

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Stevia rebaudiana Bertoni merupakan tanaman herba dari famili Asteraceae yang memiliki nilai komersial sebagai pemanis alami bebas kalori (Ghazal *et al.*, 2024). Kandungan rasa manis pada stevia berasal dari senyawa diterpenoid steviol glikosida, yang memiliki tingkat kemanisan mencapai hingga 300 kali lipat dibandingkan dengan sukrosa. Komponen pemanis utama dari senyawa tersebut adalah stevioside dan rebaudioside A (Tehrani *et al.*, 2023). Selain itu, stevia juga mengandung sejumlah senyawa metabolit sekunder penting seperti kumarin, flavonoid, fenol, tanin, dan minyak atsiri (Rai & Han, 2022). Berdasarkan aktivitas biologisnya, stevia bersifat antihipertensi, antidiabetes, antiobesitas, antitumor, antikaries, antioksidan, antiinflamasi, antimikroba, serta antijamur, dan mampu meningkatkan fungsi ginjal (Miladinova-Georgieva *et al.*, 2023).

Permintaan stevia sebagai pemanis alami pengganti gula terus mengalami peningkatan dalam skala komersial (Taak *et al.*, 2020). Berbagai upaya dalam perbanyakan tanaman dan peningkatan senyawa metabolit sekunder tanaman stevia telah dilakukan. Namun, rendahnya persentase perkecambahan menjadi kendala utama dalam produksi stevia dikarenakan bijinya yang bersifat *self-incompatibility*, sehingga menyebabkan biji menjadi infertil dan endospermanya berukuran kecil. Perbanyakan stevia melalui biji juga tidak memungkinkan untuk menghasilkan populasi yang homogen, sehingga terjadi variabilitas dalam pertumbuhan dan komponen tanaman, seperti kadar serta komposisi pemanis. Metode perbanyakan melalui stek batang pun

dinilai kurang efisien karena keterbatasan sumber eksplan dan jumlah individu yang dihasilkan. Metode ini tidak efektif untuk produksi stevia dalam skala besar (Singh *et al.*, 2017; Bayraktar, 2019). Oleh karena itu, metode kultur *in vitro* menjadi alternatif yang potensial dalam mengatasi kendala produksi di lapangan, termasuk pengendalian faktor biotik dan abiotik yang dapat mempengaruhi komponen metabolit sekunder (Nabi *et al.*, 2021).

Berbagai teknik kultur *in vitro* seperti kultur kalus, suspensi, *hairy root*, dan kultur tunas merupakan metode yang umum digunakan untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder tertentu pada tanaman secara signifikan. Kultur kalus dinilai menjadi pendekatan yang potensial untuk meningkatkan biosintesis senyawa bioaktif pada berbagai spesies tanaman (Selwal *et al.*, 2023). Kalus adalah massa sel yang tidak berdiferensiasi dan tidak terorganisir yang terbentuk dari jaringan tanaman (Sanyal *et al.*, 2022). Kultur *in vitro* melalui suspensi kalus memberikan kondisi optimal bagi pertumbuhan kalus dan menjadi metode yang ideal untuk diferensiasi dan akumulasi metabolit sekunder dikarenakan tingginya tingkat pertumbuhan sel dalam suspensi (Pan *et al.*, 2020; Rajan *et al.*, 2020). Perkembangan kalus dipengaruhi beberapa faktor penting yaitu jenis media dan zat pengatur tumbuh (ZPT) (Shweta *et al.*, 2020).

Media tumbuh berperan penting dalam menyediakan nutrisi yang terdiri atas unsur hara makro, mikro, dan karbohidrat untuk mendukung pertumbuhan serta perkembangan jaringan tanaman (Pratomo, 2016). Jenis media yang umum digunakan untuk induksi kalus pada *Stevia rebaudiana* adalah media MS (Murashige & Skoog). Namun, Ajjah (2016) menyatakan bahwa tahap awal induksi kalus memerlukan media dasar dengan kandungan hara yang tinggi untuk menginisiasi pembelahan sel. Media

DKW (Driver and Kuniyuki Walnut) diketahui memiliki kandungan hara berupa fosfor (PO_4^-), sulfur (SO_4^-), magnesium (Mg^+), dan kalsium (Ca^+) yang lebih tinggi dibandingkan dengan media MS. Unsur-unsur ini berperan penting dalam pemanjangan dan pembelahan sel, pengaturan berbagai respons sel, translokasi karbohidrat, serta sebagai kofaktor enzim. Hal ini didukung oleh penelitian Page *et al.* (2020) yang menunjukkan bahwa penggunaan media DKW dengan penambahan 2,4-D menunjukkan pertumbuhan kalus yang lebih cepat serta massa kalus yang lebih besar pada *Cannabis sativa* dibandingkan dengan media MS. Penelitian lain oleh Ghannad *et al.* (2023) pada kalus *Pistacia vera* menunjukkan bahwa media DKW meningkatkan persentase induksi kalus yang lebih tinggi dibandingkan pada media MS. Selain itu, Gati *et al.* (2021) melaporkan bahwa penggunaan media DKW pada kultur tunas *Stevia rebaudiana* menunjukkan pertumbuhan tunas yang lebih optimal dibandingkan dengan media MS, AB Mix, Growmore, dan Grandasil D.

Kombinasi ZPT golongan auksin dan sitokinin diketahui menghasilkan kalus yang lebih unggul dibandingkan dengan penggunaan masing-masing ZPT secara tunggal. Sitokinin berperan dalam menurunkan lignifikasi dinding sel sehingga meningkatkan inisiasi kalus (Dar *et al.*, 2021). Sedangkan auksin berperan dalam menstimulasi pertumbuhan dan pemanjangan sel melalui pelonggaran dinding sel yang dimulai dari pembelahan sel pada area meristematis (Sari *et al.*, 2018). Aplikasi 2 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L giberelin menunjukkan persentase eksplan membentuk kalus sebesar 90% dan kalus bertekstur remah (Zayova *et al.*, 2022). Selanjutnya, induksi kalus dengan perlakuan 1 mg/L NAA + 0,5 mg/L BAP menghasilkan kalus dengan tekstur remah dan berwarna hijau (Golkar *et al.*, 2018).

Pembentukan komponen kimia dari senyawa metabolit sekunder dalam kultur jaringan dapat diinduksi oleh stres eksternal dengan pemberian elisitor. Elisitasi merupakan metode yang menginduksi perubahan fisiologis dan biokimia pada tanaman dengan bantuan rangsangan kimiawi sehingga memicu tanaman untuk mengembangkan sistem pertahanan terhadap tekanan dari lingkungan (Singh, 2023). Pemberian elisitor memodulasi aktivasi gen yang memicu sintesis enzim yang terlibat dalam biosintesis senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, terpenoid, thionin, fenilpropanoid, dan polipeptida (Efferth, 2019).

Asam salisilat (SA) merupakan komponen fenolik yang disintesis dari fenilalanin atau isokomerat dan banyak digunakan sebagai elisitor karena dapat meningkatkan sintesis serta akumulasi metabolit sekunder pada tanaman (Ali, 2021). Pemberian SA secara eksogen dengan konsentrasi yang tepat dapat mendorong proses fisiologis tanaman dengan meningkatkan aktivitas enzim dan kadar antioksidan (Naeem *et al.*, 2020). Aplikasi 0,5 mg/L asam salisilat pada kultur kalus *Stevia rebaudiana* di media padat menunjukkan kandungan stevioside tertinggi (35 mg/g BK), sedangkan pada konsentrasi 0,25 mg/L asam salisilat menunjukkan kandungan Reb A tertinggi (5,73 mg/g BK) (Golkar *et al.*, 2019). Kemudian, pemberian 50 μ M asam salisilat menunjukkan kandungan stevioside tertinggi (19,4 mg/g BK) pada eksplan nodus stevia (Moharramnejad *et al.*, 2019).

Giberelin (GA_3) merupakan hormon yang berperan dalam mendorong elongasi sel, pertumbuhan tanaman, dan menstimulasi proses biologis tanaman. GA_3 juga berperan sebagai elisitor untuk memproduksi metabolit sekunder pada tingkat sel (Bakhtiari & Golkar, 2022). Sintesis giberelin dan steviol glikosida berada pada jalur

biosintesis yang sama yaitu pada jalur 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) dengan prekursor asam ent-kaurenoat (de Andrade *et al.*, 2024). Pada kultur kalus *Artemisia alba* dengan pemberian elisitor 2 mg/L giberelin menunjukkan peningkatan kandungan metabolit sekunder berupa santonin dan artemisinin tertinggi (Habib & Salim, 2022). Kemudian, aplikasi 2 mg/L GA₃ sebagai elisitor pada akar adventif *Stevia rebaudiana* meningkatkan aktivitas antioksidan (77.2%), kadar stevioside, rebaudioside A, dan dulkosida A tertinggi (Ahmad *et al.*, 2020).

Peningkatan metabolit sekunder stevia juga dapat dilakukan melalui penggunaan inhibitor giberelin, salah satunya adalah daminozide yang merupakan inhibitor potensial dalam pembentukan giberelin bioaktif dan aktivitas enzim 2-oksoglutarate-dependent dioxygenases (2OGDDs) yang terlibat pada penghambatan biosintesis giberelin di jalur hilir tanpa memengaruhi biosintesis steviol glikosida (Yoneda *et al.*, 2018). Daminozide terbukti menghambat konversi asam ent-kaurenoat menuju sintesis giberelin sehingga meningkatkan produksi steviol glikosida. Penggunaan 10 mg/L daminozide pada eksplan tunas *Stevia rebaudiana* dengan menggunakan bioreaktor TIS mampu meningkatkan biomassa dan kandungan steviol glikosida hingga 40% pada stevioside dan rebaudioside A (Saptari *et al.*, 2022). Selain itu, aplikasi 10 dan 20 mg/L daminozide mampu memodulasi produksi steviol glikosida pada *thin-layer liquid culture* stevia (Saptari *et al.*, 2020).

Penelitian mengenai induksi kalus dan efektivitas pemberian elisitor berupa asam salisilat, giberelin, dan daminozide pada kultur suspensi *Stevia rebaudiana* belum dilakukan. Berdasarkan latar belakang di atas, perlu dilakukan evaluasi untuk membandingkan pengaruh penambahan elisitor tersebut terhadap produksi metabolit

sekunder pada kultur kalus *Stevia rebaudiana*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, rumusan masalah dari penelitian ini yaitu:

1. Apakah perlakuan perbedaan jenis media dalam induksi kalus *Stevia rebaudiana* mempengaruhi pertumbuhan kalus *Stevia rebaudiana* secara *in vitro*?
2. Bagaimana pengaruh pemberian elisitor yang berbeda terhadap produksi metabolit sekunder pada kultur kalus *Stevia rebaudiana* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan perumusan masalah tersebut, maka tujuan penelitian ini yaitu:

1. Menganalisa pengaruh jenis media terhadap pertumbuhan kalus *Stevia rebaudiana* secara *in vitro*.
2. Menganalisa pengaruh pemberian elisitor yang berbeda terhadap produksi metabolit sekunder *Stevia rebaudiana* secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi ilmiah terkait penggunaan jenis media yang optimal untuk pertumbuhan kalus *Stevia rebaudiana*. Selain itu, penelitian ini juga memberikan wawasan mengenai profil dan komponen senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan pada kultur kalus melalui aplikasi elisitor pada *Stevia rebaudiana*. Penelitian ini diharapkan menjadi acuan dalam upaya meningkatkan produksi metabolit sekunder melalui metode kultur *in vitro* pada *Stevia rebaudiana*.

