

## **Identifikasi Steviosida pada Kalus Daun Stevia yang Ditumbuhkan dengan 2,4-D dan Kinetin**

### **Identification of Stevioside on Stevia Leaf Callus Grown by 2,4-D and Kinetin**

KARTINAH WIRYOSOENDJOYO\*, SUPRIYADI

*Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi  
Jln. Letjen Sutoyo-Mojosongo Surakarta-57127 Telp. 0271-852518  
\* Korespondensi: kartinahws@yahoo.com*

(Diterima 17 Januari 2014, disetujui 17 Februari 2014)

---

#### **ABSTRAK**

Tanaman Stevia dipanen daunnya karena terasa manis. Rasa manis daun Stevia karena mengandung steviosida, rebaudiosida dan dulkosida. Keunggulan steviosida dan rebaudiosida adalah rendah kalori, tidak dapat difermentasi oleh bakteri dalam mulut serta bersifat nonkarsinogenik. Keunggulan ini menyebabkan steviosida dapat digunakan sebagai pengganti gula, khususnya bagi penderita diabetes mellitus; penderita obesitas dan untuk pemanis pasta gigi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan medium tanam eksplan daun Stevia yang mampu menghasilkan kadar steviosid paling tinggi. Eksplan berasal dari tanaman Stevia yang tumbuh di Surakarta. Medium tumbuh yang digunakan adalah medium New Phaleonopsis (NP) ditambah zat pengatur tumbuh (zpt) kombinasi 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) dan Furfuril Amino Purin (kinetin), masing-masing dengan kadar kinetin 1 ppm; 2,4-D 0,25 ppm dan kinetin 0,75 ppm; 2,4-D 0,5 ppm dan kinetin 0,5 ppm; 2,4-D 0,75 ppm dan kinetin 0,25 ppm dan 2,4-D 1 ppm. Kalus dimaserasi dengan *n*-butanol, diteruskan analisis dengan KLT densitometri. Kadar steviosida dalam kalus dibandingkan dengan kadar steviosid pada tanaman asal. Kadar steviosida tertinggi didapatkan pada kalus yang tumbuh pada medium NP ditambah 1 ppm kinetin, yaitu sebesar 10,625 ppm. Kadar steviosida lebih tinggi dari tanaman asal. Kadar steviosida pada daun Stevia 0,65 ppm.

**Kata kunci :** steviosida, kalus, daun Stevia.

---

#### **ABSTRACT**

Stevia leaves are harvested because of their sweetness. This special characteristic is contributed by steviosida, rebaudiosida and dulkosida. Steviosida and rebaudiosida are low calorie, not able to be fermented by bacteria in the mouth and non carcinogenic. These superiorities make steviosida able to act as sugar substitute, especially for diabetics; obese and as sweetener for toothpaste. The aim of this research was to find planting medium of Stevia leaf explants which is capable of producing the highest level of stevioside. The explants were grown in Surakarta. The medium was New Phaleonopsis (NP) within the addition of growth regulator substance, the combination of 2,4 Dichlorophenoxyacetic Acid (2.4-D), and Furfuril Amino Purin (kinetin) each by kinetin 1 ppm; 2,4-D 0.25 ppm and kinetin 0,75 ppm; 2,4-D 0,5 ppm as well as kinetin 0,5 ppm; 2,4-D 0,75 ppm and kinetin 0,25 ppm 2,4-D 1 ppm. Callus levels were macerated by *n*-butanol, then were analyzed by TLC densitometry. Stevioside levels in callus were compared with the steviosid levels in the original plants. The highest stevioside level was found in the callus grown in NP medium by adding 1 ppm kinetin, amounting to 10,625 ppm. The steviosid level was higher than the original plants. Stevioside level in Stevia leaf was 0,65 ppm.

**Keywords :** stevioside, callus, Stevia leaves.

---

## PENDAHULUAN

Tanaman Stevia atau *Stevia rebaudiana* Bertonii M. atau *Eupatorium rebaudianum* L. termasuk tanaman perdu yang tumbuh pada tempat dengan ketinggian 500-1000 m di atas permukaan laut. Bila tumbuh di dataran rendah Stevia akan cepat berbunga dan mudah mati apabila sering dipanen. Suhu yang cocok untuk pertumbuhannya berkisar antara 14-27°C dan cukup mendapat sinar matahari sepanjang hari. Perkembangbiakan Stevia dilakukan dengan mengecambahkan biji, stek batang, pemisahan rumpun ataupun dengan kultur jaringan.

Bagian tanaman Stevia yang digunakan sebagai pemanis adalah daun. Daun stevia dapat langsung digunakan sebagai pemanis, dengan cara dikeringkan. Proses pengeringan tidak memerlukan suhu tinggi.

Keunggulan Stevia antara lain tingkat kemanisannya mencapai 200-300 kali kemanisan tebu serta rendah kalori sehingga aman dikonsumsi oleh penderita diabetes dan obesitas. Selain itu, Stevia juga bersifat non-karsinogenik. Zat pemanis dalam Stevia yaitu steviosida dan rebaudiosida, senyawa ini tidak dapat difermentasikan oleh bakteri di dalam mulut menjadi asam. Asam ini yang apabila menempel pada email gigi dapat menyebabkan gigi berlubang. Oleh karena itu, stevia tidak menyebabkan gangguan pada gigi (Anonim<sup>1</sup>).

Daun Stevia mengandung tiga jenis glikosida yaitu steviosida, rebaudiosida dan dulkosida, yang ketiganya terikat pada karbohidrat, seperti rhamnosa, fruktosa dan glukosa, silosa, arabinosa. Senyawa lain yang terdapat dalam daun Stevia adalah sterol, tannin dan karotenoid. Selain itu daun Stevia mengandung protein, serat, fosfor, besi, kalsium, kalium,

natrium, magnesium, rutin (flavonoid), zat besi, zink, vitamin C dan vitamin A. Tubuh manusia tidak dapat memetabolisme steviosida, oleh karena itu steviosida dibuang dari tubuh tanpa penyerapan kalori.

Keuntungan Stevia sebagai pemanis yaitu tidak berkalori sehingga tidak menaikkan kadar gula darah dan tidak memungkinkan pertumbuhan bakteri dan ragi pada pangan, stabil terhadap panas hingga suhu 200°C, berfungsi sebagai penguat rasa, memperlambat pembentukan plak dari karies gigi dan tidak toksik, serta merupakan bahan alami dan bukan pemanis buatan (Anonim<sup>2</sup>).

*Stevia rebaudiana* Bertonii M. mempunyai habitus semak, semusim, tinggi tanaman 30 – 90 cm; batang bulat, berbuku, beruas, bercabang, hijau; daun tunggal, berhadapan, bulat telur, ujung tumpul, pangkal runcing, tepi rata, panjang 2 – 4 cm, lebar 1 – 5 cm, pertulangan daun menyirip, berbulu, tangkai pendek, hijau. Bunga majemuk, bentuk malai, di ujung dan di ketiak daun, bentuk terompet, kelopak bentuk tabung, berbulu, berbagi 5, hijau, tangkai benangsari dan tangkai putik pendek, kepalasari kuning, putik bentuk silindris, putih. Buah kotak, berambut, coklat. Akartunggang, putih kotor. Daun berkhasiat sebagai obat kencing manis. Tanaman ini termasuk divisio Spermatophyta, sub divisio Angiospermae, classis Dicotyledoneae, familia Compositae, genus *Stevia* (Anonim<sup>2</sup>).

Pemanenan Stevia harus memperhatikan faktor keamanannya. Jangan menggunakan Stevia secara langsung apabila daun terpapar pestisida atau bahan kimia lain yang berbahaya bagi kesehatan (Anonim<sup>1</sup>).

Kultur jaringan dilakukan dengan mengambil bagian kecil tanaman (eksplan), umumnya potongan organ, disterilkan sehingga bebas mikrobia, kemudian ditanam pada medium yang sesuai. Setiap sel memiliki potensi genetik untuk menghasilkan organisme lengkap, atau dikatakan bahwa sel mempunyai sifat totipotensi (Zulkarnaen 2009).

Keberhasilan pertumbuhan eksplan sangat ditentukan pada pemilihan medium pertumbuhan, karena eksplan bersifat heterotrof. Medium pertumbuhan mengandung unsur-unsur makro, unsur-unsur mikro dan unsur-unsur lain yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel tanaman. Penggunaan medium tertentu umumnya berdasarkan jenis eksplan yang ditanam. Eksplan tanaman tertentu membutuhkan medium tertentu. Kemampuan eksplan tumbuh pada medium diketahui dari penelitian yang telah dilakukan (Kartinah 2009).

Medium Murashige Skoog (MS) termasuk medium yang paling banyak digunakan, terutama untuk tanaman herba, karena tingkat keberhasilan pertumbuhan eksplan tinggi. Medium ini mempunyai konsentrasi garam-garam mineral yang tinggi, dan senyawa N dalam bentuk amonium dan nitrat, sehingga medium ini paling banyak digunakan untuk kultur kalus dan tunas (George & Sherrington 1984).

Eksplan daun Stevia tumbuh baik pada medium MS. Penanaman eksplan daun Stevia pada medium New Phaeonopsis (NP) ternyata juga berhasil tumbuh membentuk kalus dengan baik, bahkan dalam waktu yang lebih cepat. Masing-masing medium diberi zat pengatur tumbuh (zpt) Benzyl Amino Purin (BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) masing-masing 0,5 ppm. Medium NP cocok untuk pertumbuhan eksplan daun

Stevia, sehingga dari penelitian diketahui bahwa medium NP dapat digunakan untuk budidaya jaringan daun Stevia.

Deteksi adanya steviosida dalam kalus daun stevia dapat dilakukan dengan Kromatografi Lapis tipis (KLT), menggunakan fase diam Silika gel 60 F<sub>254</sub> dan fase gerak butanol : asam asetat : air (6:2:1) dengan Lieberman Burchard sehingga bercak steviosida dapat memisah dengan baik (Wagner 1996).

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Tanaman Stevia diperoleh dari petani Stevia di daerah Tawangmangu. Di Surakarta, tanaman dipangkas, sehingga tumbuh tunas-tunas baru. Eksplan diambil dari daun yang berasal dari tunas muda.

Medium yang digunakan adalah medium New Phaeonopsis (NP). Zat pengatur tumbuh yang digunakan adalah 2,4-D dan kinetin dengan konsentrasi 2,4-D 1 ppm; 2,4-D 0,25 ppm dan kinetin 0,75 ppm; 2,4-D 0,5 ppm dan kinetin 0,5 ppm; 2,4-D 0,75 ppm dan kinetin 0,25 ppm; kinetin 1 ppm.

Sterilisasi eksplan dengan larutan NaOCl, kemudian dicuci aquadest steril. Perlakuan sterilisasi dilanjutkan dengan larutan alkohol 70 % selama 1 - 2 menit. Sterilan dihilangkan dengan pembilasan aquadest steril sebanyak 3 kali.

Bahan kimia untuk uji steviosida, *n*-butanol, alkohol 96%, alkohol 70%, kloroform, pereaksi Lieberman Burchard, standard steviosida.

### Alat

Alat-alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah otoklaf untuk sterilisasi media dan aquadest, entkas untuk menanam eksplan dan sub kultur kalus; inkubator yang dilengkapi dengan penerangan lampu TL; timbangan elektrik;

lemari pendingin untuk menyimpan persenyawaan yang tidak tahan disimpan pada suhu kamar; oven untuk sterilisasi pinset, skalpel, cawan Petri dan botol-botol medium bertutup karet; gunting, kertas Aluminium Foil; labu takar; pipet tetes; pengaduk kaca; lampu spiritus; pH stick; chamber, lempeng Kromatografi Lapis Tipis; Densitometer, kertas saring, corong gelas, gelas ukur, lempeng Silica gel 60 F<sub>254</sub>, mikropipet untuk penotolan cuplikan, penyemprot, oven binder.

### **Pengambilan Bahan Tanam (Eksplan)**

Daun Stevia yang digunakan untuk eksplan berasal dari tunas-tunas muda tanaman Stevia yang sudah beradaptasi tumbuh di Surakarta. Bagian yang digunakan sebagai eksplan adalah helaian daun yang masih muda.

### **Penyiapan Medium Tanam**

Medium tanam yang digunakan adalah medium New Phaeonopsis (NP). Komposisi Medium NP (mg/l) adalah NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 32; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 303,9 ; KNO<sub>3</sub> 424,6; MgNO<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 256,4; Ca(NO<sub>3</sub>).4H<sub>2</sub>O 637,6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 462,7; Na<sub>2</sub>EDTA 37,3; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 27,8; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 22,3 ; ZnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O 8,6; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 6,2 ; KI 0,83 ; NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,25 ; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,025; CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,025 ; Glisin 2 ; nicotinic acid 0,5 ; pyridoxin-HCl 0,5 ; thiamin-HCl 0,1 ; myoinositol 100 ; Agar 8.000 – 10.000 ; pH 5,7 – 5,8. Zpt yang ditambahkan adalah 2,4-D dan kinetin.

Disiapkan bahan-bahan penyusun medium NP. Unsur makro ditimbang. Unsur mikro diberi perlakuan pengenceran 100 mg/100 ml atau 10 mg/100 ml. Unsur-unsur makro dan unsur-unsur mikro dilarutkan dengan aquadest, ditambah zat pengatur tumbuh (zpt) kombinasi 2,4-D dan kinetin masing-masing konsentrasi kinatin 1 ppm

(medium 1); 2,4-D 0,25 ppm dan kinetin 0,75 ppm (medium 2); 2,4-D 0,5 ppm dan kinetin 0,5 ppm (medium 3); 2,4-D 0,75 ppm dan kinetin 0,25 ppm (medium 4); kinetin 1 ppm (medium 5). Semua bahan dicampur, dilarutkan, dituang ke botol-botol medium, kemudian disterilkan dengan otoklaf suhu 121°C selama 30 menit. Uji sterilitas medium dilakukan dengan inkubasi medium pada suhu inkubator selama 5 – 7 hari. Medium yang steril digunakan untuk penanaman eksplan daun Stevia.

### **Sterilisasi dan Penanaman Eksplan**

Sterilisasi eksplan daun muda Stevia dilakukan dengan larutan NaOCl 2,5% selama 10 – 15 menit, dilanjutkan dengan larutan NaOCl 1,25% selama 10 – 15 menit, dicuci aquadest steril, dilanjutkan dengan larutan alkohol 70 % selama 1 - 2 menit, kemudian dibilas aquadest steril tiga kali. Eksplan dipotong secara aseptis dengan menggunakan scalpel disposable. Potongan eksplan steril dimasukkan dalam medium tumbuh dengan pinset steril.

### **Analisis Kadar Steviosida**

Analisis steviosida pada kalus daun Stevia dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Analisis secara kualitatif dengan Kromatografi Lapis Tipis dengan cara membandingkan larutan standar steviosida dan sampel dari kalus daun Stevia. Analisis secara kuantitatif (penetapan kadar) dilakukan secara KLT – densitometri, dengan cara membandingkan luas area bercak dari sampel dengan luas area standard steviosida. Pengukuran kadar steviosida juga dilakukan terhadap daun Stevia yang ditanam di Solo (sebagai kontrol).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kultur Jaringan Daun Stevia

Eksplan mampu tumbuh membentuk kalus bila terdapat hormon atau zpt auksin dan kinetin (George & Sherrington 1984). Ternyata eksplan daun Stevia mampu tumbuh dengan baik pada medium New Phaleonopsis (NP) ditambah zpt 2,4-D dan kinetin. Pertumbuhan kalus umumnya terjadi minggu ke dua sampai minggu ke enam setelah penanaman eksplan. Pada medium NP ditambah 2,4-D saja (1 ppm) tampak eksplan tumbuh membentuk kalus. Hal ini disebabkan 2,4-D termasuk kelompok zpt auksin yang mampu menghasilkan kalus dengan baik, dan kemungkinan di dalam eksplan sudah terdapat hormon sitokinin. Pada medium NP ditambah kinetin saja (1 ppm), eksplan segera tumbuh membentuk kalus, bila tidak segera dilakukan sub kultur akan segera terbentuk planlet; hal ini menunjukkan bahwa dalam eksplan sudah terdapat hormon auxin yang cukup tinggi, sehingga dengan penambahan zpt golongan sitokinin saja eksplan sudah mampu menghasilkan kalus dan segera membentuk planlet, tetapi tanpa pembentukan akar.

Eksplan yang ditumbuhkan pada medium NP ditambah 2,4-D saja ternyata mampu tumbuh membentuk kalus saja. Hal ini disebabkan 2,4-D merupakan auksin yang sangat baik untuk memacu pertumbuhan kalus. Kemungkinan eksplan juga mengandung hormon sitokinin. Akibatnya kalus tumbuh baik, hal ini sesuai pendapat George & Sherrington (1984). Kalus tumbuh pada minggu ke dua sampai minggu ke enam.

Kalus yang tumbuh dipotong secara aseptis, kemudian dipindah pada medium baru/segar (sub kultur) dengan kandungan nutrisi yang sama, dan diinkubasi kembali.

Tujuan perlakuan sub kultur adalah untuk menambah suplai medium sehingga dapat terjadi pertumbuhan kalus. Kalus dibutuhkan dalam jumlah cukup untuk analisa kadar steviosida secara kualitatif dan kuantitatif.

Pertumbuhan eksplan pada medium NP ditambah 2,4-D dan kinetin dengan kombinasi 2,4-D 0,25 ppm dan kinetin 0,75 ppm serta 2,4-D 0,75 ppm dan kinetin 0,25 ppm menunjukkan pertumbuhan kalus yang baik, tanpa disertai pembentukan planlet. Eksplan yang ditanam pada medium NP ditambah zpt 2,4-D 0,5 ppm dan kinetin menunjukkan pertumbuhan kalus yang baik, tetapi keterlambatan sub kultur menyebabkan terjadinya pertumbuhan planlet. Kemungkinan hal ini terjadi karena kebutuhan zpt seimbang mampu memacu pembentukan planlet.

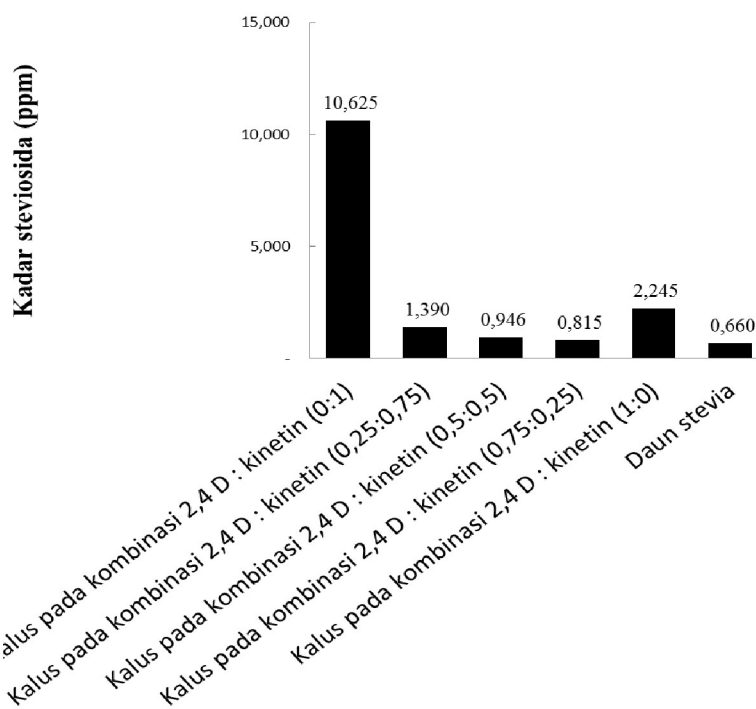
### Analisa Steviosida pada Kalus

Analisis steviosida secara kualitatif dengan Kromatografi Lapis Tipis dengan cara membandingkan larutan standar steviosida dan sampel dari kalus daun Stevia. Ternyata bercak/noda dari kalus daun Stevia sama dengan standard steviosida. Dengan demikian diketahui bahwa sampel kalus daun Stevia mengandung steviosida.

Analisis steviosida secara kuantitatif dilakukan secara KLT – densitometri, dengan cara membandingkan luas area bercak dari sampel dengan luas area standard steviosida. Diperoleh kadar stevia dalam sampel kalus daun Stevia daun Stevia yang ditanam di Solo (sebagai kontrol) pada Tabel 1 dan Gambar 1.

Tabel 1. Kadar steviosida dalam kalus daun stevia dan daun stevia

| Bahan  | Kadar steviosida (ppm) |
|--|------------------------|
| Kalus pada kombinasi 2,4 D : kinetin (0:1)       | 10,625                 |
| Kalus pada kombinasi 2,4 D : kinetin (0,25:0,75) | 1,390                  |
| Kalus pada kombinasi 2,4 D : kinetin (0,5:0,5)   | 0,946                  |
| Kalus pada kombinasi 2,4 D : kinetin (0,75:0,25) | 0,815                  |
| Kalus pada kombinasi 2,4 D : kinetin (1:0)       | 2,245                  |
| Daun stevia                                      | 0,660                  |



Gambar 1. Kadar steviosida pada kalus Stevia dan daun Stevia.

Pemeriksaan kadar steviosida pada medium NP ditambah 2,4-D dan kinetin menunjukkan kadar steviosida lebih tinggi dari kandungan tanaman asal. Mungkin hal ini terjadi karena glukosa yang berfungsi sebagai sumber energi tidak sepenuhnya digunakan untuk pembelahan sel-sel kalus, sehingga terjadi pembentukan senyawa steviosida.

Uji beda kadar steviosida antara berbagai formula dalam medium NP ditambah 2,4 D dan kinetin menyimpulkan ada beda kadar steviosida yang signifikan. Formula 2,4 D dan kinetin

(0:1) mempunyai kadar steviosida paling tinggi secara signifikan.

### KESIMPULAN

Medium New Phaeonopsis ditambah 2,4-D dan kinetin mampu menumbuhkan kalus dan atau planlet pada eksplan daun Stevia. Kandungan steviosida pada kalus yang tumbuh pada medium NP 2,4-D dan kinetin lebih tinggi dari tanaman Stevia yang tumbuh di Solo. Kalus yang tumbuh pada medium NP ditambah kinetin 1 ppm mengandung steviosida paling tinggi.

### DAFTAR PUSTAKA

- Anonim<sup>1</sup>. Mengenal Stevia (Sweet Honey Leaf) sebagai Pemanis. <http://www.florabiz.net/flora/mengenal-stevia-sweet-honey-leaf-sebagai-sumber-pemanis.html> Sumber: ditjenbun.deptan.go.id. Diakses 15 Maret 2012.
- Anonim<sup>2</sup>. Daftar Komoditi Binaan Direktorat Jenderal Perkebunan. Berdasarkan Keputusan Menteri Pertanian. Nomor 511/KPTS/PD.310/9/2006. <http://ditjenbun.deptan.go.id/web.old/images/stories/fruit/komoditi%20binaan%20ditjenbun-8.pdf>. Diakses 12 Maret 2012.
- George & Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture, Handbook and Directory of Commercial Laboratories*. Exegetic Limited. England.
- Kartinah W. 2009. Short Cut Penanaman Explant Daun Stevia Pada Medium New Phaleonopsis. *Biomedika. Jurnal Ilmiah Biologi dan Kesehatan*. 2(2): 51-55.
- Wagner H, Bladt S. 1996: *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2<sup>nd</sup> ed. Springer-Germann.
- Zulkarnaen. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman*. Cetakan pertama. Yogyakarta: Bumi Aksara.