

Amien, S. · D.N. Aji · T. Mamluatul

Multiplikasi cepat tunas tiga aksesori stevia secara *in vitro*

Abstrak. Stevia (*Stevia rebaudiana* (Bertoni)) telah menjadi pelengkap untuk memenuhi kebutuhan bahan pemanis yang terus meningkat di Indonesia. Jumlah varietas unggul Stevia di Indonesia masih terbatas. Keterbatasan ini perlu diimbangi dengan metode perbanyakan yang cepat. Multiplikasi tunas merupakan salah satu metode dalam kultur jaringan yang dapat dimanfaatkan untuk perbanyakan cepat bibit Stevia. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh respon aksesi-aksesi stevia terhadap multiplikasi tunas stevia pada komposisi media berbeda. Penelitian telah dilaksanakan dalam dua tahap percobaan. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial yang masing-masing terdiri atas dua faktor. Percobaan pertama terdiri dari dua faktor. Faktor pertama adalah tiga aksesi stevia yakni aksesi Bogor, Garut dan Tawangmangu dan faktor kedua adalah jenis sitokinin yakni tanpa sitokinin (kontrol), Zeatin, Kinetin, TDZ, 2-IP dan BA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aksesi Stevia Garut memberikan respon paling baik dalam multiplikasi tunas dan BA merupakan jenis sitokinin yang paling efektif untuk multiplikasi tunas pada media DKW. Konsentrasi BA 1 mgL⁻¹ merupakan konsentrasi paling efektif dalam multiplikasi tunas stevia. Jumlah tunas yang dihasilkan 7,45 tunas. Aksesi Tawangmangu menunjukkan respon paling baik untuk tinggi tunas dengan penambahan Zeatin 1,5 mg.L⁻¹ dengan tinggi tunas rata-rata 8,2 cm. Pertumbuhan akar terbaik diperoleh dari media DKW tanpa penambahan BA untuk aksesi Garut yaitu dengan rata-rata 10,52 akar.

Kata kunci: Stevia · Aksesi · Benzyl Adenin · Multiplikasi · In vitro

Rapid shoot multiplication of three stevia accession *in vitro*

Abstract. Stevia (*Stevia rebaudiana* (Bertoni)) has become a complement to the growing demand for sweeteners in Indonesia. The number of superior varieties of Stevia in Indonesia is still limited. This limitation needs to be solved with a fast propagation method. Shoot multiplication is a method in tissue culture that can be used for rapid propagation of Stevia seeds. This study aims to obtain the response of stevia accessions to the multiplication of stevia shoots at different media compositions. This research comprised two experiments arranged in completely randomized design with factorial pattern and two factors in each experiment. The first experiment, first factor was three accession of stevia, i.e. Bogor accession, Garut accession and Tawangmangu accession. The second factor was the use of cytokinins i.e. without cytokinins (control), Zeatin, Kinetin, TDZ, 2-IP and BA. The second experiment, second factor was concentration of Benzyl Adenine (BA) i.e. BA 0 mgL⁻¹ (control), BA 0.15 mg L⁻¹, BA 0.5 mgL⁻¹, BA 1 mgL⁻¹, BA 1.13 mgL⁻¹ and BA 1.5 mgL⁻¹. Each treatment was replied five times. The results showed that Stevia Garut accession gave the best response in shoot multiplication and BA was the most effective type of cytokinin for shoot multiplication on DKW media. The concentration of BA 1 mgL⁻¹ is the most effective concentration in the multiplication of stevia shoots. The number of shoots produced was 7.45 shoots. Tawangmangu accession showed the best response to shoot height with the addition of Zeatin 1.5 mg.L⁻¹ with an average shoot height of 8.2 cm. The best root growth was obtained from DKW media without the addition of BA for Garut accession with an average of 10.52 roots.

Keywords: Stevia · Accession · Benzyl Adenin · Multiplication · In vitro

Diterima : 17 September 2020, Disetujui : 25 Desember 2020, Dipublikasikan : 31 Desember 2020
doi: <https://doi.org/10.24198/kultivasi.v19i3.29468>

Amien, S.¹ · D.N. Aji¹ · T. Mamluatul²

¹)Departemen Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran,

²)Departemen Biologi, FMIPA, Universitas Padjadjaran,

Kontak korespondensi; suseno@unpad.ac.id

Pendahuluan

Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) merupakan sumber pemanis rendah kalori. Stevia telah menjadi pelengkap untuk memenuhi kebutuhan bahan pemanis yang terus meningkat di Indonesia. Sumber pemanis utama sampai saat ini berasal gula dari tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.). Badan Pusat Statistik (2020) mencatat persentase nilai impor gula Indonesia pada bulan Agustus 2020 terus naik dibandingkan dengan bulan-bulan sebelumnya. Oleh karena itu, pemanis dari tanaman Stevia berperan penting untuk melengkapi kebutuhan pemanis untuk keperluan sehari-hari maupun industri makanan dan minuman.

Keunggulan stevia antara lain mengandung senyawa glikosida dan antioksidan, tidak mengandung kalori, kadar kemanisannya mencapai 200-300 kali lebih manis dibanding pemanis non kalori lainnya (Ojha *et al.*, 2010; Thomas and Glade, 2010). Penggunaan stevia sebagai bahan pemanis telah diakui keamanannya oleh beberapa lembaga diantaranya *World Health Organization Expert Committee in Food Additives 2005* dan *Food and Drug Admission United State of America (US FDA)* dengan label GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (Anton *et al.*, 2010).

Varietas unggul merupakan kunci penting dalam pengembangan stevia di Indonesia. Jumlah varietas unggul Stevia di Indonesia masih terbatas. Keterbatasan ini perlu diimbangi dengan metode perbanyakan yang cepat, baik melalui biji maupun setek. Perbanyakan melalui biji terbatas karena daya kecambah biji Stevia yang rendah dan merupakan masalah dalam budidaya Stevia (Ucar *et al.*, 2016). Hasil penelitian Miyazaki and Watanabe (1974), bahkan melaporkan daya berkecambah benih stevia sangat rendah yakni kurang dari 10%, sehingga perbanyakan stevia lebih banyak dilakukan secara vegetatif dengan menggunakan stek batang. Namun, perbanyakan melalui setek terbatas pada tanaman induk yang menjadi sumber perbanyakan.

Kultur jaringan merupakan sebuah metode dan teknik dalam menumbuhkan sel, jaringan dan organ yang diisolasi dari tanaman induk dalam kondisi aseptik dan media yang terkontrol (Pande and Gupta, 2013).

Keberhasilan penerapan teknologi kultur jaringan dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu genetik, hormon, fisiologi jaringan induk dan kondisi pertumbuhan tanaman induk, Zat Pengatur Tumbuh (ZPT), dan nutrisi dalam media (Neuman *et al.*, 2009; Lestari, 2011). Multiplikasi tunas merupakan salah satu metode dalam kultur jaringan yang dapat dimanfaatkan untuk perbanyakan cepat bibit Stevia. Metode multiplikasi tunas dapat menghasilkan planlet dengan konstitusi genetik yang sama dengan tanaman induk yang dijadikan sumber eksplan. Metode multiplikasi tunas telah dilakukan oleh beberapa peneliti dengan variasi medium dasar dan ZPT yang berbeda (Sinta dan Sumaryono, 2011; Nower, 2014; Bhingradiya *et al.*, 2016). Youssef *et al.* (2010) telah meneliti multiplikasi tunas menggunakan eksplan dengan latar belakang genetik berbeda dan media dasar yang digunakan pada tanaman Stevia.

Akresi-akresi hasil eksplorasi antara lain adalah akresi Bogor, akresi Garut dan akresi Tawangmangu terus dikembangkan sebagai bahan tetua untuk perakitan varietas unggul Stevia. Setelah varietas unggul Stevia diperoleh, produksi benih maupun bibit merupakan tahap yang harus dilalui, sehingga varietas unggul dapat sampai ke petani. Setiap akresi dengan latar genetik berbeda akan memberikan respon yang berbeda terhadap media dengan komposisi yang sama. Suatu genotip jika di tanam dalam media dengan komposisi berbeda, akan memiliki respon berbeda untuk setiap akresi yang sama. Interaksi antar akresi dengan latar belakang genetik berbeda dan media menjadi kajian penting untuk melihat respons setiap akresi terhadap medium untuk setiap komponen pertumbuhan yang diamati termasuk multiplikasi tunas. Fatih *et al.* (2017) melaporkan terdapat interaksi antara eksplan tunas Stevia dari genotip berbeda (Bafra dan *Chinese*) dan media MS yang diberikan Benzyl Amino Purin (BAP) berturut-turut 1 mg.L⁻¹ dan 1,5 mg.L⁻¹. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh akresi terbaik untuk multiplikasi tunas terhadap ZPT yang diberikan pada medium.

Bahan dan Metode

Eksplan tunas yang digunakan berasal dari planlet dari botol kultur yang telah dikulturkan

sebelumnya. Tinggi tunas yang dikulturkan setinggi 1 cm dan memiliki 2 helai daun. Tunas diambil dari stevia aksesori Bogor, Garut, dan Tawangmangu. Tunas dikulturkan dalam medium Driver dan Kuniyuki Walnut (DKW) dengan penambahan sukrosa 30 g.L⁻¹. Pengukuran pH medium dilakukan pada skala 5,8. Medium kemudian dipanaskan sambil diaduk dengan menggunakan *Magnetic Stirrer*, kemudian setelah homogen dituangkan ke dalam botol kultur sebanyak 10 mL per botol. Sterilisasi medium menggunakan Autoclave selama 20 menit dihitung setelah tekanan mencapai 1 atmosfer dan suhu mencapai 121°C.

Penelitian ini menerapkan metode percobaan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan dua faktor (faktorial). Pada percobaan pertama, faktor pertama adalah aksesori stevia (A) yang terdiri dari tiga taraf yaitu a₁: stevia aksesori Bogor, a₂: stevia aksesori Garut, dan a₃: stevia aksesori Tawangmangu. Faktor kedua adalah jenis sitokinin (S), yang terdiri dari 6 taraf yaitu tanpa sitokinin (kontrol), Zeatin, Kinetin, Thidiazuron (TDZ), 2-isopentenil Adenin (2-IP), dan Benzil Adenin (BA). Pada semua medium yang digunakan ditambahkan IAA sebesar 0,15 mg.L⁻¹. Pada percobaan kedua, faktor pertama adalah aksesori stevia (A) yang terdiri dari tiga taraf yaitu a₁: stevia aksesori Bogor, a₂: stevia aksesori Garut, dan a₃: Stevia aksesori tawangmangu. Faktor kedua adalah konsentrasi BA (B) dengan 6 taraf yaitu 0 mg.L⁻¹ (kontrol), 0,15 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹, 1,13 mg.L⁻¹, 1,5 mg.L⁻¹. Setiap perlakuan terdiri dari lima botol kultur (ulangan) dengan tiga satuan pengamatan per ulangan.

Tunas dalam botol kultur disimpan dalam ruang kultur dengan suhu 24-26 °C dan kelembaban relatif 70-75%. Lama penyinaran 16 jam per hari. Lampu yang digunakan adalah lampu TL (*Tubular Lamp*) dengan rata-rata penyinaran 1860 lux. Ruang kultur secara rutin disemprot dengan alkohol 70% dua kali dalam seminggu untuk menghindari terjadinya kontaminasi yang berasal dari ruang kultur.

Pengamatan dilakukan delapan minggu setelah kultur meliputi jumlah tunas, tinggi tunas dan jumlah akar. Data yang diperoleh diolah menggunakan SPSS versi 17 untuk menganalisis keragaman (*Analysis of variance*). Uji lanjut dilakukan apabila terdapat perbedaan faktor perlakuan yang nyata dengan menggunakan uji jarak berganda Duncan dengan tingkat kepercayaan $\alpha \leq 0.05$.

Hasil dan Pembahasan

Jumlah tunas. Pada karakter jumlah tunas tidak terdapat interaksi antara aksesori Stevia dan jenis sitokinin. Jumlah tunas tertinggi diperoleh pada media DKW yang ditambahkan BA 1,5 mg.L⁻¹ dibandingkan dengan media yang ditambahkan Zeatin, Kinetin, TDZ dan 2IP berturut-turut sebesar 1,5 mg.L⁻¹ serta pada media tanpa sitokinin (Tabel 1).

Tabel 1. Rata-rata jumlah tunas stevia dalam jenis sitokinin berbeda.

Sitokinin	Jumlah Tunas
Kontrol	1,00 a
Zeatin	2,17 b
Kinetin	2,33 b
TDZ	2,67 b
BA	6,00 c
2IP	2,33 b

Keterangan : Angka-angka yang diikuti dengan huruf yang sama berbeda nyata menurut Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf nyata 5%

Penambahan BA pada medium DKW menghasilkan rata-rata 6 tunas dan yang media tanpa sitokinin menghasilkan 1 tunas dalam waktu empat minggu setelah kultur. Penambahan sitokinin diperlukan untuk menginduksi tunas dalam waktu 4 minggu setelah tanam. Penelitian yang dilakukan oleh Sinta dan Sumaryono (2011) mengungkapkan bahwa tunas berhasil diperoleh sebanyak 3,6 tunas per eksplan pada media Murashige dan Skoog (MS) dengan menambahkan 0,45 mg.L⁻¹ BA, sedangkan penambahan BA 1,13 mg.L⁻¹ dan IAA 0,35 mg/L pada media menaikkan jumlah tunas menjadi 4,5 tunas per eksplan. Bhingradiya et al. (2016) memperoleh 5,8 tunas setelah kultur pada medium MS yang ditambahkan BAP 0,5 mg.L⁻¹ dan NAA 0,05 mg.L⁻¹. Nower (2014) melaporkan penggunaan media MS dengan komposisi BA 1,0 mg.L⁻¹ menunjukkan hasil paling baik dalam multiplikasi tunas stevia. Variasi ZPT yang diberikan pada media akan menghasilkan tunas dengan jumlah berbeda. Penggunaan media DKW dalam percobaan ini menjadi bagian penting bahwa medium DKW memiliki komposisi berbeda dengan media MS. Hasil penelitian Alhafiizh dan Ermayanti (2019) menunjukkan bahwa jumlah tunas lateral pada

media DKW lebih tinggi dibandingkan pada media MS. Pada media DKW dengan penambahan 1 mg.L⁻¹ BAP diperoleh rata-rata 8,9 tunas dalam waktu 6 minggu setelah kultur. Eksplan yang digunakan adalah Stevia tetraploid. Oleh karena itu, upaya penggunaan ZPT BAP, maupun ZPT lainnya dan eksplan dengan latar belakang genetik berbeda perlu diteliti lebih lanjut pada media DKW.

Percobaan lebih lanjut telah dilakukan untuk mengetahui respons tiga aksesi Stevia terhadap medium DKW dengan konsentrasi BA berbeda, berturut-turut adalah 0,15 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹, 1,13 mg.L⁻¹ dan 1,5 mg.L⁻¹ (Tabel 2). Hasil percobaan menunjukkan bahwa terdapat interaksi antara aksesi Stevia dan konsentrasi BA.

Pada Tabel 2. dapat dilihat bahwa jumlah tunas tertinggi diperoleh pada media yang mengandung BA 1 mg.L⁻¹ pada aksesi stevia Garut dibandingkan dengan aksesi Bogor dan Tawangmangu. Jumlah tunas yang dihasilkan dari eksplan aksesi Garut sebesar 7,45 tunas.

Aksesi stevia Garut pada perlakuan BA 1 mg.L⁻¹ dan BA 1,13 mg.L⁻¹ jumlah tunas lebih tinggi daripada medium tanpa BA, pada media dengan BA 0,15 mg.L⁻¹, BA 0,5 mg.L⁻¹, dan 1,5 mg.L⁻¹. Hasil ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan dimana aksesi Garut menunjukkan respons terbaik dibanding aksesi lainnya.

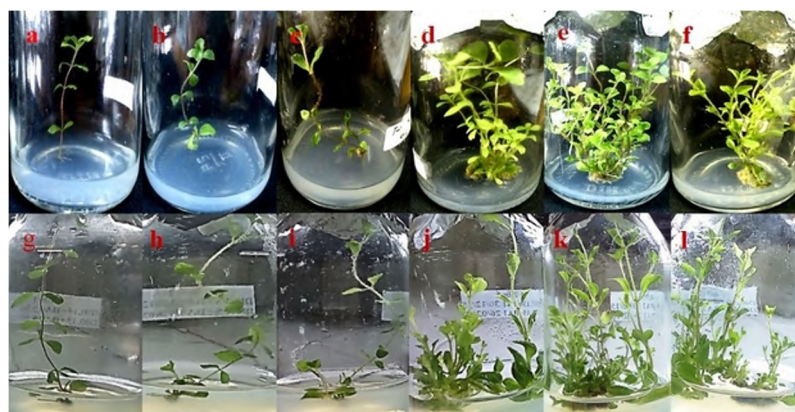
Hasil ini juga sejalan dengan penelitian yang telah dilaporkan oleh Nower (2014) dimana konsentrasi BA 1 mg.L⁻¹ merupakan konsentrasi terbaik untuk multiplikasi tunas stevia. Perlakuan BA 1 mg.L⁻¹ juga menunjukkan respons terbaik dalam hal perbanyakan tunas (Sikdar et al., 2012). Pola pertumbuhan tunas dari eksplan aksesi Bogor, Garut, dan Tawangmangu dapat dilihat pada Gambar 1.

Tinggi Tunas. Pada karakter tinggi tunas terdapat interaksi antara aksesi Stevia dan jenis sitokinin. Berdasarkan hasil uji Duncan menunjukkan bahwa aksesi Bogor dan Garut yang dikulturkan di media yang mengandung Kinetin sebesar 1,5 mg.L⁻¹ menghasilkan tinggi

Tabel 2. Jumlah tunas dari eksplan stevia pada media dengan konsentrasi *benzyl adenine* berbeda.

Aksesi	<i>Benzyl Adenine</i> (mgL ⁻¹)					
	0	0,15	0,5	1	1,13	1,5
Bogor	1,37 a	2,13 a	2,19 a	5,86 b	5,57 b	6,50 b
	A	AB	A	A	A	B
Garut	1,93 ab	1,37 a	2,92 ab	7,45 c	6,50 c	3,80 b
	A	A	A	A	A	A
Tawangmangu	1,56 a	2,56 b	2,37 a	4,88 b	4,75 c	2,99 b
	A	B	A	A	A	A

Keterangan: Nilai rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama (huruf kapital arah horizontal dan huruf kecil arah vertikal) tidak berbeda nyata berdasarkan Uji Duncan pada taraf nyata 5%



Gambar 1. Pola Pertumbuhan Tunas Stevia pada media DKW dengan penambahan BA. Perlakuan Jenis Sitokinin (atas) dan Perlakuan Penambahan Konsentrasi BA Berbeda (bawah). Aksesi Bogor (a, d, g, j), Aksesi Garut (b, e, h, k), serta Aksesi Tawangmangu (c, f, i, l).

tunas paling tinggi daripada medium DKW yang mengandung Zeatin, TDZ, BA dan 2-IP. Tinggi tunas rata-rata dari eksplan aksesi Bogor pada media DKW dengan Kinetin sebesar 1,5 mg.L⁻¹ adalah 8,15 dan dari aksesi Garut rata-rata tinggi tunas adalah 8,0 cm. Sejalan dengan hasil penelitian Shatnawi *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa tunas stevia yang dikultur pada media MS + IBA 0,2 ppm yang ditambahkan Zeatin 1,5 ppm menghasilkan tunas yang lebih tinggi yaitu 46 mm dibandingkan dengan penambahan kinetin atau BA pada media tersebut. Zayova *et al.* (2013) juga menunjukkan bahwa stevia yang dikultur pada media MS yang ditambahkan Zeatin 1 ppm + IAA 0,1 ppm mampu menginduksi tunas stevia lebih baik dari pada media MS yang ditambahkan TDZ 1 ppm + IAA 0,1 ppm.

Tabel 4. menunjukkan rata-rata tinggi tunas Stevia pada media dengan konsentrasi BA yang berbeda. Tinggi tunas pada media DKW tanpa

BA sampai BA 1,13 mg.L⁻¹ menghasilkan tunas lebih tinggi dari pada media DKW yang mengandung BA 1,50 mg.L⁻¹. Konsentrasi BA di atas BA 1,13 mg.L⁻¹ menghasilkan tinggi tunas lebih rendah.

Tabel 4. Rata-rata tinggi tunas stevia dalam konsentrasi benzyl adenine berbeda.

Konsentrasi Benzyl Adenine (mgL ⁻¹)	Tinggi Tunas
0,00	8,65 b
0,15	8,75 b
0,50	8,57 b
1,00	8,32 b
1,13	7,76 ab
1,50	7,36 a

Keterangan: Nilai rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan Uji Duncan pada taraf nyata 5%

Tabel 3. Rata-rata tinggi tunas stevia dalam jenis sitokinin berbeda.

Sitokinin/ Aksesi	Kontrol	Zeatin	Kinetin	TDZ	BA	2IP
Bogor	2,80f A	7,60abc A	8,15a A	6,60e A	7,35bcd A	7,85ab A
Garut	2,90f AB	7,55abc AB	8,00a AB	7,05cd AB	6,85de AB	7,9ab AB
Tawangmangu	2,40f AB	8,20a AB	5,00e AB	5,90d AB	7,40bc AB	8,00ab AB

Keterangan : Angka-angka yang diikuti dengan huruf yang sama (huruf kecil arah horizontal dan huruf besar arah vertikal) tidak berbeda nyata menurut Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf nyata 5%

Tabel 5. Rata-rata jumlah akar stevia dengan penambahan konsentrasi benzyl adenine berbeda tujuh minggu setelah tanam.

Aksesi	Benzyl Adenine (mg/L)					
	0	0,15	0,5	1	1,13	1,5
Bogor	7,57 B a	0,00 A a	0,00 A a	0,00 A a	0,00 A a	0,00 A a
Garut	10,52 B b	0,00 A a	0,00 A a	0,00 A a	0,00 A a	0,00 A a
Tawangmangu	7,01 B a	0,00 A a	0,00 A a	0,00 A a	0,00 A a	0,00 A a

Keterangan: Nilai rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama (huruf kapital arah horizontal dan huruf kecil arah vertikal) tidak berbeda nyata berdasarkan Uji Duncan pada taraf nyata 5%.

Konsentrasi BA yang tinggi akan menurunkan tinggi tunas. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Alhady (2011) bahwa penambahan konsentrasi BA yang rendah akan meningkatkan elongasi tunas.

Jumlah akar. Penambahan BA menunjukkan respons pertumbuhan jumlah tunas terbaik namun pada karakter jumlah akar tidak dijumpai adanya respon pertumbuhan akar. Hal ini karena penambahan BA dapat menghambat pembentukan akar. Pertumbuhan akar tidak didapatkan pada perlakuan dengan penambahan BA (Fatima and Khan, 2010). Pertumbuhan akar baru didapat pada perlakuan dengan penambahan IAA 1 mg.L⁻¹ + BA 1 mg.L⁻¹ (Taleie et al., 2012).

Interaksi antara konsentrasi BA dan jenis aksesori stevia terhadap jumlah akar stevia dapat dilihat pada perlakuan kontrol dengan konsentrasi BA 0 mg/L (Tabel 5).

Pada perlakuan BA 0 mg.L⁻¹ rata-rata jumlah akar aksesori stevia Garut lebih tinggi dibandingkan dengan aksesori Tawangmangu dan aksesori Bogor. Hal ini menunjukkan aksesori stevia pada perlakuan BA 0 mg.L⁻¹ dapat mempengaruhi besarnya jumlah akar stevia. Jumlah akar stevia paling banyak ditunjukkan oleh perlakuan BA 0 mg.L⁻¹ pada aksesori stevia Garut dengan rata-rata 10,52 akar dan berbeda nyata dengan aksesori Bogor dan Tawangmangu.

Kesimpulan

Aksesori Stevia Garut memberikan respon paling baik dalam multiplikasi tunas dan BA merupakan jenis sitokinin yang paling efektif untuk multiplikasi tunas pada media DKW. Konsentrasi BA 1 mg.L⁻¹ merupakan konsentrasi paling efektif dalam multiplikasi tunas stevia.

Aksesori Tawangmangu menunjukkan respon paling baik untuk tinggi tunas dengan penambahan Zeatin 1,5 mg.L⁻¹. Pertumbuhan akar terbaik diperoleh dari media DKW tanpa penambahan BA untuk aksesori Garut yaitu dengan rata-rata 10,52 akar.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat

Universitas Padjadjaran yang telah mendanai sebagian penelitian ini, juga semua pihak yang telah membantu penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Alhady, M. 2011. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. A new sweetening crop in Egypt. Glob. J. Biotechnol. Biochem. 6:178-182.
- Alhafiizh, E. dan Ermayanti, T.M. 2019. Perbanyakan *Stevia rebaudiana* Bertoni Tetraploid secara In Vitro pada berbagai Jenis Media Dasar dengan penambahan BAP. Prosiding Seminar Nasional Agroteknologi 2019. Jurusan Agroteknologi Universitas Islam negeri Sunan Gunung Djati Bandung.
- Anton, S. D., C. K. Martin, H. Han, S. Coulon, W. T. Celafu, P. Geiselman and D. A. Williamson. 2010. Effect of *Stevia*, aspartame, and sucrose on food intake, satiety and postprandial glucose and inBhingBhsulin levels. Appetite 55: 37-43.
- Badan Pusat Statistik. 2020. STASTIK INDONESIA 2020. Badan statistik Indonesia. Jakarta . Nomor Katalog:1101001
- Bhingradiya, V, Mankad, A, Patel, R dan Mathur, S. 2016. In vitro shoot multiplication of *Stevia rebaudiana* (BETT) Through Plant Tissue Culture. Int. J. Adv. Res. 4(11), 2300-2307.
- Fatih, S., Emine, Y and Aysel Ozcan. 2017. In Vitro Multiplication of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Genotypes by Using Defferent Explants. Int. J. Crop and Tech. Vol. 3 (2) 36-41.
- Fatima, A. and S. J. Khan. 2010. Some factors affecting the in vitro growth of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Iranian J. of Plant Physiology. 1: 61-68
- Lestari, E. G. 2011. Peranan Zat Pengatur Tumbuh dalam perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan. Agrobiogen 7: 63-68.
- Miyazaki, Y. and H. Watanabe. 1974. Studies on the cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni; on the propagation of the plant. Japan J. Tropical Agriculture 17: 154-157.
- Neuman, K. H., A. Kumar and J. Imani. 2009. Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology. Springer, Berlin, Germany.
- Nower, A.A. 2014. In Vitro Propagation and

- Synthetic Seeds Production: An Efficient Methods for *Stevia rebaudiana* Bertoni. Sugar Tech 16(1): 100-108.
- Ojha, A., V. N. Sharma and V. Sharma. 2010. An efficient protocol for in vitro clonal propagation of natural sweetener plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni). 4: 319-321.
- Pande, S. S. and P. Gupta. 2013. Plant tissue culture of *Stevia rebaudiana* (Bertoni): A review. J. Pharmacognosy and Phytotherapy. 5: 26-33.
- Shatnawi, M. A., R.A. Shibli, S.M. Abu-Romman, M.S. Al-Mazra'awi, A.I. Al Ajlouni, W.A. Shatanawi, W.H. Odeh. 2011. Clonal propagation and cryogenic storage of the medicinal plant *Stevia rebaudiana*. Spanish Journal of Agricultural Research 9(1): 213-220.
- Sikdar. S. U., N. Zobayer, F. Azim, M. Ashafuzzaman and S. H. Prodhan. 2012. An efficient callus initiation and direct regeneration of *Stevia rebaudiana*. African J. Biotechnology. 11: 10381-10387.
- Sinta, M. M. dan Sumaryono. 2011. Peningkatan laju multiplikasi tunas dan keragaan planlet *Stevia rebaudiana* pada kultur in vitro. Menara Perkebunan. 79: 49-56.
- Taleie, N., S. Hamidoghli and Y. Hamidoghli. 2012. In vitro planlet propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. South Western J. of Horticulture, Biology and Environment. 3:99-108
- Thomas, J. E. and M. J. Glade. 2010. Stevia: it's not just about calories. Open Obes Journal. 2:101-109.
- Ucar, E, OZYIGIT, Y. And Turgut, K. 2016. Effects of Light and Temperature on Germination of *Stevia rebaudiana* BERT.) Seed. Turk J. Agric Res (2016) 3:37-40.
- Youssef, M., A. James, A. Mayo-mosqueda, J. R. Ku-cauich, R. Grijalva-arango and R. M. Escobedo-gm. 2010. Influence of genotype and age of explant source on the capacity for somatic embryogenesis of two Cavendish banana cultivars (*Musa acuminata* Colla, AAA). J. Biotechnology. 9: 2216-2223.
- Zayova, E., Ira S, Maria G, Maria P dan Lyudmila D. 2013. Antioxidant Activity of In Vitro Propagated *Stevia rebaudiana* Bertoni Plants of Different Origins. Turkish Journal of Biology. 37 : 106-113.