazarika BN (2003). Acclimatization of tissue-cultured plants. *Curr Sci* 85(12), 1704-1712.

- Huang C & C Chen (2005). Physical properties of culture vessels for plant tissue culture. *Biosystems Engin* 91(4), 501-511.
- Ibrahim I, MI Nasr, BR Mohammed & MM El Zefzafi (2008). Plant growth regulators affecting *in vitro* cultivation in *Stevia rebaudiana*. *Sugar Tech* 10(3), 254-259.
- Jeppesen PB, S Gregersen & KK Alstrup (2002). Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects in vivo: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Phytomed* 9, 9-14.
- Jo EA, RK Tewari, EJ Hahn & KJ Paek (2008). Effect of photoperiod and light intensity on *in vitro* propagation of *Alocasia amazonica*. *Plant Biotechnol Rep* 2, 207-212.
- Kennelly EJ (2002). Sweet and non-sweet constituents of *Stevia rebaudiana*. In: AD Kinghorn (ed.) *The genus Stevia*. Taylor & Francis, London, p. 68-85.
- Manjusha AVM & BN Sathyanarayana (2010). Studies on pre acclimatization treatments to improve post acclimatization survival in stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.). *Acta Hort* 865, 171-178.
- Megeji NW, JK Kumar, V Singh, VK Kaul & PS Ahuja (2005). Introducing *Stevia rebaudiana*, a natural zero-calorie sweetener. *Curr Sci* 88(5), 801-805.
- Midmore DJ & AH Rank (2002). A new rural industry – Stevia – to replace imported chemical sweeteners. A Report for Rural Industries Research and Development Cooperation. ACT, Australia. 50p.
- Mogra R & V Dashora (2009). Exploring the use of *Stevia rebaudiana* as a sweetener in comparison with other sweeteners. *J Hum Ecol* 25(2), 117-120.
- Murashige T & F Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15, 473-497.
- Rademacher W (2000). Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51, 501-531.
- Rafiq M, MU Dahot, SM Mangrio, HA Naqvi & QA Qarshi (2007). *In vitro* clonal propagation and biochemical analysis of field established *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Pakistan J Bot* 39(7), 2467-2474.
- Sairkar P, MK Chandravanshi, NP Shukla & NN Mehrotra (2009). Mass production of an economically important medicinal plant *Stevia rebaudiana* using *in vitro* propagation techniques. *J Med Plant Res* 3(4), 266-270.
- Sinta MM, I Riyadi & Sumaryono (2011). Pengaruh jenis penutup botol kultur terhadap pertumbuhan planlet kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Menara Perkebunan* 79(1), 15-22.
- Sivaran L & U Mukundan (2003). *In vitro* culture studies of *Stevia rebaudiana*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 39, 520-523.
- Supriati Y, I Mariska & Mujiman (2006). Multiplikasi tunas belimbing Dewi (*Averrhoa carambola*) melalui kultur *in vitro*. *Buletin Plasma Nutfah* 12(2), 50-55.
- Ziv M (1995). *In vitro* acclimatization. In: J Aitkin-Christine, T Kozai & L Smith (eds.) *Automation and Environmental Control in Plant Tissue and Organ Culture*. Kluwer, Dordrecht, Netherlands, p. 439-516.