

Pengaruh Berbagai Konsentrasi *Dichlorophenoxy Acetic Acid* terhadap Kecepatan Induksi dan Viabilitas Kalus Daun Stevia (*Stevia rebaudiana*) pada Medium *New Phalaenopsis* secara *In Vitro*

Effect of Various Concentration of *Dichlorophenoxy Acetic Acid* on Induction and Viability Callus of *Stevia rebaudiana* Leaves in Medium *New Phalaenopsis* In Vitro

Dwi Indahning Rohmah*, Evie Ratnasari, Isnawati
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Surabaya
*e-mail: indahningdwi@gmail.com

ABSTRAK

Stevia (Stevia rebaudiana) menghasilkan rasa manis 200-300 kali lebih tinggi dibandingkan gula tebu atau sukrosa dan tumbuh baik di dataran tinggi namun tumbuh kurang baik di dataran rendah karena lahan pertanian pada dataran tinggi terbatas maka untuk mengatasi keterbatasan lahan produksi pemanis stevia dapat dilakukan di laboratorium dengan teknik kultur jaringan agar diperoleh metabolit sekundernya. Penelitian ini bertujuan untuk mendeskripsikan pengaruh berbagai konsentrasi 2,4 D (*Dichlorophenoxy acetic acid*) terhadap kecepatan induksi dan viabilitas kalus daun stevia pada medium *New Phalaenopsis* (NP) secara *in vitro*. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 5 perlakuan dan setiap perlakuan memiliki 5 ulangan sehingga terdapat 25 unit eksperimen. Parameter yang diamati adalah kecepatan induksi dan viabilitas kalus daun stevia yang meliputi biomassa, tekstur dan warna kalus. Data kecepatan induksi, tekstur dan warna kalus dianalisis secara deskriptif, sedangkan biomassa kalus dianalisis dengan ANAVA satu arah yang dilanjutkan uji BNT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian berbagai konsentrasi 2,4 D berpengaruh terhadap kecepatan induksi dan viabilitas kalus daun stevia pada medium NP secara *in vitro*. Konsentrasi 2,4 D tercepat untuk menginduksi kalus daun adalah 1,0 mg/l; 1,5 mg/l; dan 2,0 mg/l; serta 2,4 D 0,5 mg/l; merupakan konsentrasi yang tepat untuk menghasilkan viabilitas kalus daun yang optimal.

Kata kunci: *Stevia rebaudiana*; *Dichlorophenoxy acetic acid*; kecepatan induksi kalus; viabilitas kalus; medium *New Phalaenopsis*

ABSTRACT

Stevia (Stevia rebaudiana) produces sweetness 200-300 times higher than cane sugar or sucrose and grow well in the highlands but grew less well in the lowlands, because the agricultural land on the highland is limited, so to overcome the limitations of stevia sweetener production area can be done in the laboratory with tissue culture techniques in order to obtain secondary metabolites. This study aimed to determine the effect of various concentrations of 2.4 D (*Dichlorophenoxy acetic acid*) on the speed induction and viability callus of leaves and nodes from stevia in medium *New Phalaenopsis* (NP) *in vitro*. This research used completely randomized design with 5 treatments and each treatment had 5 repetitions, so there are 25 units experiment. Parameters measured were speed induction of callus and viability of stevia leaves which includes biomass, texture and color of the callus. Data of the speed of callus induction, the texture of callus, and the color of callus were analyzed descriptively, whereas the biomass of callus from leaves explant was analyzed by using one-way ANOVA followed LSD test. The results showed that increasing concentrations of 2.4 D effected on the speed of callus induction, viability of callus from the stevia plant leaves and nodes in NP medium *in vitro*. The concentration of 2.4 D at 1.0 mg/l; 1.5 mg/l; and 2.0 mg/l; were fastest to induce callus on stevia leaves and the concentration of 2.4 D at 0.5 mg/l was optimum concentration for the best callus viability.

Key words: *Stevia rebaudiana*; *Dichlorophenoxy acetic acid*; speed of callus induction; callus viability; *New Phalaenopsis* medium

PENDAHULUAN

Stevia merupakan tanaman perdu famili Compositae asal Paraguay yang dapat dijadikan pemanis pengganti gula tebu karena

keunggulannya sebagai pemanis alami yang tidak mengandung kalori dan 200-300 kali lebih manis daripada gula tebu (Mogra dan Dashora dalam Sumaryono dan Sinta, 2011). Pemanis stevia

memiliki indeks glikemat hampir nol sehingga aman bagi penderita diabetes maupun bagi orang yang sedang menjalani diet makanan untuk menurunkan berat badan (Gregesen *et al.*, dalam Sumaryono dan Sinta, 2011). Stevia memiliki nilai ekonomis tinggi untuk dibudidayakan sehingga ketersediaan bibit yang baik merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan budidaya stevia. Penyediaan bibit secara konvensional melalui biji memiliki tingkat keberhasilan yang rendah, sedangkan perbanyakkan dengan stek ujung apikal dan batang akan menghasilkan pertanaman yang tidak seragam sehingga kualitas tanaman tidak dapat dipastikan. Perbanyakkan secara kultur jaringan lebih cepat, bibit yang dihasilkan lebih banyak dan seragam serta kualitas tanaman lebih terjaga (Staba, 2000). Pada penelitian ini digunakan eksplan daun stevia karena kultur kalus eksplan daun stevia dapat menghasilkan metabolit sekunder berupa steviosida yang merupakan pemanis alam. Tanaman stevia tumbuh baik di dataran tinggi, namun tumbuh kurang baik di dataran rendah. Karena lahan pertanian pada dataran tinggi terbatas, maka untuk mengatasi keterbatasan lahan produksi pemanis stevia dapat dilakukan di laboratorium dengan teknik kultur jaringan agar diperoleh metabolit sekundernya.

Dalam kultur jaringan diperlukan medium nutrisi yang cocok agar hasil yang diperoleh sesuai dengan yang diinginkan. Medium NP memiliki komposisi hampir sama dengan medium MS namun kandungan garam-garam mineralnya lebih rendah dan telah terbukti dapat menginduksi kalus eksplan daun stevia lebih cepat dibandingkan dengan medium MS. Zat pengatur tumbuh baik eksogen maupun endogen juga sangat diperlukan untuk merangsang pembelahan sel dan dediferensiasi eksplan agar membentuk kalus.

Auksin menginduksi pembentangan sel terutama dengan menaikkan kemungkinan pemanjangan dinding sel. Pada umumnya auksin digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus dengan memacu pemanjangan sel di dalam jaringan tanaman (Davies, 2004). Zat pengatur tumbuh 2,4 D merupakan salah satu jenis auksin yang memiliki peran inisiasi kalus pada jaringan tanaman (Flick, *et al.* dalam Lestari 2011).

Penelitian ini bertujuan untuk mendeskripsikan pengaruh berbagai konsentrasi 2,4 D (*Dichlorophenoxy acetic acid*) terhadap kecepatan induksi dan viabilitas kalus daun stevia pada medium *New Phalaenopsis* (NP) secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan UPTD Balai Pembibitan Dinas Pertanian Kota Surabaya pada bulan September hingga bulan Oktober 2013.

Bagian dari stevia yang dijadikan eksplan adalah daun. Kriteria eksplan dipilih helaian daun yang masih muda terletak pada urutan kedua dari ujung apikal stevia. Eksplan dipotong dengan ukuran 1 cm dan pemotongan menyertakan ibu tulang daun. Eksplan disterilisasi dengan alkohol 70% selama 2 menit dilanjutkan dengan tween 20% selama 6-7 menit. Selanjutnya inokulasi eksplan pada medium NP yang telah disubstitusi air kelapa 20% dengan penambahan 2,4 D (0 mg/l; 0,5 mg/l; 1,0 mg/l; 1,5 mg/l).

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan terdapat 4 tingkat konsentrasi dan 1 kontrol. Setiap unit perlakuan terdiri atas 5 ulangan sehingga jumlah total unit eksperimen 25 botol, untuk setiap botol akan diisi 2 eksplan.

Data dikumpulkan dengan cara mencatat waktu induksi kalus dihitung mulai satu hari setelah inokulasi, sedangkan biomassa kalus diperoleh dari massa kalus yang diukur dengan neraca pada hari ke-40, tekstur kalus dan warna kalus yang dihasilkan diamati pada hari ke-40 dihitung mulai satu hari setelah inokulasi. Warna kalus yang diinginkan adalah warna hijau muda (■).

Data hasil kecepatan induksi, tekstur, dan warna kalus dianalisis secara deskriptif. Biomassa kalus dianalisis dengan ANAVA satu arah dan dilanjutkan dengan uji BNT.

HASIL

Terdapat pengaruh pemberian berbagai konsentrasi 2,4 D terhadap kecepatan induksi dan viabilitas kalus stevia, hal ini membuktikan bahwa eksplan yang digunakan dapat merespons zat pengatur tumbuh 2,4 D yang diberikan sehingga kalus terbentuk (Tabel 1 dan 2).

Tabel 1. Hasil rerata kecepatan induksi dan viabilitas kalus stevia pada medium NP secara *in vitro*

Perlakuan	Kecepatan Induksi Kalus (hari)	Viabilitas Kalus		
		Tekstur	Warna	Gambar
A (2,4 D 0,5 mg/l)	9	Kompak	Hijau	
B (2,4 D 1,0 mg/l)	8	Kompak	Hijau- Putih	
C (2,4 D 1,5 mg/l)	8	Kompak	Kuning	
D (2,4 D 2,0 mg/l)	8	Kompak	Kuning	
E (2,4 D 0 mg/l)	-	-	-	

Induksi kalus daun tercepat ditunjukkan pada eksplan yang diberi perlakuan 2,4 D 1,0 mg/l; 1,5 mg/l; dan 2,4 D 2,0 mg/l; yaitu 8 hari. Perlakuan 2,4 D 0,5 mg/l memiliki waktu induksi terlama dibandingkan perlakuan 2,4 D 1,0 mg/l; 1,5 mg/l; dan 2,4 D 2,0 mg/l; yaitu 9 hari. Tekstur kalus hampir semua perlakuan adalah kompak kecuali pada perlakuan 2,4 D 0 mg/l. Pada perlakuan 2,4 D 0 mg/l tidak terjadi induksi kalus, eksplan daun hanya menggulung hingga

hari terakhir pengamatan yaitu hari ke-40. Kalus pada perlakuan 2,4 D 0,5 mg/l berwarna hijau, perlakuan 2,4 D 1,0 mg/l berwarna hijau putih sedangkan pada perlakuan 2,4 D 1,5 mg/l; dan 2,4 D 2,0 mg/l; berwarna kuning. Warna kalus terbaik adalah pada perlakuan 2,4 D 0,5 mg/l karena memiliki warna hijau yang paling mendekati kotak warna dibandingkan dengan perlakuan 2,4 D 1,0 mg/l; 1,5 mg/l; dan 2,4 D 2,0 mg/l; (Tabel 1).

Tabel 2. Rerata biomassa kalus daun tanaman stevia

Perlakuan	Biomassa kalus (gram)
A (2,4 D 0,5 mg/l)	0,942 ^a ± 0,140
B (2,4 D 1,0 mg/l)	1,018 ^a ± 0,233
C (2,4 D 1,5 mg/l)	1,236 ^b ± 0,074
D (2,4 D 2,0 mg/l)	1,308 ^b ± 0,115
E (2,4 D 0 mg/l)	0 ^c ± 0,000

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata pada uji BNT dengan taraf 5 %.

Hasil biomassa kalus pada tabel 2 setelah diuji normalitasnya data tersebut berdistribusi normal dan analisis dengan uji parametrik ANAVA satu arah menunjukkan hasil yang signifikan maka dilanjutkan uji BNT untuk mencari konsentrasi 2,4 D terbaik terhadap biomassa kalus daun stevia pada medium NP secara *in vitro*. Berdasarkan hasil uji BNT menunjukkan bahwa perlakuan 2,4 D 0,5 mg/l; dan 2,4 D 1,0 mg/l; menghasilkan biomassa kalus terbaik dibandingkan dengan perlakuan 2,4 D 1,5 mg/l; dan 2,4 D 2,0 mg/l. Warna kalus perlakuan 2,4 D 0,5 mg/l memiliki warna kalus paling baik, sementara tekstur semua perlakuan adalah kompak kecuali pada perlakuan 2,4 D 0 mg/l, dengan demikian perlakuan yang menghasilkan viabilitas paling optimal adalah pada perlakuan 2,4 D 0,5 mg/l.

PEMBAHASAN

Induksi kalus tercepat terjadi pada perlakuan 2,4 D 1,0 mg/l; 1,5 mg/l; dan 2,0 mg/l; yaitu 8 hari. Induksi kalus terjadi karena pemberian 2,4 D eksogen pada medium NP yang digunakan untuk menumbuhkan eksplan berpengaruh terhadap sel-sel eksplan stevia sehingga terjadi pemanjangan sel (Hayati *et al.*, 2010) untuk membentuk kalus sedangkan pada kontrol tanpa penambahan 2,4 D (perlakuan 2,4 D 0 mg/l) kalus tidak terinduksi. Tidak terbentuknya kalus pada perlakuan E dikarenakan sel-sel eksplan tidak kompeten untuk mengekspresikan totipotensi sehingga tidak terjadi induksi kalus (Smith, 2013).

Tekstur kalus hampir semua perlakuan adalah kompak kecuali pada perlakuan 2,4 D 0 mg/l. Pada perlakuan 2,4 D 0 mg/l tidak terjadi induksi kalus, eksplan daun hanya menggulung hingga hari terakhir pengamatan yaitu hari ke-40. Hartmann dan Kester menyebutkan bahwa tekstur kalus kompak terbentuk karena pembelahan sel-sel eksplan stevia terjadi hanya pada bagian meristematik yang terletak pada bagian luar sel perifer, tidak pada seluruh bagian eksplan dikarenakan lapisan dalamnya terdiri dari sel mixoploid yang merupakan jaringan tua

dan tidak membelah lagi. Proses fisiologi dan genetik yang terjadi akan berbeda dengan lapisan luar, kemudian pembelahan sel pada bagian luar eksplan berkurang sehingga kalus menjadi kompak (Katuuk, 1989).

Kalus pada perlakuan 2,4 D 0,5 mg/l berwarna hijau, perlakuan 2,4 D 1,0 mg/l berwarna hijau putih sedangkan pada perlakuan 2,4 D 1,5 mg/l; dan 2,4 D 2,0 mg/l; berwarna kuning. Kalus yang berwarna hijau merupakan kalus yang di dalam sel-selnya masih terkandung klorofil, kalus yang berwarna hijau ini didapat dari perlakuan dengan konsentrasi 2,4 D lebih rendah. Pada kalus yang berwarna kuning telah terjadi reduksi pembentukan klorofil dihasilkan oleh perlakuan yang memiliki konsentrasi 2,4 D lebih tinggi daripada kalus berwarna hijau. Menurut Katuuk (1989) 2,4 D yang ditambahkan dalam medium NP sebagai auksin bersifat sebagai penghambat terhadap pembentukan klorofil, sesuai data hasil yaitu kalus pada perlakuan 2,4 D 0,5 mg/l berwarna hijau, pada perlakuan 2,4 D 1,0 mg/l berwarna hijau putih sedangkan pada perlakuan 2,4 D 1,5 mg/l; dan 2,4 D 2,0 mg/l; berwarna kuning.

Pada medium NP yang digunakan telah disubstitusi dengan air kelapa 20%. Menurut Katuuk (1989) air kelapa mengandung kalori, protein dan mineral juga mengandung sitokinin, keberadaan sitokinin dalam medium yang ditanami eksplan daun stevia mampu bekerja secara sinergis dengan 2,4 D sehingga eksplan mengalami stres yang diarahkan dalam peningkatan pembelahan sel secara terus menerus. Interaksi auksin dan sitokinin ini selanjutnya akan menginisiasi kalus dari stevia. Peningkatan pembelahan sel ini akan meningkatkan ukuran kalus sehingga biomassa kalus juga akan bertambah.

SIMPULAN

Pemberian berbagai konsentrasi 2,4 D berpengaruh terhadap kecepatan induksi dan viabilitas kalus daun stevia (*Stevia rebaudiana*) pada medium NP (*New Phalaenopsis*) secara *in vitro*. Konsentrasi 2,4 D tercepat untuk menginduksi kalus daun adalah 1,0 mg/l; 1,5 mg/l; dan 2,0 mg/l; serta 2,4 D 0,5 mg/l; merupakan konsentrasi yang tepat untuk menghasilkan viabilitas kalus daun yang optimal. Diharapkan dapat dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui persentase kandungan steviosida pada kalus yang dihasilkan dan guna mengetahui medium yang optimal untuk organogenesis kalus stevia yang dihasilkan dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Davies P, 2004. *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*. Netherlands: Springer.
- Hayati S, Y Nurchayati, N Setyari, 2010. *Induksi Kalus dari Hipokotil Alfalfa (*Medicago sativa* L.) secara in vitro dengan Penambahan Benzyl Amino Purine (BAP) dan *a*-Naphthalene Acetic Acid (NAA). Diakses melalui <http://eprints.undip.ac.id> pada tanggal 24 Juni 2012.*
- Katuuk J, 1989. *Teknik Kultur Jaringan dalam Mikropopagasi Tanaman*. Jakarta: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan.
- Lestari E, 2011. Peranan Zat Pengatur Tumbuh Dalam Perbanyakkan Tanaman Melalui Kultur Jaringan. *Jurnal AgroBiogen*, 7(1): 63-68.
- Smith R, 2013. *Plant Tissue Culture Third Edition: Techniques and Experiments*. California: Elsevier Inc.
- Staba E, 2000. *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemical*. Florida: CRC Press.
- Sumaryono dan Sinta M, 2011. Peningkatan Laju Multiplikasi Tunas dan Keragaan Plantlet *Stevia rebaudiana* Pada Kultur *in vitro*. *Menara Perkebunan*, 79(2): 49-56.