

Evaluasi Pertumbuhan *Stevia rebaudiana* Bert. Tetraploid Secara *In Vitro* dan di Lapangan untuk Produksi Steviosida dan Rebaudiosida-A (Growth Evaluation of *Stevia rebaudiana* Bert. Tetraploid Cultured *In Vitro* and in the Field for Production of Stevioside and Rebaudioside-A)

Rifatul Adabiyah^{1*}, Diah Ratnadewi² & Tri Muji Ermayanti³

¹Program Studi Biologi Tumbuhan, Departemen Biologi, FMIPA-IPB University, Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat 16680

²Departemen Biologi-FMIPA-IPB University, Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat 16680

³Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Jalan Raya Bogor Km 46 Cibinong, 16911

*Email: rifatuladabiyah@yahoo.co.id

Memasukkan: Mei 2019, Diterima: Juli 2019

ABSTRACT

Genetic improvement through tetraploid induction of *Stevia rebaudiana* is important in order to increase the sweetener content, steviol glycoside. Tetraploid plants of several species after induction with colchicine and oryzalin have higher growth and secondary metabolite contents compared to the diploid plants. This study was aimed to evaluate growth as well as their stevioside and Reb-A content of *S. rebaudiana* tetraploid and diploid (control) plants cultured *in vitro* and grown in the field after acclimation process. This study used 3 tetraploid clones, namely B60.3H8, P1T22, P3T5, and 1 diploid clone as control. Shoot tips were cultured on MS medium without addition of plant growth regulators for 6 weeks, then they were acclimated in a greenhouse, followed by planting them in the field. Growth of shoot culture, plantlets in the greenhouse and plants in the field were observed. Analysis of stevioside and Reb-A was done by HPLC. The results showed that plantlets of diploid clone had higher *in vitro* growth and survival rate in the greenhouse than that of tetraploids. Tetraploid clone P1T22 had similar growth as diploid plants, but higher than the growth of tetraploid B60.3H8 and P3T5. Fresh and dry weights of B60.3H8 was similar with diploid plants, but higher than P1T22 and P3T5 tetraploid clones. The highest level of stevioside and Rebaudiosida-A was found in tetraploid B60.3H8 clone, the lowest was found in the diploid plants. The highest ratio of stevioside : Reb-A was found at B60.3H8 tetraploid clone.

Keywords: *Stevia rebaudiana*, *in vitro*, field, growth, Stevioside, Rebaudioside-A, tetraploid

ABSTRAK

Perbaikan genetik melalui induksi tanaman tetraploid pada *Stevia rebaudiana* perlu dilakukan untuk meningkatkan kadar bahan pemanis alami glikosida steviol. Tanaman tetraploid hasil induksi dengan kolkisin maupun orizalin pada beberapa spesies mempunyai pertumbuhan dan kadar metabolit sekunder lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman diploidnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pertumbuhan *Stevia rebaudiana* tetraploid dan diploid (kontrol) secara *in vitro* dan di lapang, serta mengetahui kadar steviosida dan rebaudiosida-A (Reb-A) dari tanaman yang ditumbuhkan di lapang setelah aklimatisasi. Penelitian menggunakan 3 klon tanaman tetraploid yaitu B60.3H8, P1T22, P3T5, dan 1 klon diploid sebagai kontrol. Tunas pucuk ditanam pada media MS tanpa penambahan zat pengatur tumbuh selama 6 minggu, kemudian diaklimatisasi di rumah kaca, untuk selanjutnya ditanam di lapang. Pertumbuhan kultur tunas, planlet di rumah kaca dan tanaman di lapang diamati. Analisis kadar steviosida dan Reb-A dilakukan dengan HPLC. Hasil penelitian menunjukkan bahwa klon kontrol diploid memiliki pertumbuhan tunas *in vitro* dan daya tumbuh pada tahap aklimatisasi di rumah kaca lebih tinggi dibandingkan dengan ketiga klon tetraploid. Klon P1T22 tetraploid memiliki pertumbuhan serupa dengan klon diploid lebih tinggi dibandingkan dengan 2 klon tetraploid lainnya yaitu B60.3H8 dan P3T5. Akan tetapi bobot basah dan bobot kering klon B60.3H8 serupa dengan klon kontrol diploid lebih tinggi dibandingkan dengan klon P1T22 dan P3T5 tetraploid. Kadar steviosida dan reb-A tertinggi terdapat pada klon B60.3H8 tetraploid dan terendah terdapat pada klon diploid. Rasio kadar steviosida : Reb-A tertinggi terdapat pada klon tetraploid P1T22 sedikit lebih tinggi dengan klon B60.3H8.

Kata Kunci: *Stevia rebaudiana*, *in vitro*, lapang, pertumbuhan, Steviosida, Rebaudiosida-A, tetraploid

PENDAHULUAN

Stevia rebaudiana Bert. merupakan tanaman yang berasal dari Paraguay dan telah dibudidayakan sejak lama di berbagai negara untuk

produksi senyawa metabolit sekunder golongan glikosida steviol yang bermanfaat sebagai pemanis alami (Geuns 2003; Luwanska *et al.* 2015; Chiew *et al.* 2016). Rasa manis pada daun *Stevia* mencapai 70-400 kali lebih tinggi

dibandingkan dengan gula tebu (Raini & Isnawati 2011; Yadav *et al.* 2011 dan 2013). Senyawa golongan glikosida steviol yang terdapat pada tanaman *Stevia* diantaranya steviosida, rebaudiosida (A, B, C, D, E, F, M dan N), steviolbiosida rubusosida, dan dulkosida (A-B) (Geuns 2003; Abou-Arab *et al.* 2010, Yadav *et al.* 2011, Wang *et al.* 2013, Brower *et al.* 2014).

Brandle & Telmer (2007) dan Madan *et al.* (2010) melaporkan bahwa tanaman *Stevia* mengandung sedikitnya delapan jenis senyawa glikosida steviol. Akan tetapi saat ini telah berhasil diidentifikasi lebih dari 30 senyawa glikosida steviol terkandung pada tanaman *Stevia* (FAO JECFA Monographs 10, 2010; FAO JECFA Monographs 2017). Empat senyawa utama yang dihasilkan pada tanaman *Stevia* yaitu steviosida, rebaudiosida-A (Reb-A), rebaudiosida-C (Reb-C dan dulkosida-A (Yadav *et al.* 2011). Kadar steviosida ditemukan paling banyak yaitu 4-13% (Brandle *et al.* 1998; Yadav *et al.* 2011), dan Reb-A sebanyak 2-4% berdasarkan bobot kering tanaman (Yadav *et al.* 2011).

Sejak glikosida steviol resmi disetujui sebagai bahan tambahan pangan pada pertemuan *International Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* ke 73 tahun 2010 dan pada pertemuan ke 84 tahun 2017 (FAO JECFA Monographs 10 2010; FAO JECFA Monographs 20 2017), juga secara resmi glikosida steviol diterima sebagai bahan tambahan pangan di Eropa (*European Commission Regulation* (EU) No 1131/2011 of 11 November 2011), maka perkembangan industri bahan baku berbasis senyawa glikosida dari tanaman *Stevia* meningkat tajam. Perkembangan penelitian tentang *Stevia* juga banyak dilakukan untuk mendapatkan genotipe tanaman dengan kandungan metabolit glikosida steviol lebih tinggi dari tanaman liarnya (Libik-Konieczny *et al.* 2018), penelitian makin banyak dilakukan terutama sejak diketahui bahwa selain senyawa glikosida steviol, *Stevia* juga mengandung senyawa fenolik dan vitamin C tinggi sehingga bermanfaat juga sebagai antioksidan dan antikanker (Koubaa *et al.* 2015). Saat ini berbagai industri minuman dan pangan (Prakash *et al.* 2014; Koubaa *et al.* 2015) telah banyak menggunakan bahan pemanis dari *Stevia* karena glikosida steviol sudah berstatus GRAS

(*Generally Recognized as Safe*) di USA (Allen *et al.* 2013).

Kadar metabolit sekunder glikosida steviol pada *Stevia* dipengaruhi oleh banyak faktor antara lain genotipe tanaman dan lingkungan tumbuhnya (Allen *et al.* 2013). Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mendapatkan genotipe *Stevia* yang mengandung glikosida steviol tinggi antara lain dengan memperbaiki teknik budidaya (pemupukan, sistem irigasi, jarak tanam dan waktu tanam) (Madan *et al.* 2010; Lemus-Mondaca *et al.* 2012; Allen *et al.* 2013), pemuliaan konvensional dengan persilangan, seleksi kadar metabolit sekunder tinggi (Yadav *et al.* 2011; Libik-Konieczny *et al.* 2018), dan mutagenesis dengan iradiasi sinar Gamma (Brower *et al.* 2014; Chiew *et al.* 2016). Berbagai penelitian tentang mikropropagasi telah banyak dilakukan dengan optimasi media dan berbagai teknik kultur jaringan untuk mendapatkan bibit yang berkualitas (Madan *et al.* 2010; Yadav *et al.* 2011).

Upaya lainnya untuk mendapatkan genotipe unggul adalah melalui teknik poliploidisasi. Tanaman *Stevia* yang tumbuh liar di alam pada umumnya adalah tanaman diploid dengan jumlah kromosom $2x=2n=22$ (Yadav *et al.* 2011). Beberapa penelitian poliploidisasi menggunakan kolkisin pada *Stevia* secara *ex vitro* dengan perendaman biji telah dilaporkan oleh Yadav *et al.* (2011 dan 2013), penelitian serupa juga dilakukan oleh Rameshing *et al.* (2015) dan Zhang *et al.* (2018). Tanaman triploid dan tetraploid yang dihasilkan dengan menggunakan kolkisin menunjukkan bahwa terdapat variasi morfologi dan kadar glikosida yang sangat tinggi sehingga seleksi individu tanaman perlu dilakukan. Kolkisin juga diaplikasikan pada tunas samping tanaman *Stevia* di rumah kaca oleh Mahdi *et al.* (2018). Tingkat ploidi tanaman dikonfirmasi dengan menggunakan flositometer setelah diberi perlakuan kolkisin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanaman tetraploid mempunyai kadar steviosida bervariasi dan lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman kontrol diploid. Pengukuran kadar Reb-A maupun senyawa glikosida steviol lainnya tidak dilakukan (Mahdi *et al.* 2018).

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pertumbuhan *S. rebaudiana* tetraploid dan diploid

(kontrol) secara *in vitro* dan di lapang, serta mengetahui kadar steviosida dan rebaudiosida-A (Reb-A) dari tanaman yang ditumbuhkan di lapang setelah aklimatisasi. Tanaman *Stevia* tetraploid yang dipergunakan dalam penelitian ini tidak hanya hasil induksi kolkisin tetapi juga hasil induksi orizalin.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian menggunakan satu klon kultur tunas *S. rebaudiana* diploid (kontrol), dan tiga klon tetraploid yaitu klon B60.3H8, PIT22, P3T5 koleksi Laboratorium Biak Sel dan Jaringan Tanaman, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Cibinong. Kultur tunas berasal dari tanaman klon liar milik PT. Tapanuli Investasi Agro. Klon B60.3H8 merupakan klon tetraploid hasil induksi orizalin 60 mM dengan lama perendaman 3 hari, klon PIT22 adalah tanaman tetraploid hasil induksi kolkisin 0,1% dengan lama perendaman 24 jam, sedangkan klon P3T5 adalah hasil induksi kolkisin 0,1% dengan lama perendaman 72 jam.

Perbanyak tunas *Stevia* dilakukan secara *in vitro* pada media MS (Murashige & Skoog 1962) tanpa penambahan zat pengatur tumbuh (MS0). Tunas pucuk dari kultur berumur 4-6 minggu dipotong sepanjang 1,5-2,0 cm ditanam pada media MS0 yang mengandung 30 g/l gula dan dipadatkan dengan agar sebanyak 8 g/l. Setelah pH diatur menjadi 5,8, media disterilisasi dengan menggunakan otoklaf pada suhu 120 °C, tekanan 1 atm selama 20 menit. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 12 ulangan. Kultur diinkubasi di dalam ruang inkubasi dengan suhu 25±2°C dengan penyinaran secara kontinyu. Pengamatan pertumbuhan meliputi pengukuran tinggi tunas, jumlah daun, jumlah buku, jumlah tunas lateral, dan jumlah akar, dilakukan setiap minggu hingga kultur berumur 6 minggu setelah tanam (MST). Morfologi daun juga diamati sebelum planlet diaklimatisasi.

Aklimatisasi dilakukan pada saat tanaman berumur 6 MST. Planlet dikeluarkan dari botol kultur, kemudian akar dicuci dengan air hingga bersih. Selanjutnya akar dioles dengan perangsang pertumbuhan akar (*Root up*) yang telah diencerkan dengan air hingga berbentuk pasta. Setelah diolesi,

planlet *Stevia* ditanam pada *polibag* berisi media campuran tanah, kompos dan sekam bakar dengan perbandingan 3:2:1. *Polibag* disungkup dengan plastik ditempatkan di dalam rumah kaca. Pengamatan pertumbuhan dilakukan pada umur 5 MST, meliputi pencatatan tinggi tanaman dan jumlah daun.

Tanaman hasil aklimatisasi kemudian diperbanyak dengan stek pucuk digunakan sebagai bahan tanam di lapang. Aklimatisasi dan penanaman di lapang dilakukan di Kebun Raya Cibodas. Persiapan penanaman dilakukan dengan cara mengolah lahan kemudian dibuat bedengan dengan ukuran tinggi 15-20 cm, lebar 50-60 cm dan panjang 1-5 m menyesuaikan bentuk lahan. Setiap 1 m bedengan, tanah dicampur dengan kompos sebanyak 25 kg. Bedengan ditutup dengan mulsa plastik. Bibit hasil aklimatisasi ditanam dengan jarak tanam 25 x 25 cm. Penanaman di lapang menggunakan sebanyak 30 tanaman untuk masing-masing klon.

Parameter pertumbuhan tanaman yang diamati meliputi tinggi tanaman, jumlah daun, jumlah cabang, bobot basah, dan bobot kering, pengamatan pertumbuhan dilakukan terhadap 30 tanaman setiap 1 minggu sekali selama 8-10 minggu hingga fase vegetatif akhir. Tinggi tanaman diukur dengan menggunakan mistar, dimulai dari pangkal batang sampai ujung tunas tertinggi. Jumlah cabang dan jumlah daun dihitung secara keseluruhan. Bobot basah dan kering diambil dari tanaman *Stevia* yang dipanen saat berumur 8-10 MST juga menjelang fase vegetatif berakhir. Performa tanaman dan morfologi daun juga diamati sebelum tanaman dipanen. Tanaman dipanen dari lapang dengan dicabut lalu dipisahkan bagian akar, batang dan daunnya, kemudian ditimbang untuk memperoleh bobot basah. Sampel tanaman kemudian dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 65° C selama 2-3 hari atau setelah mencapai berat kering konstan. Sampel ditimbang untuk mendapatkan bobot kering tanaman. Semua data kuantitatif dianalisis menggunakan analisis ragam, *Analysis of Variance* (ANOVA) dan apabila berbeda nyata dilanjutkan dengan uji Duncan, *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT).).

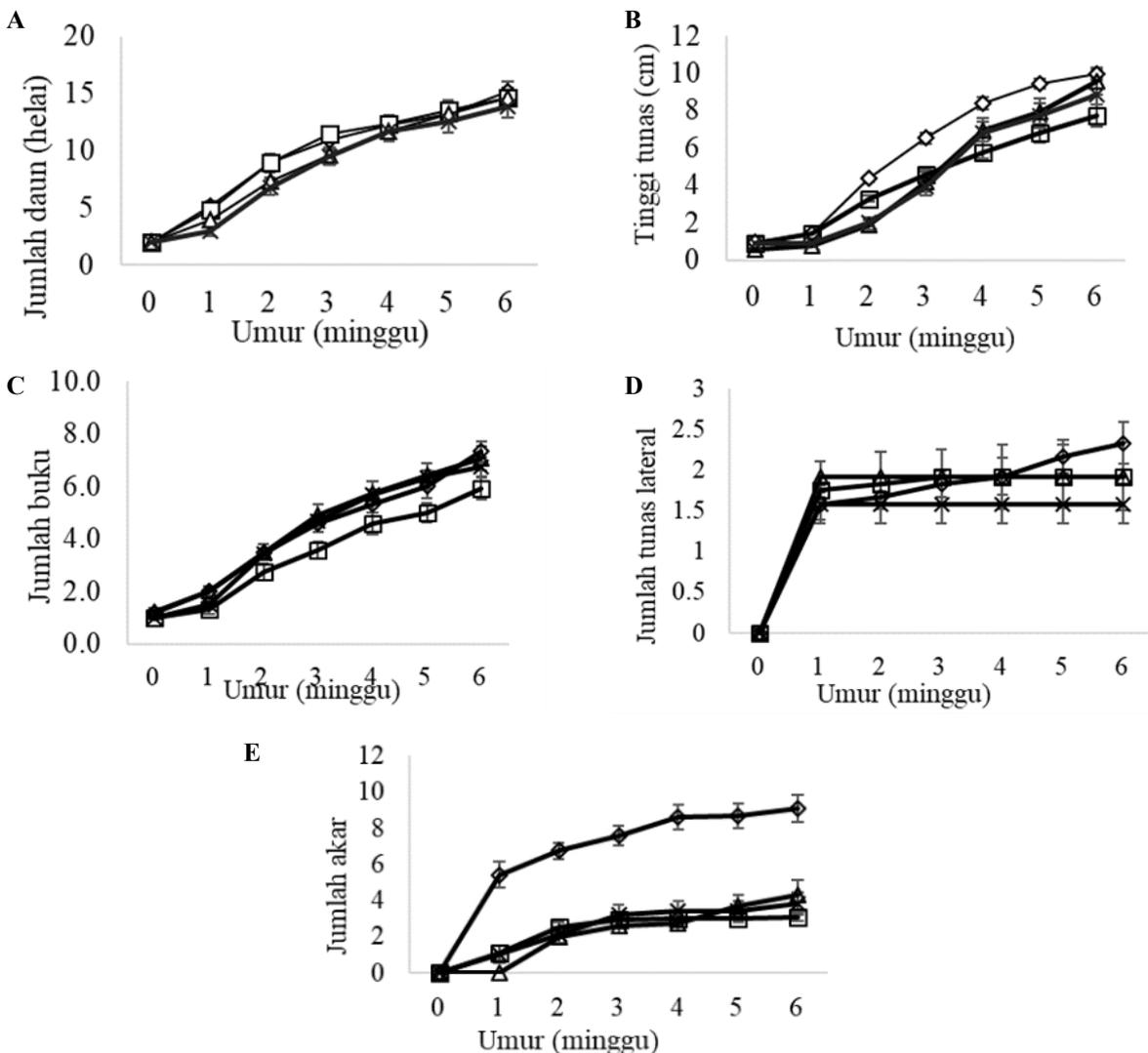
Analisis kadar steviosida dan rebaudiosida-A dilakukan menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) menurut

metode Martono *et al.* (2016). Sebanyak 0,50 g bubuk kering daun *Stevia* dilarutkan dalam 25 ml etanol 60%. Larutan kemudian diekstraksi pada suhu 40°C selama 15 menit. Kemudian disaring menggunakan kertas saring sehingga dihasilkan residu dan filtrat secara terpisah. Residu diekstraksi kembali dengan 25 ml etanol 60%. Tahapan ini diulang hingga 3 kali dan filtrat dikumpulkan dalam labu takar 100 ml. Kemudian filtrat ditera hingga mencapai 100 ml dengan menambahkan etanol 60%. Campuran larutan disaring menggunakan saringan *millipore* 0,45 µm sebelum diinjeksikan ke HPLC. Analisis HPLC dilakukan menggunakan kolom fase stasioner Eurosphere C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm). Perbandingan fase gerak: air-metanol (90:10,

diatur pH 3 dengan asam fosfat encer): asetonitril: TFA dengan perbandingan 65:35:0.01 (v/v/v). Suhu kolom adalah 30°C, dengan kecepatan alir 0,6 mL/menit. Detektor yang digunakan adalah detektor UV (UV *Smartline, Knauer, gmbh*) panjang gelombang 210 nm. Sampel sebanyak 20 µL diinjeksikan menggunakan injektor *Rheodyne 7226i* (Martono *et al.* 2016).

HASIL

Pertumbuhan tunas *in vitro* dapat dilihat pada Gambar 1. Semua klon *Stevia* baik klon kontrol diploid dan ketiga klon tetraploid yaitu klon tetraploid B60.3H8, P1T22 dan P3T5 mengalami



Gambar 1. Pertumbuhan tunas *in vitro* *S. rebaudiana* klon kontrol diploid dan tiga klon tetraploid pada umur 1-6 minggu setelah tanam (MST). A. tinggi tunas, B. jumlah daun, C. jumlah buku, D. jumlah tunas lateral dan E. jumlah akar klon kontrol diploid. (♦); B60.3H8 tetraploid (■); P1T22 tetraploid (▲); dan P3T5 tetraploid (x).

pertambahan tinggi, kenaikan jumlah daun, jumlah buku, jumlah tunas lateral dan jumlah akar dari umur 1-6 MST. Klon diploid memiliki pertumbuhan tunas lebih tinggi dimulai pada minggu ke-2 MST dibandingkan dengan pertumbuhan tinggi tunas ketiga klon tetraploid (Gambar 1A). Pertumbuhan jumlah daun, jumlah buku dan jumlah tunas lateral dari ketiga klon tetraploid dan klon kontrol diploid mempunyai pola yang sama (Gambar 1B-D). Pertumbuhan jumlah daun dan jumlah buku pada semua klon hampir sama dimulai pada umur 0 hingga 6 MST. Pertumbuhan klon B60.3H8 tetraploid sedikit lebih lambat dibandingkan dengan ketiga klon lainnya (Gambar 1B dan C). Pertumbuhan tunas lateral dimulai pada umur 1 MST, namun setelahnya tidak banyak mengalami peningkatan. Hanya klon kontrol diploid sedikit mengalami peningkatan mulai umur 5 MST (Gambar 1D).

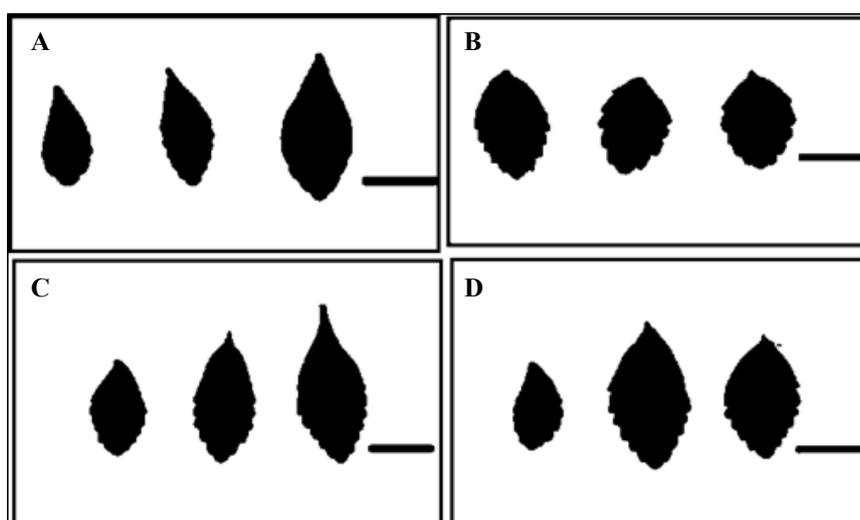
Pertumbuhan akar klon kontrol diploid jauh lebih cepat dibandingkan dengan ketiga klon tetraploid dimulai pada minggu ke-1 hingga ke-6 MST (Gambar 1E).

Pada umur 6 MST tinggi tunas klon diploid tidak berbeda nyata dengan klon P1T22 dan P3T5 tetraploid, namun lebih tinggi dibandingkan dengan klon tetraploid B60.3H8 (Tabel 1). Jumlah daun semua klon diploid dan tetraploid pada umur 6 MST tidak berbeda nyata. Jumlah buku klon kontrol diploid, klon P1T22 dan P3T5 tetraploid tidak berbeda nyata, namun berbeda nyata dengan klon tetraploid B60.3H8 yang mempunyai jumlah buku terkecil. Ketiga klon tetraploid mempunyai jumlah buku yang tidak berbeda nyata. Jumlah tunas lateral klon kontrol diploid tidak berbeda nyata dengan klon tetraploid B60.3H8 maupun P1T22, namun berbeda nyata dengan klon tetraploid P3T5 yang mempunyai jumlah tunas lateral terkecil. Ketiga

Tabel 1. Rerata pertumbuhan tunas *in vitro* *S. rebaudiana* umur 6 MST pada media MS tanpa zat pengatur tumbuh (MS0)

Klon	Tinggi Tunas (cm)	Jumlah Daun	Jumlah Buku	Tunas Lateral	Jumlah Akar
Kontrol diploid	9,98 ± 0,22 ^a	15,17 ± 0,79 ^a	7,33 ± 0,39 ^a	2,33 ± 0,26 ^a	9,08 ± 0,75 ^a
B60.3H8 tetraploid	7,75 ± 0,58 ^b	14,67 ± 0,86 ^a	5,92 ± 0,42 ^b	1,92 ± 0,42 ^{ab}	3,08 ± 0,23 ^b
P1T22 tetraploid	9,57 ± 0,75 ^{ab}	16,67 ± 0,99 ^a	7,08 ± 0,45 ^{ab}	1,92 ± 0,08 ^{ab}	4,33 ± 0,82 ^b
P3T5 tetraploid	8,86 ± 0,76 ^{ab}	13,92 ± 0,74 ^a	6,75 ± 0,35 ^{ab}	1,58 ± 0,23 ^b	3,83 ± 0,63 ^b

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata (Uji Duncan, P<0.05).



Gambar 2. Morfologi daun *S. rebaudiana* *in vitro* umur 6 MST. A. Klon kontrol diploid; B. Klon B60.3H8 tetraploid; C. Klon P1T22 tetraploid; D. Klon P3T5 tetraploid. Skala: 0.5 cm.

klon tetraploid mempunyai jumlah tunas lateral yang tidak berbeda nyata. Klon kontrol diploid mempunyai jumlah akar tertinggi dan berbeda nyata dengan ketiga klon tetraploid. Jumlah akar ketiga klon tetraploid tidak berbeda nyata (Tabel 1). Hasil pengamatan morfologi daun pada tunas *in vitro* pada umur 6 MST menunjukkan bahwa terdapat variasi bentuk daun antara klon kontrol diploid dengan klon tetraploid. Daun klon diploid memiliki bentuk tepi daun yang lebih halus dengan ujung dan pangkal daun lebih tumpul (Gambar 2A) dibandingkan dengan daun klon tetraploid. Bentuk tepi daun *Stevia* klon tetraploid lebih bergerigi (Gambar 2B-D).

Daya tumbuh planlet di rumah kaca pada tahap aklimatisasi disajikan pada Tabel 2. Keberhasilan tumbuh tertinggi terdapat pada klon kontrol diploid, sedangkan ketiga klon tetraploid memiliki tingkat keberhasilan hidup pada tahap aklimatisasi lebih rendah dibandingkan klon kontrol diploid. Pada umur 5 MST, penambahan tinggi tanaman dan jumlah daun klon P1T22 tetraploid berbeda nyata paling tinggi dibandingkan tanaman kontrol diploid maupun kedua klon tetraploid lainnya (Tabel 3).

Hasil pengamatan pertumbuhan tanaman di lapang menunjukkan bahwa seluruh klon

tanaman baik kontrol diploid maupun ketiga klon tetraploid bertambah tinggi setiap minggunya mulai dari umur 1-8 dan sampai 9 atau 10 MST (Gambar 3). Klon kontrol diploid memiliki kenaikan tinggi tanaman lebih besar dibandingkan dengan ketiga klon tetraploid, dengan pertumbuhan akhir vegetatif yang berbeda-beda antar klon. Klon P1T22 tetraploid dan klon P3T5 tetraploid mengalami kenaikan tinggi tanaman hingga fase vegetatif yaitu pada akhir pada umur 8 MST, klon kontrol diploid mencapai fase vegetatif akhir pada umur 9 MST sedangkan klon B60.3H8 tetraploid berhenti pada umur 10 MST (Gambar 3A) setelah itu tanaman mulai berbunga.

Jumlah daun *Stevia* baik klon kontrol diploid maupun klon tetraploid mengalami kenaikan jumlah daun setiap minggunya hingga umur 10 MST (Gambar 3B). Klon kontrol diploid memiliki pola pertumbuhan jumlah daun lebih tinggi dibandingkan dengan ketiga klon tetraploid. Grafik jumlah cabang menunjukkan bahwa, cabang tanaman mulai tumbuh pada umur 1 MST kemudian mengalami kenaikan jumlah setiap minggunya hingga umur 10 MST (Gambar 3C).

Pertumbuhan tanaman *Stevia* pada umur 8 MST disajikan pada Tabel 4. Klon kontrol diploid memiliki tinggi tanaman tidak berbeda nyata dengan klon P1T22 tetraploid dan klon P3T5 tetraploid. Tanaman terendah terdapat pada klon B60.3H8 tetraploid. Pada umur 8 MST, klon P1T22 tetraploid memiliki jumlah daun paling banyak, berbeda nyata dengan dua klon tetraploid lainnya. Jumlah daun terkecil terdapat pada klon B60.3H8 tetraploid. Jumlah cabang tanaman umur 8 MST pada klon kontrol

Tabel 2. Daya tumbuh planlet *S. rebaudiana* tahap aklimatisasi di rumah kaca

Klon	Daya Tumbuh (%)
Kontrol Diploid	92,86
B60.3H8 Tetraploid	82,20
P1T22 Tetraploid	85,72
P3T5 Tetraploid	73,16

Tabel 3. Rerata pertambahan tinggi planlet dan pertambahan jumlah daun *S. rebaudiana* tahap aklimatisasi umur 5 MST di rumah kaca

Klon	Pertambahan Tinggi Planlet (cm)	Jumlah Daun
Kontrol diploid	2,70 ± 0,27 ^c	3,20 ± 0,93 ^b
B60.3H8 tetraploid	2,80 ± 0,22 ^c	4,90 ± 1,26 ^b
P1T22 tetraploid	4,93 ± 0,35 ^a	8,00 ± 1,04 ^a
P3T5 tetraploid	3,27 ± 0,17 ^b	4,80 ± 0,97 ^b

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata (Uji Duncan, P<0.05)

diploid tidak berbeda nyata dengan klon P1T22 tetraploid, namun lebih tinggi sehingga berbeda nyata dengan klon P3T5 tetraploid dan B60.3H8 tetraploid (Tabel 4).

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa tanaman *Stevia* klon kontrol diploid dan ketiga klon tetraploid memiliki performa sama yaitu berbentuk semak, berukuran pendek dengan tinggi tanaman kurang dari 1 m, memiliki percabangan banyak pada batang utamanya serta daun lebat. Klon kontrol diploid memiliki tinggi tanaman rata-rata 42 cm (Gambar 4A), Klon B60.3H8 tetraploid memiliki tinggi tanaman rata-rata 41 cm (Gambar 4B), klon P1T22 tetraploid memiliki tinggi tanaman rata-rata 39 cm (Gambar 4C), serta klon P3T5 tetraploid memiliki tinggi tanaman rata-rata 36

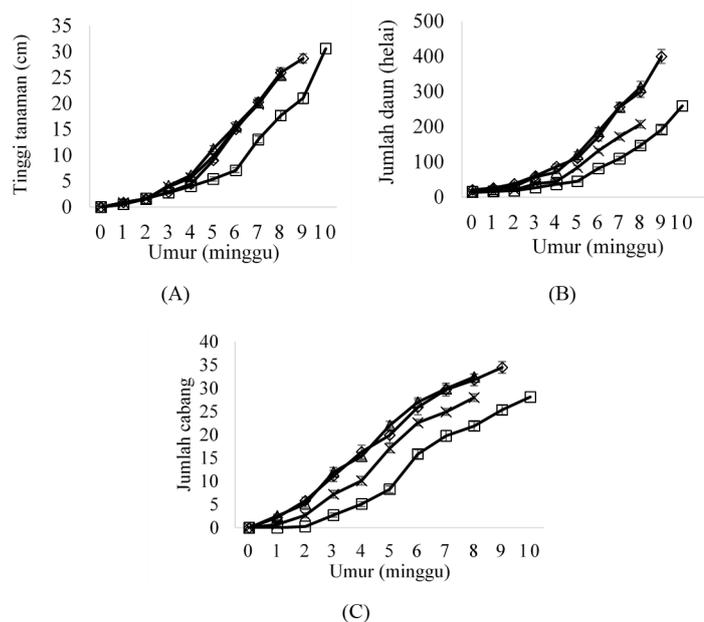
cm (Gambar 4D). Daun *Stevia* klon kontrol diploid dan ketiga klon tetraploid memiliki tipe dan bentuk daun sama disebut sudip (*spatulate*), yaitu termasuk tipe tunggal dengan tangkai daun melekat langsung pada batang dan tersusun berpasangan secara berhadapan bersilangan (*folium opposita*) di sepanjang batang utama (Gambar 5A-D).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa bobot basah akar *Stevia* klon B60.3H8 tetraploid pada akhir fase vegetatif tertinggi, berbeda nyata dengan klon P1T22 tetraploid, klon P3T5 tetraploid dan klon kontrol diploid (Tabel 5). Bobot basah batang terbesar terdapat pada klon kontrol diploid dan klon B60.3H8 tetraploid, tidak berbeda nyata dengan klon P1T22 tetraploid, namun berbeda nyata dengan klon

Tabel 4. Rerata pertambahan tinggi, jumlah daun dan jumlah cabang *S. rebaudiana* umur 8 MST di lapang

Klon	Pertambahan Tinggi (cm)	Jumlah Daun (helai)	Jumlah Cabang
Kontrol diploid	25,97 ± 0,95 ^a	298,94 ± 15,64 ^{ab}	31,80 ± 1,25 ^a
B60.3H8 tetraploid	17,65 ± 0,94 ^b	146,59 ± 7,60 ^c	21,85 ± 0,97 ^b
P1T22 tetraploid	25,45 ± 0,86 ^a	312,32 ± 16,49 ^a	32,42 ± 0,62 ^a
P3T5 tetraploid	25,68 ± 0,88 ^a	207,30 ± 10,28 ^b	28,00 ± 0,81 ^b

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata (Uji Duncan, P≤0.05)



Gambar 3. Rerata pertumbuhan tanaman *S. rebaudiana* di lapang umur 0 hingga 8 (klon P1T22 dan P3T5), 9 (kontrol) atau 10 MST (B60.3H8). A. Tinggi tanaman, B. Jumlah daun, C. Jumlah cabang klon kontrol diploid. (◆); B60.3H8 Tetraploid (■); P1T22 Tetraploid (▲); dan P3T5 Tetraploid (x).

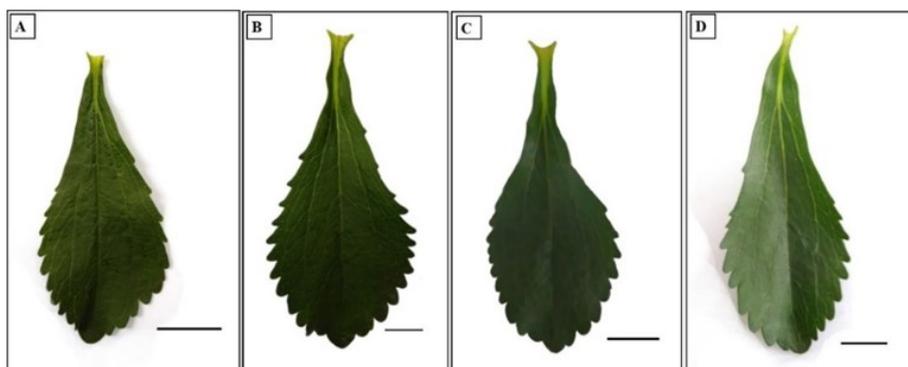
P3T5 tetraploid. Klon P3T5 tetraploid memiliki bobot basah batang terkecil. Bobot basah daun tertinggi terdapat pada klon P1T22 tetraploid tidak berbeda nyata dengan klon B60.3H8 tetraploid, namun berbeda nyata dengan klon

P3T5 tetraploid dan klon kontrol diploid. Bobot basah daun terkecil ada pada klon kontrol diploid (Tabel 5).

Pada umur 10 MST klon *Stevia* kontrol diploid dan klon B60.3H8 tetraploid memiliki



Gambar 4. Performa tanaman *S. rebaudiana* umur 8 MST di lapang. (A). kontrol diploid; (B). B60.3H8 Tetraploid; (C). P1T22 Tetraploid; (D). P3T5 Tetraploid.



Gambar 5. Bentuk daun *S. rebaudiana* umur 8 MST di lapang. A. Klon kontrol diploid; B. Klon B60.3H8 tetraploid; C. Klon P1T22 tetraploid; D. Klon P3T5 tetraploid. Skala: 1 cm.

Tabel 5. Rerata bobot basah akar, batang dan daun *S. rebaudiana* akhir fase vegetatif (umur 8-10 MST di lapang)

Klon	Akar (g)	Batang (g)	Daun (g)
Kontrol diploid	7,92 ± 0,52 ^b	17,00 ± 2,31 ^a	18,00 ± 2,13 ^c
B60.3H8 tetraploid	10,81 ± 0,62 ^a	17,06 ± 1,53 ^a	22,96 ± 1,50 ^{ab}
P1T22 tetraploid	8,96 ± 0,60 ^b	15,11 ± 0,85 ^{ab}	23,92 ± 1,31 ^a
P3T5 tetraploid	7,70 ± 0,59 ^b	12,81 ± 0,91 ^b	18,94 ± 1,32 ^{bc}

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata (Uji Duncan, $P \leq 0.05$)

Tabel 6. Rerata bobot kering akar, batang dan daun *S. rebaudiana* akhir fase vegetatif (umur 8-10 MST di lapang)

Klon	Akar (g)	Batang (g)	Daun (g)
Kontrol diploid	2,94 ± 0,16 ^a	4,13 ± 0,58 ^a	4,05 ± 0,56 ^{ab}
B60.3H8 tetraploid	2,57 ± 0,13 ^a	3,89 ± 0,52 ^a	4,35 ± 0,31 ^a
P1T22 tetraploid	2,12 ± 0,13 ^b	2,65 ± 0,16 ^b	4,18 ± 0,21 ^{ab}
P3T5 tetraploid	1,68 ± 0,10 ^c	2,26 ± 0,16 ^b	3,15 ± 0,18 ^b

bobot kering akar tertinggi, berbeda nyata dengan klon P1T22 tetraploid dan klon P3T5 tetraploid. Klon P3T5 tetraploid memiliki bobot kering akar terkecil. Bobot kering batang tertinggi terdapat pada klon kontrol diploid dan klon B60.3H8, berbeda nyata dengan klon P1T22 tetraploid dan klon P3T5 tetraploid. Klon P3T5 tetraploid memiliki bobot kering batang terkecil. Bobot kering daun terbesar terdapat pada klon B60.3H8 tetraploid, tidak berbeda nyata dengan klon P1T22 tetraploid dan klon kontrol diploid namun berbeda nyata dengan klon P3T5 tetraploid. Klon P3T5 memiliki bobot kering daun terkecil (Tabel 6).

Hasil analisis kadar steviosida dan rebaudiosida-A yang diukur pada tanaman *Stevia* umur 8 MST tertera pada Tabel 7. Klon B60.3H8 tetraploid memiliki kadar steviosida dan rebaudiosida-A tertinggi. Kadar steviosida terkecil terdapat pada klon P1T22, sedangkan kadar rebaudiosida-A terkecil terdapat pada klon kontrol diploid. Rasio rebaudiosida-A terhadap steviosida terbesar terdapat pada klon tetraploid P1T22.

PEMBAHASAN

Stevia rebaudiana secara alami berkembang biak secara generatif melalui biji dan secara vegetatif melalui stek batang. Tanaman ini mempunyai viabilitas biji rendah dan menurun sangat cepat (Madan *et al.* 2010; Yadav *et al.* 2011; Lemus-Mondaca *et al.* 2012), sehingga produksi bibit biasa dilakukan dengan stek batang. Akan tetapi oleh karena tenaga kerja yang mahal, maka produksi massal melalui kultur jaringan merupakan cara yang banyak disarankan (Madan *et al.* 2010), selain untuk mempertahankan kualitas bibit yang dihasilkan, juga bibit dapat tersedia sepanjang tahun. Peningkatan kualitas bibit juga mudah dilakukan (Ermayanti *et al.* 2017). Dengan kultur jaringan, klon-klon induk superior dapat

dikonservasi dalam jangka waktu sangat lama. Dengan demikian upaya mendapatkan tanaman berkadar metabolit sekunder tinggi pada *Stevia* dengan poliploidisasi secara *in vitro* merupakan salah satu strategi yang tepat untuk produksi bibit dari tanaman induk unggul. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aklimatisasi tanaman diploid dan tetraploid menghasilkan prosentase daya hidup planlet yang cukup tinggi (Tabel 2), oleh karena itu kultur jaringan dapat diaplikasikan untuk produksi bibit tanaman diploid maupun tetraploid dengan baik.

Senyawa antimitotik orizalin maupun kolkisin merupakan senyawa yang biasa dipergunakan untuk memperoleh tanaman poliploid (Salma *et al.* 2017). Pada tanaman *Passiflora edulis* (Rego *et al.* 2011), dan talas (Wulansari *et al.* 2016; Ermayanti *et al.* 2018) senyawa kolkisin dan orizalin memiliki efektifitas yang sama dalam menghasilkan tanaman poliploid. Hasil penelitian pada *Stevia* menunjukkan bahwa tanaman tetraploid hasil induksi kolkisin maupun orizalin juga mempunyai pertumbuhan baik secara *in vitro* (Gambar 1) maupun di lapangan (Gambar 3) serta mempunyai kandungan metabolit sekunder yang sebanding (Tabel 7). Oleh karena itu kedua senyawa antimitotik ini dapat diaplikasikan untuk *Stevia*. Penggunaan orizalin lebih menguntungkan karena senyawa ini mempunyai sifat kurang beracun (Miguel & Leonhardt 2011) dan efektif pada konsentrasi rendah (Sattler *et al.* 2016) dibandingkan dengan kolkisin.

Pertumbuhan tanaman diukur setiap minggu hingga akhir fase vegetatif. Pengukuran pertumbuhan dan biomassa dihentikan menjelang tanaman berbunga. Gambar 3 menunjukkan bahwa akhir masa vegetatif klon tetraploid P1T22 dan P3T5 adalah pada umur 8 MST, klon diploid adalah 9 MST, sedangkan klon tetraploid B60.3H8 adalah 10 MST. Hal ini menunjukkan bahwa genotipe tanaman *Stevia* klon diploid

Tabel 7. Rerata kadar steviosida dan rebaudiosida-A *S. rebaudiana* umur 8 MST di lapang

Klon	Steviosida (%)	Rebaudiosida-A (%)	Rasio Reb-A: Steviosida
Kontrol diploid	9,149	5,232	0,57
B60.3H8 tetraploid	10,525	6,640	0,63
P1T22 tetraploid	8,705	6,003	0,69
P3T5 tetraploid	9,924	5,666	0,57

maupun tetraploid mempunyai waktu bervariasi dalam mencapai masa pembungaan (masa generatif). Masa vegetatif yang pendek pada tanaman *Stevia* menguntungkan karena kadar senyawa glikosida steviol mencapai maksimum pada saat tanaman menjelang pembungaan, dan kadarnya meningkat apabila ditanam pada musim-musim dengan periode siang yang panjang (Madan *et al.* 2010). Namun demikian perolehan biomassa tanaman (terutama daun) yang maksimum juga sangat penting untuk mendapatkan total produksi senyawa metabolit sekunder paling tinggi. Oleh karena itu hasil penelitian menunjukkan bahwa klon tetraploid P1T22 adalah klon paling baik dibandingkan dengan kedua klon tetraploid lainnya dan kontrol diploid. Hal ini didukung juga dengan kandungan metabolit sekundernya yang tinggi (Tabel 7).

Stevia mengandung dua senyawa metabolit sekunder dengan kadar tinggi yaitu steviosida dan Reb-A. Pengembangan genotipe tanaman *Stevia* untuk mendapatkan kadar dengan rasio Reb-A dibandingkan dengan steviosida tinggi sangat diperlukan untuk menekan rasa pahit yang dihasilkan oleh steviosida setelah dikonsumsi (Madan *et al.* 2010). Selain itu kadar Reb-A tinggi sangat menguntungkan karena mempunyai rasa manis lebih tinggi dibandingkan dengan steviosida (Allen *et al.* 2013). Hasil penelitian pada Tabel 7 menunjukkan bahwa rasio Reb-A : steviosida pada tanaman tetraploid B60.3H8 dan P1T22 lebih tinggi dibandingkan dengan klon tetraploid P3T5 dan kontrol diploid. Klon B60.3H8 mempunyai kadar Reb-A tertinggi. Dengan demikian kedua klon tetraploid B60.3H8 dan P1T22 berpotensi dikembangkan lebih lanjut untuk produksi Reb-A tinggi. Selanjutnya kedua klon ini perlu diuji secara agronomi pada beberapa musim tanam untuk membuktikan bahwa pertumbuhan dan kadar metabolit sekunder yang dikandungnya tetap stabil. Dengan demikian kedua klon ini secara ekonomi menguntungkan untuk skala industri. Teknik budidaya dan musim tanam perlu ditentukan dengan cermat karena kedua faktor ini juga mempengaruhi biomassa dan kadar glikosida steviol yang dikandungnya (Huber 2017).

Hasil penelitian analisis kadar steviosida dan Reb-A yang tertera pada Tabel 7 lebih tinggi dibandingkan dengan kadar jenis glikosida yang sama yang dihasilkan oleh Yadav *et al.* (2013) pada tanaman tetraploid hasil induksi dengan kolkisin yaitu dengan menghasilkan steviosida tertinggi adalah 7,45%, sedangkan kadar Reb-A adalah 2,84% dengan rasio Reb-A: steviosida tertinggi adalah 0,51. Hal ini menunjukkan bahwa poliploidisasi dapat meningkatkan kadar metabolit sekunder namun dengan konsentrasi yang bervariasi. Kadar Reb-A dari *Stevia* pada Tabel 7 juga lebih tinggi dibandingkan dengan hasil penelitian Rameshing *et al.* (2015) pada tanaman tetraploid hasil diinduksi dengan kolkisin di lapangan. Kadar maksimum Reb-A adalah 5.90%, namun kadar steviosida yang diperoleh lebih tinggi yaitu mencapai maksimum 13.97%, dengan rasio Reb-A: steviosida tertinggi adalah 0.58 (Rameshing *et al.* 2015). Dengan demikian genotipe P1T22 pada penelitian ini lebih unggul dibandingkan dengan hasil penelitian Yadav *et al.* (2013) maupun Rameshing *et al.* (2015). Teknik ekstraksi senyawa glikosida juga berpengaruh terhadap total produk akhir yang dihasilkan. Pada tahapan proses ekstraksi sering terjadi kehilangan sejumlah bahan yang dianalisis sehingga kadarnya berkurang (Gardana *et al.* 2003; Puri *et al.* 2011; Koubaa *et al.* 2015). Dengan demikian perlu dicari teknik ekstraksi yang tepat untuk meminimalkan kehilangan produk selama proses ekstraksi dan pemurnian.

Klon tetraploid P1T22 dan B60.3H8 mempunyai pertumbuhan, biomassa daun dan mempunyai rasio Reb-A : steviosida tidak berbeda nyata. Oleh karena itu kedua klon tetraploid ini dapat dikembangkan lebih lanjut terutama untuk diketahui kadar Reb-D dan Reb-M yang dikandungnya. Senyawa Reb-D dan Reb-M ini sangat penting karena secara komersial saat ini produk yang mempunyai nilai ekonomi tinggi setelah Reb-A adalah glikosida steviol dengan kandungan Reb-D dan Reb-M tinggi. Senyawa Reb-D mempunyai kadar rasa manis sama dengan Reb-A namun mempunyai rasa pahit lebih rendah dibandingkan dengan Reb-A (Allen *et al.* 2013), sedangkan Reb-M mempunyai nilai ekonomi paling tinggi karena

mengandung rasa manis serupa Reb-A namun dengan rasa pahit lebih rendah dibandingkan dengan Reb-M (Prakash *et al.* 2014).

KESIMPULAN

Pertumbuhan *S. rebaudiana* secara *in vitro* klon tetraploid pada media MS tanpa zat pengatur tumbuh serupa dengan tanaman kontrol diploid kecuali pada pertumbuhan akar, tanaman diploid lebih banyak. Pertumbuhan dan biomassa yang dihasilkan tanaman di lapang pada klon diploid dan tetraploid juga tidak berbeda nyata. Kadar steviosida dan rebaudiosida-A tertinggi terdapat pada klon B60.3H8 tetraploid dengan rasio Reb-A: steviosida tertinggi terdapat pada klon tetraploid PIT22. Kedua klon tetraploid ini berpotensi untuk dikembangkan pada skala yang lebih besar.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada PT Tapanuli Investasi Agro yang telah memberi ijin penggunaan bahan tanaman untuk penelitian dan menyediakan dana untuk analisis HPLC. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Erwin Al Hafizh, M.Si., Suluh Normasiwi S.Si. yang telah memberi dukungan pada penelitian ini. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada kepala Balai Konservasi Kebun Raya Cibodas-LIPI yang telah memberikan ijin penggunaan rumah kaca dan akses ke lapang dan kepada Laboratorium Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Kristen Satya Wacana untuk analisis kimia. Penelitian ini merupakan bagian kegiatan kerjasama Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI dengan PT Tapanuli Investasi Agro Tahun 2018-2019.

DAFTAR PUSTAKA

Abou-Arab, E., A. Araband, & MF. Salem. 2010. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. *African Journal of Food Science*. 4: 269 - 281.

Allen, AL., JE. McGeary, & JE. Hayes. 2013. Rebaudioside A and Rebaudioside D

bitterness do not covary with Acesulfame K bitterness or polymorphisms in TAS2R9 and TAS2R31. *Chemosensory Perception*. 6(3):1-17.

Brandle, J., A. Starratt, & M. Gijzen. 1998. *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian Journal of Plants Sciences*. 78: 527-536.

Brandle, JE., & PG. Telmer. 2007. Steviol glycoside biosynthesis. *Journal of Phytochemistry*. 68:1855-1863.

Brower, RJ., TL. Carlson, B. Dang, MD. Gonzalez, MM. Kennedy, & NE. Knutson. 2014. *Stevia* plants with an increased rebaudioside D content. US. Patent Application. 14(774): 440.

Chiew, MS., KS. Lai, & Hussein. 2016. A review on induced mutagenesis of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Pertanika Journal of Scholarly Research Reviews*. 2(3):77-85.

Ermayanti, TM., AN. Wijayanta, & D. Ratnadewi. 2018. Induksi poliploidi pada tanaman Talas (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) kultivar Kaliurang dengan perlakuan kolkisin secara *in vitro*. *Jurnal Biologi Indonesia*. 14(1): 91-102.

Ermayanti, TM., DE. Rantau, E. Al Hafizh, & E. Maulana. 2017. Peningkatan pertumbuhan kultur tunas *Stevia rebaudiana* Bertoni pada media dengan peningkatan kadar vitamin dan glisin serta penggunaan jenis tutup tabung berbeda. *Jurnal Biologi Indonesia*. 13(2): 213 -222.

European Commission regulation (EU) No 1131/2011 of 11 November 2011. Brussels (BE): EU.

FAO JECFA Monographs 10. JECFA. 2010. Steviol glycosides. Compendium of Food Additive Specifications; 73th Meeting; Rome. FAO. 17-22.

FAO JECFA Monographs 20. JECFA. 2017. Steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni. Compendium of Food Additive Specifications; 84th Meeting; Rome. FAO. 50-69.

Gardana, C., P. Simonetti, E. Canzi, R. Zanchi, & P. Pietta. 2003. Metabolism of stevioside and rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* extracts by human microflora. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 51: 6618-6622.

Geuns, JMC. 2003. Stevioside. *Journal of*

- Phytochemistry*. 64: 913-921.
- Huber, BM. 2017. Study on Stevia (*Stevia rebaudiana*). Thesis for the Degree of Master of Science. Faculty of Horticultural Sciences, North Carolina State University. Pp. 129.
- Koubaa, M., E. Roselló-Soto, J. Šic Žlabur, A. Režek-Jambrak, M. Brnčić, N. Grimi, N. Boussetta, & FJ. Barba. 2015. Current and new insights in the sustainable and green recovery of nutritionally valuable compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 63: 6835–6846.
- Lemus-Mondaca, R., A. Vega-Gálvez, L. Zura-Bravo, & K. Ah-Hen. 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*. 132: 1121-1132.
- Libik-Konieczny, M., E. Capecka, E. Kakol, M. Dziurka, A. Grabowska-Joachimiak, E. Sliwinska, & L. Pistelli. 2018. Growth, development and steviol glycosides content in the relation to the photosynthetic activity of several *Stevia rebaudiana* Bertoni strains cultivated under temperate climate conditions. *Scientia Horticulturae*. 234: 10 – 18.
- Luwanska, A., P. Aleksandra, M. Grazyna, & W. Karolina. 2015. Application of *in vitro* stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) cultures in obtaining steviol glycoside rich material. *Journal of Herba Polonica*. 61(1): 50-63.
- Madan, S., S. Ahmad, GN. Singh, K. Kohli, Y. Kumar, R. Singh, & M. Garg. 2010. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni-A Review. *Indian Journal of Natural Product and Resources*. 1 (1): 267-286.
- Mahdi, SA., CM. Meena, & A. Tholakabavi. 2018. Induction of genetic variability by colchicine treatment in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Al-Qadisiyah Journal Pure Science*. 23(3): 161 – 173.
- Martono, Y., S. Riyanto, & S. Martono. 2016. Determination of Stevioside and Rebaudioside A from simulated Stevia beverages using FTIR spectroscopy in combination with multivariate calibration. *Journal of Medicinal Plants*. 10(5): 349-355.
- Miguel, TP., & KW. Leonhardt. 2011. *In vitro* polyploid induction of orchids using oryzalin. *Scientia Horticulturae*. 130: 314–319.
- Murashige, T., & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*. 15 (3): 473-497.
- Prakash, I., A. Markosyan, & C. Bunders. 2014. Development of next generation Stevia sweetener: Rebaudioside M. *Foods*. 3: 162-17.
- Puri, M., D. Sharma, & AK. Tiwari. 2011. Downstream processing of stevioside and its potential applications. *Biotechnology Advances*. 29: 781-791.
- Raini, M., & A. Isnawati. 2011. Kajian: Khasiat dan keamanan Stevia sebagai pemanis pengganti gula. *Media Litbang Kesehatan*. 21(4): 145.
- Rameshing, CN., SN., Hegde, MR. Wallalwar, & M. Vasundhara. 2015. Crop improvement in stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) trough colchicine. *Research Environmental of Life Sciences*. 8(2): 393-396.
- Rego, MM., ER. Rego, CH. Bruckner, FL. Finger, & WC. Otoni. 2011. *In vitro* induction of autotetraploids from diploid yellow passion fruit mediated by colchicine and oryzalin. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 107: 451– 459.
- Salma, U., S. Kundu, & N. Mandal. 2017. Artificial polyploidy in medicinal plants: Advancement in the last two decades and impending prospects. *Journal of Crop Science Biotechnology*. 20(1): 9-19.
- Sattler, MC., CR. Carvalho, & WR. Clarindo. 2016. The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*. 243: 281-296.
- Wang, Q. 2013. High Rebaudioside-A Plant and Methods of Producing The Same and Uses There of. US. Patent Application. 13(977): 1-6.
- Wulansari, A., AF. Martin, & TM. Ermayanti. 2016. Induksi tanaman poliploid talas (*Colocasia esculenta* L.) dengan perlakuan orizalin secara *in vitro*. *Jurnal Biologi Indonesia* 12 (2): 297-305.
- Yadav, AK., S. Singh, D. Dhyani, & PS. Ahuja. 2011. A review on the improvement of stevia (*Stevia rebaudiana* (Bertoni)). *Canadian Journal of Plant Sciences*. 91: 1-27.
- Yadav, AK., S. Singh, SC. Yadav, D. Dhyani, G. Bhardwaj, A. Sharma, & B. Singh. 2013. Induction and morphochemical

characterization of *Stevia rebaudiana* colchipooids *Indian Journal of Agricultural Sciences*. 83 (2): 159-165.

Zhang, H., S. An, J. Hu, Z. Lin, X. Liu, H. Bao, & R. Chen. 2018. Induction, identification and characterization of polyploidy in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Biotechnology*. 17(1227):1-6.

