



Analisis Histologi dan Scanning Electron Microscopy (SEM) pada Somatik Embriogenesis Tanaman Porang (*Amorphophallus muelleri* B)

*Histological Analysis and Scanning Electron Microscopy (SEM) on Somatic Embryogenesis of Porang Plants (*Amorphophallus muelleri* B)*

Author(s): Dwika Nano Hariyanto⁽¹⁾; Tri Handoyo⁽¹⁾; Parawita Dewanti⁽¹⁾;
Kacung Hariyono⁽¹⁾; Didik Pudji Restanto^{(1)*}

⁽¹⁾ Universitas Jember

* Corresponding author: restanto.lemlit@unej.ac.id

Submitted: 6 Des 2021

Accepted: 1 Mar 2022

Published: 31 Mar 2022

ABSTRAK

Embriogenesis somatik ialah proses pembentukan embrio tanaman dari jaringan somatik. Secara umum, tahapan perkembangan embrio somatik terdiri dari inisiasi dan proliferasi embrio, pendewasaan embrio (fase globular, skutelar, dan kوليوptilar), perkecambahan embrio dan aklimatisasi. Pembentukan embrio somatik secara tidak langsung saat ini belum memiliki kajian lebih mendalam tentang mekanisme terjadinya embrio somatik khususnya pada tanaman porang sehingga kami menyajikan pengetahuan terkait interaksi hormon 2,4-D dan NAA terhadap induksi kalus melalui analisa histologi dan analisa Scanning elektron mikroskop (SEM) pada kalus embriogenik tanaman porang (*Amorphophallus muelleri*). Tujuan penelitian ini adalah guna mengetahui interaksi pengaruh 2,4-D dan NAA dalam proses induksi SE dan mempelajari tahapan perubahan embrio serta perkembangan struktur embrio tanaman porang. Penelitian ini telah dilaksanakan selama 6 bulan sejak Mei hingga Oktober 2021. Tempat penelitian berada di Laboratorium Kultur Jaringan Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Jember. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) 2 Faktor dengan 3 kali ulangan. Faktor pertama ialah hormon 2,4-D dengan konsentrasi 0 ppm, 1 ppm, 2 ppm, dan faktor kedua yaitu hormon NAA dengan konsentrasi 0,5 ppm, 1 ppm, 1,5 ppm, 2 ppm, 2,5 ppm. Hasil penelitian menunjukkan perlakuan hormon 1 ppm 2,4-D + 1,5 ppm NAA menghasilkan kalus embriogenik dan pada hasil histologi dan scanning electron mikroskopi (SEM) memperlihatkan tahapan embrio somatik porang meliputi tahapan pre-embriomas, embrio globular, embrio skutelar dan embrio kوليوptilar, lalu tahap koleoptilar berkembang ke tahap primodial tunas. Pada konsentrasi 1 ppm 2,4-D + 1,5 ppm NAA terbentuk pre-embriomas dan embrio globular yang memiliki permukaan yang halus.

Kata Kunci:

Amorphophallus muelleri;

Histologi;
Porang;

Somatik embriogenesis (SE);

Scanning elektron mikroskopi (SEM)

Keywords:

Amorphophallus muelleri;

Histology;
Porang;

Somatic embryogenesis (SE);

Scanning electron microscopy (SEM)

ABSTRACT

*Somatic embryogenesis is the process of forming plant embryos from somatic tissues. In general, the stages of somatic embryo development consist of embryo initiation and proliferation, embryo maturation (globular, scutellar, and coleoptilar phases), embryo germination, and acclimatization. Indirect somatic embryo formation currently does not have a more in-depth study of the mechanism of the occurrence of somatic embryos, especially in porang plant, so we present knowledge related to the interaction of 2,4-D hormones and NAA on callus induction through histological analysis and scanning electron microscopy (SEM) analysis on embryogenic callus of porang plant (*Amorphophallus muelleri*). The purpose of this study was to determine the interaction effect of 2,4-D and NAA on the SE induction process and to study the stages of embryonic changes and development of the embryonic structure of porang plant. This research has been carried out for 6 months from May to October 2021. The research site was in the Agronomy Plant Tissue Culture Laboratory, Faculty of Agriculture, University of Jember. This study used a 2-factor Completely Randomized Design (CRD) with 3 replications. The first factor was 2,4-D concentrations of 0 ppm, 1 ppm, and 2 ppm, whereas the second factor was NAA concentrations of 0.5 ppm, 1 ppm, 1.5 ppm, 2 ppm, and 2.5 ppm. The results showed that the treatment of 1 ppm 2,4-D + 1.5 ppm NAA resulted in embryogenic callus and the results of histology and scanning electron microscopy (SEM) showed that the stages of the somatic embryo of porang included the pre-embryogenic mass, globular, scutellar, and coleoptile embryonic stages, then the coleoptile development to the bud primordia stage. At concentrations of 1 ppm 2,4-D + 1.5 ppm NAA, pre-embryogenic mass, and globular embryos were formed which had smooth surfaces.*



PENDAHULUAN

Porang (*A. muelleri*) ialah tanaman otentik hutan tropis sebagai bahan dasar industri pangan maupun obat karena mengandung glukomanan yang memiliki nilai ekonomi yang tinggi (Harijati & Mastuti, 2014). Menurut Sumarwoto, (2005) tanaman porang mengalami tiga kali siklus hidup yaitu siklus ke-1 pada musim hujan ditandai dengan munculnya tunas berasal dari umbi, pada percabangan daun majemuk terdapat bulbil yang tumbuh. Bulbil merupakan umbi yang tumbuh pada percabangan daun majemuk dengan karakteristik berwarna coklat dan kasar berbintil-bintil. Batang semu tumbuh selama 6 bulan kemudian tanaman rebah dan umbi mengalami dormansi. Siklus ke-2 tanaman kembali tumbuh pada awal musim hujan dengan pertumbuhan yang berbeda dengan siklus pertama dengan tangkai daun dan diameter tajuk daun lebih panjang/lebar. Kedua siklus tanaman porang ini merupakan fase pertumbuhan vegetatif. Siklus ke-3 merupakan fase generatif tanaman porang ditandai adanya berat umbi yang lebih berat dan ukuran umbi lebih besar serta batang yang tumbuh berdiameter lebih besar dari siklus ke 1 dan 2, pada siklus ini biasanya tanaman porang dipanen. Perbanyak tanaman porang di masyarakat saat ini masih menggunakan bahan tanam berupa bulbil dan umbi, karena bulbil dan umbi bisa dapat ditanam secara langsung dilahan yang telah di siapkan, akan tetapi memerlukan waktu yang relatif lama yaitu 6 bulan (Ibrahim, 2019).

Bersimulasi replika, untuk memenuhi keperluan glukomanan dan kapabilitas ekspor sesuai kuota benih nasional/internasional, produksi umbi diperlukan sekitar 35.000 ton/tahun (Hidayat dan Purwadi, 2021). Untuk permintaan tersebut, diperlukan adanya dorongan kesiapan bibit dan eksploitasi yang sesuai. Dilihat dari perspektif ketersediaan bibit, penghalang utamanya

ialah perihal perluasan tanam sehingga mengakibatkan kelangkaan benih yang menyebabkan biaya bulbi dan umbi batang tanaman porang berkembang drastis (Santosa, 2015). Pemenuhan kebutuhan bibit dapat dilakukan lewat pembiakan tanaman secara konvensional, tetapi tidak menutup probabilitas untuk dilakukan secara non konvensional (kultur *in vitro*) (Karyanti & Kartini, 2017).

Kultur *in vitro* adalah teknik mengisolasi komponen tanaman seperti sel, jaringan atau organ yang dikembangkan pada media steril dan ruangan terkendali, sehingga bagian tanaman dapat memperbanyak diri serta meregenerasi menjadi individu baru yang lengkap. Kultur *in vitro* bertujuan untuk perbanyak tanaman dengan waktu yang singkat, hal ini merupakan tahap di dalam menghasilkan jenis tanaman yang diinginkan dan pemuliaan tanaman. Penyediaan bibit yang tidak mengenal musim, produksi bibit berjumlah besar dengan waktu yang singkat, bersifat seragam dan bebas dari patogen merupakan keuntungan dari kultur *in vitro*. Teknik yang digunakan salah satunya yaitu embriogenesis somatik (SE). Embriogenesis Somatik ialah prosedur pertumbuhan sel somatik membentuk individu baru yang lengkap tanpa melalui fusi gamet. Embriogenesis somatik bermanfaat untuk perbanyak massal, program perbaikan genetik, dan produksi benih sintetik kultur embrio somatik (Silvia et al., 2021).

Embriogenesis somatik pada penelitian Zhong et al., (2017) pembentukan kalus embriogenik tertinggi pada tanaman *Amorphophallus konjac* yaitu 9,04 μM (2,4-D) dan 5.37 μM (NAA). Sedangkan Hernández-Piedra et al., (2018) melaporkan bahwa pembentukan kalus embriogenik tertinggi pada tanaman *Typha angustifolia* dicapai pada konsentrasi 2,4D sebesar 0,5 – 1 mg/l, dan Gurme et al., (2018) melaporkan

bahwa pembentukan embrio somatik tertinggi (100%) menggunakan 13.31 μM (BAP), sedangkan hormon IAA 2,85 μM and hormon 2,4-D 2,26 μM memiliki persentase pembentukan kalus yang rendah. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui interaksi hormon 2,4-D dan NAA terhadap perkembangan SE tanaman porang serta mempelajari mekanisme pembentukan embrio somatik lebih mendalam sehingga dapat dijadikan kajian ilmiah tentang pemahaman SE.

METODOLOGI

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Agronomi Universitas Jember, Jawa timur. Bahan tanam yang digunakan yaitu eksplan kuncup daun tanaman porang, media dasar Murashige and Skoog (MS), hormon *Dichlorophenoxyacetic acid* (2, 4-D), *Naphthalene acetic acid* (NAA), bacto agar, sukrosa, *sodium hypochlorite* (7,4%), dan aquades. Alat yang digunakan meliputi neraca analitik, autoklaf, *laminar air flow*, pinset, scalpel, mikroskop Leica EZ4 HD, Mikroskop BestScope BS-2052 BT, dan SEM hitachi tabletop microscope TM3000.

Rancangan ini memakai RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan 2 faktor. Faktor pertama ialah konsentrasi hormon 2,4-D yakni 0 ppm, 1 ppm, dan 2 ppm. Faktor kedua ialah konsentrasi hormon NAA yaitu 0,5 ppm, 1 ppm, 1,5 ppm, 2 ppm, dan 2,5 ppm. Terdapat 15 kombinasi yang masing-masing kombinasi perlakuan diulang 3 kali sehingga dihasilkan 45 botol kombinasi perlakuan.

Tahapan pelaksanaan diawali dengan pembuatan media tanam dengan menggunakan media dasar Murashige dan Skoog (MS) terdiri dari nutrisi hara makro, nutrisi hara mikro, sukrosa, 2,4-D dan NAA sesuai dengan perlakuan dan penentuan pH 5,7-5,8 kemudian ditambahkan agar-agar. Media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 45 menit.

Sterilisasi ekplan menggunakan daun kuncup yang dibilas menggunakan sabun lalu dibilas dengan air mengalir, selanjutnya eksplan dimasukkan kedalam larutan sodium hypochlorite (7,4%), digojok selama 3 menit. Membilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali. Eksplan yang telah dipotong dimasukkan ke dalam media induksi sesuai perlakuan. Botol kultur diletakkan di ruang inkubasi dengan suhu 22-26 °C dan pencahayaan 1.500 Lux selama 16 jam/hari. Eksplan disubkultur setiap satu bulan sekali. Dilakukan penyemprotan botol kultur menggunakan alkohol 70% tiap hari guna menghindarkan dari kontaminasi di dalam ruangan.

Variabel pengamatan antara lain yakni respon Induksi kalus, analisa histologi dan Analisa *Scanning electron microscopy* (SEM). Prosedur analisa histologi meliputi : (1) fiksasi jaringan menggunakan larutan 90% formalin, 5% Acetidacid, 5% Alkohol (FAA); (2) dehidrasi menggunakan alkohol dengan konsentrasi bertahap mulai dari 70%, 80%, 95%, dan 100%; (3) *clearing* menggunakan campuran alkohol xilol perbandingan bertahap 3:1:1, dan 1:3; (4) infiltrasi dengan merendam paraffin selama 24 jam; (5) pemotongan mikrotom rotary setebal 8-12 μm ; (6) perekatan pita paraffin pada deglass; (7) pewarnaan menggunakan bahan kimia sarafin atau fastgreen 1%; (8) mounting menggunakan balsam Canada; (9) pengamatan menggunakan Mikroskop BestScope BS-2052 BT.

Prosedur analisa SEM meliputi: (1) menyalakan *earth leakage breaker* pada bagian alat SEM dan menyalakan tombol power pada bagian samping kanan alat, alat akan beroperasi secara otomatis; (2) sampel kalus merupakan sampel basah yaitu menggunakan pasta untuk melekatkan sampel dan mengatur alas pada penyangga serta jarak antara sampel dengan alat pengukur sekitar 1 mm; (3) meletakkan sampel pada alat lalu menekan tombol

EVA/AIR untuk memasukan udara ke dalam ruang sampel, setelah udara masuk lampu kuning akan menyala tetap kemudian mengeluarkan tempat sampel secara perlahan dan mengatur letak sampel (memosisikan tanda silang tepat ditengah tanda) kemudian menutup kembali tempat sampel dan tekan tombol EVA/AIR untuk mengeluarkan udara dalam *chamber* (*evacuation*); (4) pengamatan sampel menggunakan software TM3000 pada laptop yang telah tersambung pada alat kemudian mengatur posisi sampel yang diamati dengan memutar knob XY pada bagian depan alat untuk mengatur posisi sampel, menekan tombol “fast” setelah mendapatkan sampel yang diinginkan gunakan mode “slow” agar resolusi gambar yang ditampilkan lebih baik, untuk pembesaran (klik tombol pembesaran), pencahayaan dan kontras (klik tombol auto B/C), fokus (klik tombol auto fokus); (5) penyimpanan gambar dilakukan dengan klik save untuk menyimpan setelah itu memasukan nama file yang diinginkan. (6) Selesai pengamatan klik stop lalu menekan tombol EVA/AIR untuk memasukan udara pada *chamber*, setelah itu mengeluarkan tempat sampel secara perlahan serta

menutup kembali tempat sampel kemudian menekan tombol EVA/AIR untuk memasukan udara pada *chamber* (*evacuation*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi dan Poliferasi Kalus

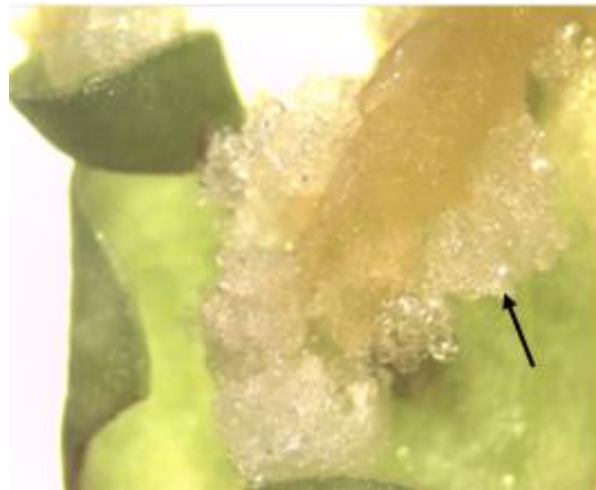
Induksi kalus ialah salah satu teknik kultur *in vitro* yang memiliki tujuan untuk perbanyakkan secara massal. Kalus ialah sekumpulan sel yang aktif membelah. Tiap selnya mempunyai kemampuan membentuk organisme baru. Oleh sebab itu, dengan menginduksi kalus pemenuhan bibit tanaman porang bisa tercapai dengan waktu singkat serta hasil yang banyak. Pengembangan bibit porang melalui pendekatan kultur jaringan sangat potensial dalam upaya memenuhi bibit porang yang banyak dan bermutu baik. Media dengan konsentrasi 1 ppm 2,4-D + 1,5 ppm NAA menghasilkan respon yang baik terhadap pembentukan kalus terbanyak pada bagian tulang daun pada 21-15 hari setelah ditanam di media induksi. Respon 2,4-D dan NAA terhadap induksi kalus tanaman porang terlihat pada Tabel 1.

Table 1. Respon 2,4-D dan NAA terhadap induksi kalus tanaman porang
Table 1. Response of 2,4-D and NAA to callus induction of porang plants

Perlakuan <i>Treatment</i>		Respon <i>Response</i>
2,4-D(ppm)	NAA(ppm)	
0	0,5	Non-embriogenik (kompak)
0	1	Non-embriogenik (kompak)
0	1,5	Non-embriogenik (kompak)
0	2	Non-embriogenik (kompak)
0	2,5	Non-embriogenik (kompak)
1	0,5	Embriogenik (remah)
1	1	Embriogenik (remah)
1	1,5	Embriogenik (remah)
1	2	Embriogenik (remah)
1	2,5	Embriogenik (remah)
2	0,5	Embriogenik (remah)
2	1	Embriogenik (remah)
2	1,5	Embriogenik (remah)
2	2	Embriogenik (kompak)
2	2,5	Embriogenik (kompak)

Berdasarkan Tabel 1 terlihat bahwa perlakuan NAA tunggal menghasilkan kalus yang kompak karena penggunaan auksin terlalu rendah yang menyebabkan kalus mengarah pada pertumbuhan SE secara langsung, begitu juga dengan perlakuan hormon auksin yang terlalu tinggi. Pada konsentrasi optimal akan

membentuk kalus yang embriogenik dengan tekstur yang remah dan mengkilat (*glossy*) yang ditunjukkan pada perlakuan kombinasi 1 ppm 2,4-D + 1,5 ppm NAA. Kalus berwarna putih kekuningan menunjukkan bahwa sel masih dalam keadaan aktif membelah, terlihat seperti Gambar 1.

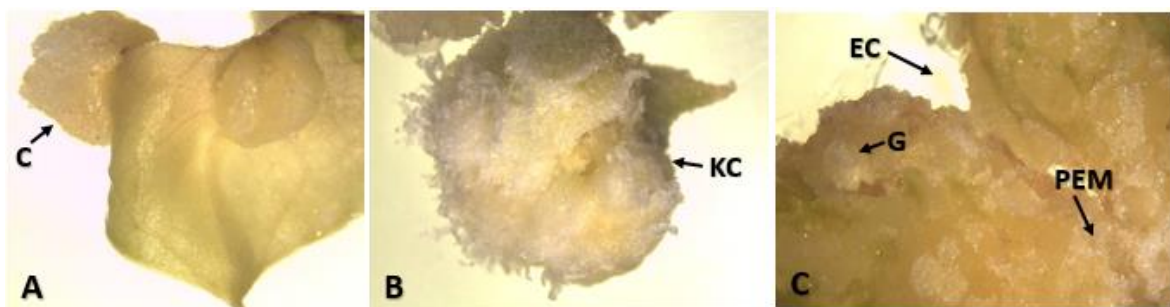


Gambar 1. Kalus embriogenik dengan intensitas warna putih kekuningan (*glossy*)

Figure 1. Embryogenic callus yellowish-white intensity (glossy)

Tekstur kalus merupakan tolak ukur sebagai tanda bahwa kalus yang dihasilkan memiliki kualitas yang baik. Kalus yang berkualitas baik mempunyai tekstur yang remah dan sel-selnya mudah dipisahkan menjadi sel-sel individu (Restanto *et al.*, 2021). Embriogenesis somatik secara

langsung (*direct SE*) dalam proses pembentukannya lebih cepat dibandingkan dengan secara tidak langsung (*indirect SE*). Terdapat beberapa eksplan yang merespon membentuk embrio kompak dan embriogenik, terlihat seperti Gambar 2.



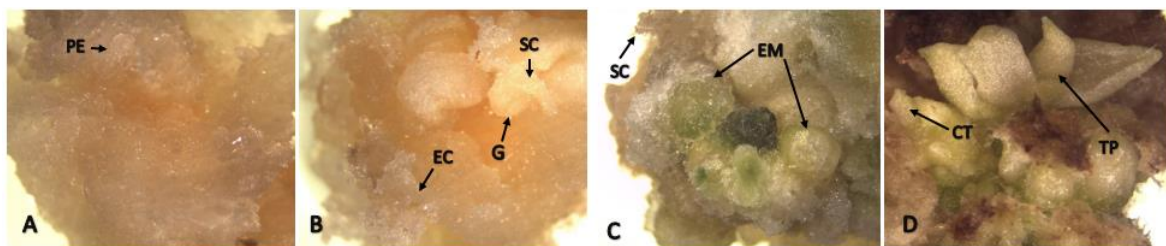
Gambar 2. A. Awal kemunculan kalus umur 21 hari, Kalus (C). B. Kalus kompak (KC). C. Kalus embriogenik (EC), Pre-embriomas (PEM), Embrio Globular (G)

Figure 2. A. The beginning of the appearance of the callus at 21 days, Callus (C). B. Compact callus (KC). C. Embryogenic callus (EC), Pre-embryo (PEM), Globular Embryo (G)

Pada Gambar 2 terlihat embrio somatik pada daun porang diawali dengan adanya pembentukan tonjolan pada bagian tulang daun bekas luka sayatan (Gambar 2 A). Penggunaan NAA tunggal dengan konsentrasi yaitu 0,5 – 2,5 ppm pertumbuhan kalus kompak dan lebih mengarah pada organogenesis (Gambar 2B). Perlakuan 1 ppm 2,4-D + 1,5 ppm NAA menghasilkan kalus embriogenik yang diawali dengan adanya fase pre-embriomas dan embrio fase globular yang muncul (Gambar 2C)

Hasil penelitian penggunaan kombinasi konsentrasi 1 ppm 2,4-D + 1,5 ppm NAA merupakan konsentrasi yang terbaik dalam menginduksi kalus embriogenik dibandingkan dengan penelitian sebelumnya Zhong et al., (2017) bahwasannya pada tanaman *Amorphophallus konjac* tingkat tertinggi

pembentukan kalus embriogenik terdapat pada media yang mengandung 9.04 μM (2,4D) dan 5.37 μM (NAA). Menurut (Toshinori Abe & Futsuhara, 1985) dan (T Abe & Futsuhara, 1989), bahwa konsentrasi 2,4-D + NAA untuk menginduksi SE sangat bervariasi. Perlakuan hormon 1 ppm 2,4-D + 1,5 ppm NAA diawali dengan adanya pembentukan fase pre-embriomas dengan ciri-ciri berwarna putih dengan tekstur yang lengket dan fase globular dengan ciri-ciri berupa tonjolan bulat berwarna kuning muda dengan tekstur yang remah mengkilap (*glossy*). Pernyataan ini sesuai dengan (de Araújo Silva-Cardoso et al., 2020) bahwasanya hormon 2,4-D dan NAA yang paling cocok untuk menginduksi kalus embriogenik. Terlihat pada (Gambar 3)



Gambar 3. Perkembangan Embrio somatik Menggunakan Mikroskop stereo leica EZ4 HD. A. pre-embryo (PE), B. Embrio Globular (G), Permukaan Kalus Embriogenik (EC), C. Embrio Skutelar (SC), Embrio Matang (EM). D. Embrio Somatik Koliptilar (CT), Primordia Tunas (TP).

Figure 3. Observation of the Development Phase of Somatic Embryos Using a Leica EZ4 HD Stereo Microscope. A. pre-embryo (PE), B. Globular Embryo (G), Surface Embryogenic Callus (EC), Scutellar Embryo, C. Scutellar Embryo (SC), Mature Embryo (EM). D. Coleoptilar Somatic Embryo (CT), Bud Primordia (TP).

Berdasarkan gambar 3. Kalus embriogenik memiliki warna putih kuning muda dengan tektur yang remah kemudian kalus membelah dan mengalami proliferasi serta segera berubah warna menjadi kuning muda, terlihat mengkilat serta berisifat embriogenik. Kalus embriogenik mulai membentuk calon embrio dimulai dengan adanya pre-embriomas pada umur 20 hari (Gambar 3 A) lalu berkembang menjadi

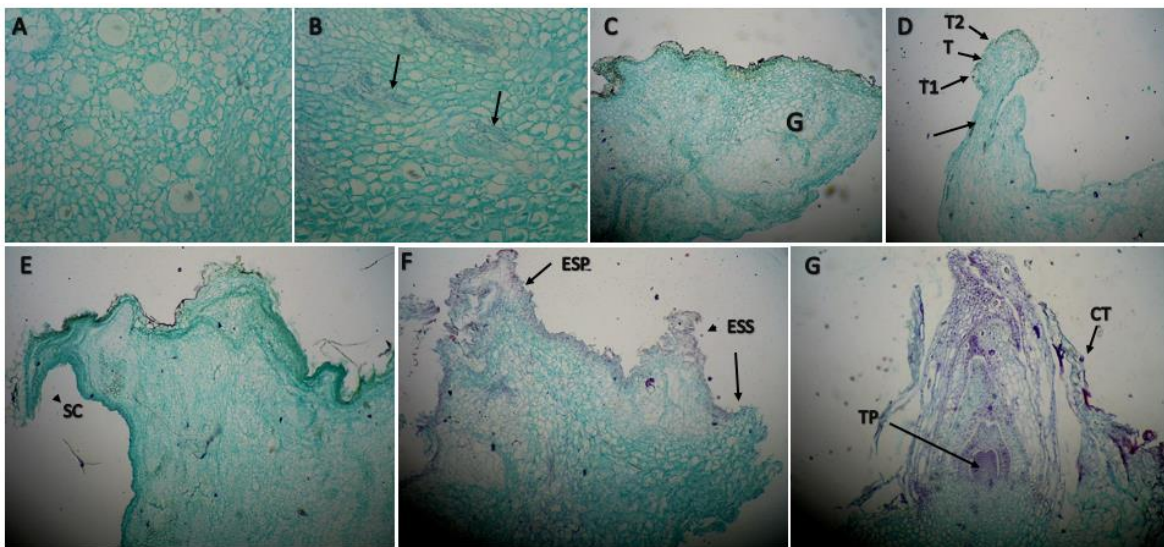
embrio fase globular pada umur 24 hari dan terdapat pada bagian tertentu membentuk kalus embriogenik yang masih dalam proses pembelahan, namun masih berwarna putih bening. Kalus embriogenik terus melakukan pembelahan dan membentuk embrio fase globular yang sudah berwarna kuning muda, selanjutnya embrio globular terinduksi membentuk tonjolan-tonjolan di atas permukaan kalus

embriogenik (Gambar 3 B), setelah embrio globular berbentuk sempurna. Fase globular yang membentuk bulatan atau tonjolan sempurna mengalami pemanjangan pada bagian ujung apikal embrio dimana fase ini memasuki awal fase globular ke fase skutelar pada umur 37 hari dimana fase ini ditandai dengan adanya kuncup skutelum (Gambar 3 B,C), lalu fase skutelar berkembang ke fase kوليوptilar yang ditandai skutelum pada embrio mulai memanjang pada umur 56 hari (Gambar 3 D). Fase kوليوptilar terus berkembang dan akan membentuk primordia tunas, fase primordia tunas terjadi pada umur 84-90 hari, pada umur

110-120 hari primordia tunas berkembang menjadi individu baru. (Gambar 3 D).

Histologi

Histologi ialah cabang ilmu biologi yang mempelajari terkait struktur sel serta jaringan dengan detail menggunakan mikroskop (Barua et al., 2021). Kegiatan histologi pada jaringan tanaman dipotong melintang dan membujur. Pengamatan histologi pada tahapan SE menggunakan mikroskop Mikroskop BestScope BS-2052 BT dapat memberikan informasi yang berfokus pada perubahan morfologi embrio, perubahan struktur permukaan sel serta fungsi sel yang terlihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Histologi perkembangan embrio somatik porang (*A. muelleri* B). A. sel embriogenik dengan inti yang jelas berukuran besar dan kecil, sitoplasmanya padat, B. pre-embrio 2 sel, C. Fase Globular, terlihat pada bagian apikal tersusun dari sel-sel yang sama, D. Embrio globular memanjang dengan struktur menyerupai suspensor pada bagian basal (anak panah), dan terdapat 2 tonjolan yang tumbuh serta rongga, E. Embrio skutelar, pertumbuhan diawali tonjolan lebih memanjang menyerupai jambul yang berbentuk skutelum, F. Embrio somatik sekunder yang tumbuh pada embrio somatik primer. G. Embrio somatik fase Kوليوptilar dan embrio somatik berkecambah dengan membentuk tunas pucuk. G= Globular, SC= Skutelar, CT= koleoptilar, T= rongga, T1= tonjolan ke-1, T2= tonjolan ke-2, ESP= Embrio somatik primer, ESS= Embrio somatik sekunder, TP= Tunas pucuk.

Figure 4. Histology of somatic embryo development of the porang (*A. Muelleri* B). A. embryogenic cells with a clear nucleus of large and small size, and compact

cytoplasm, B. 2-cell pre-embryo, C. Globular phase, seen in the apical part composed of the same cells, D. Elongated globular embryo with a suspensor-like structure in the basal section (arrows), 2 bulges that grew and cavities, E. Skutelar embryo, the growth of the bulge is more elongated resembling a crest in the form of a scutellum, F. Secondary somatic embryo that grew on the primary somatic embryo. G. Coleoptilar phase somatic embryos and somatic embryos germinated by forming shoots. G= Globular, SC= Skutelar, CT= coleoptilar., T= cavity, T1= 1st bulge, T2= 2nd bulge, ESP= Primary somatic embryo, ESS= Secondary somatic embryo, TP= Bud Shoots

Pada Gambar 4, dapat dilihat bahwa embrio somatik terbentuk dari sel embriogenik yang ditemukan pada pinggiran kalus yang dipotong dan kumpulan sel yang terletak di pinggiran kalus tersusun dari sel-sel kecil, dengan inti dan sitoplasma yang jelas dan warna yang lebih gelap (Gambar 4 A). Penampakan ini merupakan ciri sel yang tergolong meristem atau sel embriogenik (Taylor & Vasil, 1996). Hasil ini diperoleh dari potongan melintang kalus embriogenik. Sel embriogenik kemudian membentuk kluster yang diikuti pembelahan secara transversal pada sumbu embrio sehingga membelah menjadi pre-embrio 2 sel yang tidak sama (Gambar 4 B), lalu membentuk fase globular yang terdiri dari sekumpulan sel yang sama (Gambar 4 C).

Perkembangan berikutnya mengalami diferensiasi apikal dimana embrio yang terdiri dari sekumpulan sel kecil aktif membelah. Sel tersebut membelah di bagian basal (Gambar 4 C). Hal ini karena hormon yang diberikan adalah hormon yang mengandung auksin. Hormon auksin 2,4-D berperan menstimulasi pemisahan sel dan mencegah pemanjangan sel sementara NAA memiliki peran meningkatkan pemanjangan sel saat terjadi degradasi pembelahan sel. Peranan antagonis ini memiliki kaitan dengan paradigma pengangkutan dari kedua jenis hormon auksin tersebut. 2,4-D lebih cepat terakumulasi di dalam sel (Stasolla dkk., 2002). Embrio globular mengalami pemanjangan dan membentuk struktur suspensor di dasar embrio (Gambar 4 D),

hal ini menunjukkan bahwa embrio somatik berasal dari sel tunggal. Dijelaskan dalam (Lee et al., 1997) bahwa struktur basal embrioid dapat memperlihatkan bahwa embrio tersebut berasal dari sel tunggal yaitu embrio yang bersumber dari *single cell* yang mempunyai struktur seperti suspensor pada organ basalnya dan proses ini berlangsung sejak awal pembelahan.

Fungsi dari suspensor khususnya pada tingkat awal embriogenesis ialah untuk *supply* nutrient bagi embrio. Pada perkembangan ini juga tampak adanya benjolan (Gambar 3 D). benjolan awal yang tumbuh menjadi struktur *ridge* pada bagian dorsal atau seperti jambul yang menutupi bagian dorsal embrio. Kemudian benjolan kedua terbentuk yang berseberangan dengan benjolan ke-satu dan di antara kedua benjolan tersebut terdapat seperti takik (gambar 4 D), sehingga pada perkembangan selanjutnya akan dihasilkan perkecambahan ke arah atas (dorsiventral). Skutelum terbentuk pada bagian lateral ke arah atas dari embrio, primordia akar dan primodial tunas terus mengalami pembelahan pada bagian ujung aksis embrio. Skutelum kemudian mengalami pembelahan dari benjolan menjadi seperti jambul yang memanjang sehingga perkembangan ini dikenal dengan fase skutelar (Gambar 4 E).

Perkembangan lain dalam fase SE ditemukan adanya penambahan kemunculan embrio globular yang dinamakan somatik embriogenesis sekunder yang terinduksi dari embrio sebelumnya dan terbentuk di atas embrio sebelumnya

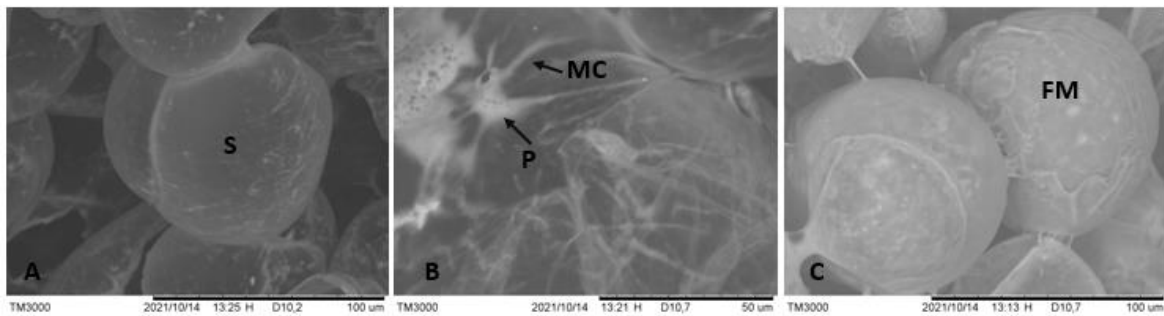
atau embrio primer (Gambar 4 F). Strukturnya menyerupai jambul pada fase skutelar yang terus berkembang menjadi lebih panjang dan besar kemudian proses ini dinamakan fase kوليوptilar. Perkembangan selanjutnya terlihat di bagian kutub plumula pada embrio terbentuk tunas serta primordial daun (Gambar 4 G).

Scanning Electron Microscopy (SEM)

SEM adalah mikroskop elektron yang dapat menghasilkan sampel gambar melalui cara melakukan pemindaian terhadap permukaan dengan berkas elektron terfokus. Elektron berinteraksi terhadap atom pada sampel, kemudian menghasilkan beragam sinyal yang berisikan informasi terkait topografi permukaan serta komposisi sampel. Analisa SEM bertujuan untuk menjelaskan

lebih lanjut tentang bukti morfologis dan lebih berfokus pada visualisasi struktur nano permukaan embrio, serta mencakup area pandang yang lebih luas, dengan resolusi yang sesuai. Salah satu aspek penting tidak hanya kuantifikasi morfologi tetapi juga kuantifikasi struktur permukaan pada setiap tahapan.

Analisis SEM pada penelitian ini untuk melihat penggambaran pada setiap tahapan struktur kalus yang lebih jelas dengan skala perbesaran yang lebih besar. Analisis dilakukan pada kalus embriogenik yang sudah memiliki fase absolut karena pada saat analisis bagian-bagian struktur pada tiap fase terlihat lebih jelas dan analisis ini dilakukan pada kalus berumur 90 hari. Struktur pre-embrio pada tahap transisi awal ditemukan pada kalus tanaman porang berumur 22 hari terlihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Penampakan Hasil Scanning elektron mikroskop. A. sel pre-embriomas, S = Struktur permukaan halus. B. Embrio somatik tahap transisi awal, P = Proyeksi, MC= Mikrofilbril selulosa. C. Embrio somatik tahap transisi akhir dimana sudah dipenuhi dengan selulosa penyusun dinding sel yang berupa benang-benang makromolekul dan tersambung berbentuk jala yang letaknya serong dan sejajar satu sama lain (FM = bahan berserat.)

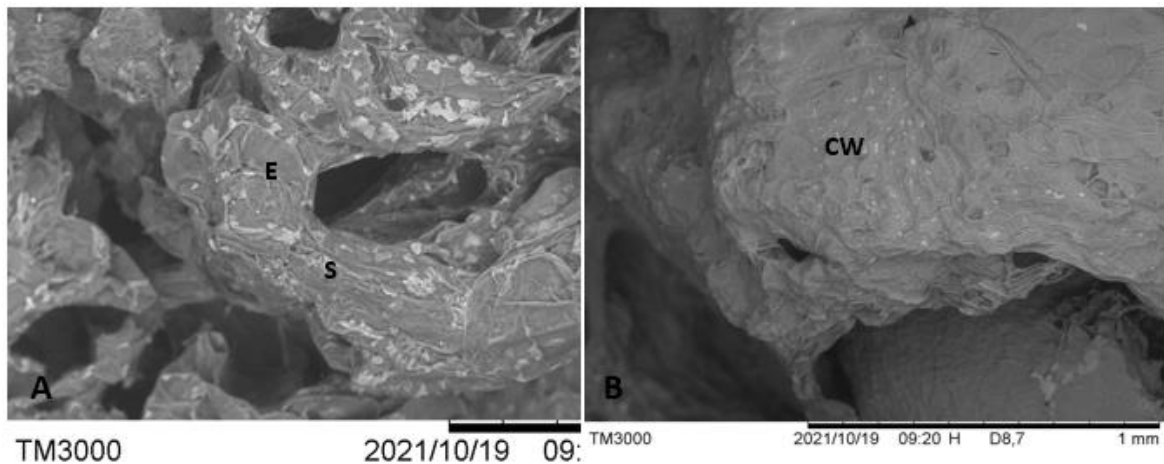
Figure 5. The result of Scanning Electron Microscope. A. pre-embryonic cells, S = Smooth surface structure. B. Early transition stage somatic embryos, P = projections, MC = cellulose microfibrils. C. The somatic embryo in the final transitional stage is filled with cellulose that composes the cell wall which consists of micelles in the form of macromolecular threads and is interconnected in form of nets that is located oblique and parallel to each other (FM = fibrous material).

Struktur embrio somatik pada tanaman porang memiliki karakter tersendiri pada permukaan dinding selnya yaitu permukaan sel pre embrio halus

(Gambar 5 A). Transisi awal embrio globular yang terdapat tonjolan-tonjolan halus yang dihubungkan dengan mikrofilbril selulosa pada permukaannya

(Gambar 5 B). (Chahal et al., 1998) Dinding primer memiliki ketebalan 0.1 sampai 0.2 μ m yang memiliki kandungan jaringan mikrofibril selulosa yang mengelilingi dinding sekunder yang relatif lebih tebal. Pada kalus berumur 120 hari embrio berada pada tahap transisi akhir dengan permukaan tertutup oleh bahan fibrillar (Gambar 5 C). Fibrillar ialah dinding sel yang tersusun dari selulosa, dimana pada dinding sel terbentuk benang benang makromolekul yang tersambung seperti jala dan letaknya sejajar atau serong satu sama lainnya, hal ini merupakan misel atau selulosa mikrofibril. Misel ini teranyam pada bagian permukaan dinding

sel. Pembelahan selanjutnya terjadi penebalan misel namun memiliki arah yang berlawanan dengan yang awal. Mikrofibril selulosa ini berbentuk seperti pipa dan terdapat rongga atau lubang, pada lubang ini air dan zat-zat terlarut di dalamnya, yang mengakibatkan dinding sel membesar dan terjadi penebalan baru. Sel yang berkembang tumbuh dan memanjang dengan struktur misel terbentang lebar, pembelahan dinding sel ini terus berjalan. Hasil pada tahapan transisi akhir pada kalus SE, embrio berkembang menjadi embrio globular dengan permukaan embrio tertutupi oleh dinding sel baru. terlihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Penampakan Hasil Scanning elektron mikroskop embrio globular, E= Embryo, S=Suspensor, CW= Dinding sel.

Figure 6. The result of the scanning electron microscope of the globular embryo, E= Embryo, S=Suspensor, CW= Cell wall.

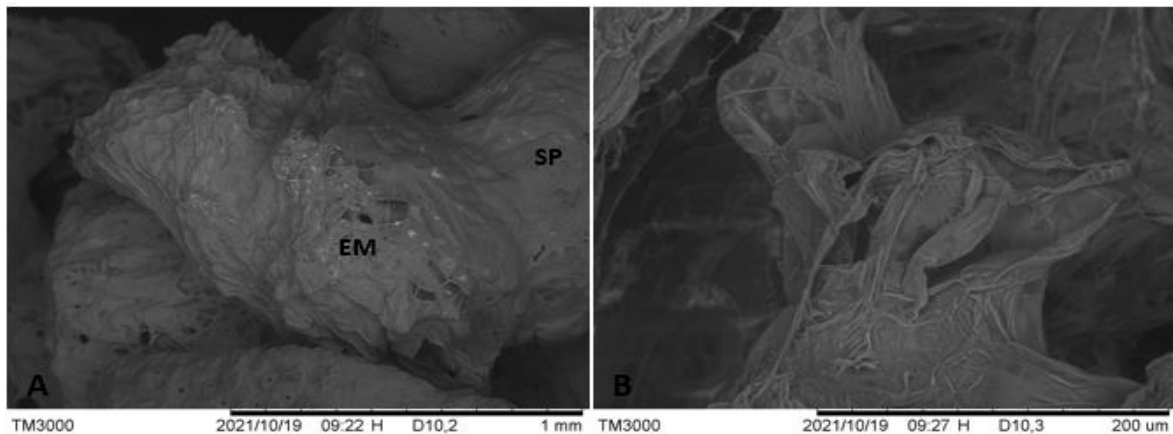
Pada Gambar 6 A, embrio globular mengalami pemanjangan dan membentuk struktur suspensor di dasar embrio, ini menunjukkan bahwa embrio somatik berasal dari *single cell*. Hal ini yang menyebabkan variasi somaklonal berkurang sehingga ini menjadikan keuntungan dalam transformasi genetik tanaman (Williams & Maheswaran, 1986). Struktur permukaan embrio globular yang telah ditutupi oleh dinding sel baru terlihat pada Gambar 6 B. Perubahan dinding sel merupakan penanda *in vivo* dari kompetensi embriogenik dalam kultur

daun tanaman porang, pembentukan bahan fibrilar pada permukaan struktur nodular yang kemudian digantikan oleh deposisi dinding sel sekunder (cutin). Perubahan morfologi dinding sel diawali munculnya struktur seperti jala pada embrio somatik globular. Struktur unik ini yang membedakan antara embrio somatik globular dari struktur nodular di organogenesis.

Kalus yang berumur 120 hari memasuki transisi akhir membentuk embrio yang matang dengan ditandai adanya tekstur kalus yang sudah membentuk

seperti gundukan dengan warna kuning kehijauan. Carsono et al., (2021) mengemukakan bahwasanya keberadaan klorofil pada jaringan, kalus yang semakin mempunyai warna hijau maka kandungan klorofilnya juga semakin banyak. Berlandaskan dari hasil penelitian, warna yang mendominasi pada penelitian ini

yakni warna kuning keputihan. Kalus yang mempunyai warna putih ialah jaringan embrionik yang belum mempunyai kandungan klorofil, namun mempunyai kandungan butir pati yakni polisakarida simpanan dalam tumbuhan, yang disajikan pada Gambar 7.



Gambar 7. Penampakan Hasil Scanning elektron mikroskop embrio matang porang. A. EM= Embrio matang, S=Suspensor. B. embrio somatik kotiledon tunggal.

Figure 7. The result of the scanning electron microscopy of a mature embryo of porang. A. EM = mature embryo, S = suspension. B. single cotyledon somatic embryo.

Pada gambar 7 terlihat bahwa perubahan struktur permukaan embrio sudah matang dimana pada bagian apikal embrio perkembangan akan dihasilkan perkecambahan ke arah atas (dorsiventral). Skutelum terbentuk pada bagian lateral ke arah atas dari embrio Diferensiasi dinding sel ditandai dengan kerusakan dan pemulihan dinding sel. Seperti yang dijelaskan oleh Donowarti et al., (2021) bahwa diferensiasi dinding sel ditunjukkan oleh pembentukan mikrofibril selulosa baru. Dalam 120 hari kultur embrio telah matang (Gambar 7 A) struktur permukaannya tidak mengalami perubahan atau telah stabil, tetapi embrio mengalami pemanjangan. Selain itu, embrio pada tahap kotiledon tunggal juga ditemukan dan permukaannya telah stabil (tidak ada lagi kerusakan dan pemulihan dinding sel) karena embrio kotiledon matang dan

tunggal adalah satu individu baru (Gambar 7 B).

KESIMPULAN

Perlakuan hormon dan konsentrasi yang optimal dalam menginduksi kalus tanaman porang ialah perlakuan 1 ppm 24-D + 1.5 ppm NAA. Tahapan SE pada tanaman porang diawali dengan adanya pre-embriomas pada umur 20 hari, embrio globular pada umur 24 hari bersamaan dengan adanya kalus embriogenik, embrio skutelar umur 37 hari, embrio kوليوptilar umur 56 hari, primordia tunas pada umur 84 - 90 hari, dan pada umur 110 -120 hari membentuk individu baru. Hasil analisis histologi dan SEM mendapatkan kalus dengan struktur permukaan embrio yang halus, sel embriogenik dengan inti yang jelas berukuran besar dan kecil, sitoplasmanya padat dan memiliki karakteristik pada setiap perkembangan

embrio somatik seperti dinding sel, proyeksi, pembentukan mikrofibril, suspensor, embrio globular yang dikelilingi oleh bahan berserat, embrio skutelar, embrio matang dengan struktur permukaan yang padat, dan embrio kوليوptilar.

DAFTAR PUSTAKA

- Abe, T., & Futsuhara, Y. (1989). Selection of higher regenerative callus and change in isozyme pattern in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 78(5), 648–652.
- Abe, Toshinori, & Futsuhara, Y. (1985). Efficient Plant Regeneration by Somatic Embryogenesis from Root Callus Tissues of Rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Physiology*, 121(2), 111–118.
- Barua, S., Tudu, K., Rakshit, M., & Srivastav, P. P. (2021). Characterization and digestogram modeling of modified elephant foot yam (*Amorphophallus paeoniifolius*) starch using ultrasonic pretreated autoclaving. *Journal of Food Process Engineering*, 44(11), e13841.
- Carsono, N., Juwendah, E., Liberty, Sari, S., Damayanti, F., & Rachmadi, M. (2021). Optimize 2,4-D concentration and callus induction time enhance callus proliferation and plant regeneration of three rice genotypes. *Biodiversitas*, 22(7), 2555–2560.
- Chahal, P., Tummala, R. R., Allen, M. G., & Swaminathan, M. (1998). A novel integrated decoupling capacitor for MCM-L technology. *IEEE Transactions on Components Packaging and Manufacturing Technology Part B*, 21(2), 184–192.
- de Araújo Silva-Cardoso, I. M., Meira, F. S., Gomes, A. C. M. M., & Scherwinski-Pereira, J. E. (2020). Histology, histochemistry and ultrastructure of pre-embryogenic cells determined for direct somatic embryogenesis in the palm tree *Syagrus oleracea*. *Physiologia Plantarum*, 168(4), 845–875.
- Gunowarti, I., Widjanarko, S. B., Yuniarta, Y., & Pudjiastuti, P. (2021). ACUTE TOXICITY TEST OF LOW CALCIUM OXALATE PORANG (*Amorphophallus muelleri* BLUME) FLOUR. *Iraqi Journal of Agricultural Sciences*, 52(1), 218–231.
- Gurme, S. T., Jadhav, P. P., Pawar, K. D., Bapat, V. A., & Jadhav, J. P. (2018). Somatic embryogenesis and evaluation of genetic fidelity in *Amorphophallus paeoniifolius* (Dennst.) Nicolson. *Journal of Crop Improvement*, 32(6), 801–811.
- Harijati, N., & Mastuti, R. (2014). Estimation of Diverse Porang (*Amorphophallus Muelleri* Blume) Age in Forest Are Based on Branching Pattern of Leaf Petiolule. *Research Journal of Life Science*, 1(1), 20–26.
- Hernández-Piedra, G., Ruiz-Carrera, V., Sánchez, A. J., Hernández-Franyutti, A., & Azpeitia-Morales, A. (2018). Morpho-histological development of the somatic embryos of *Typha domingensis*. *PeerJ*, 2018(11), e5952.
- Hidayat, R., & Purwadi. (2021). Pengembangan Inovasi Pembibitan Porang (*Amorphophallus Onchophyllus* L.). *Seminar Nasional Dalam Rangka Dies Natalis Ke-45 UNS*, 5(1), 495–508.
- Ibrahim, M. S. D. (2019). PERBANYAKAN ILES-ILES (*Amorphophallus* spp.) SECARA KONVENSIONAL DAN KULTUR IN VITRO SERTA STRATEGI PENGEMBANGANNYA Conventional Propagation and *In vitro* Culture of Iles-Iles (*Amorphophallus*spp.) and Its Development Strategy. *Perspektif*, 18(1), 67.
- Karyanti, ., & Kartini, M. (2017). PENGARUH THIDIAZURON DAN HIDROLISAT KASEIN TERHADAP MULTIPLIKASI TUNAS SATOIMO (*Colocasia esculenta* (L.) Schott var *antiquorum*) SECARA IN VITRO. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBi)*, 4(2), 17.
- Lee, K. S., Zapata-Arias, F. J., Brunner, H., & Afza, R. (1997). Histology of somatic

- embryo initiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* spp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51(1), 1–8.
- Lontoh, A. P., Santosa, E., Kurniawati, A., & Sari, A. M. (2019). Yield Evaluation of Selected Clones Apomictic Iles-Iles (*Amorphophallus muelleri* Blume) on Second Growing Period. *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*, 47(2), 171–179.
- Restanto, D. P., Wiranegara, A., Dewanti, P., Kristanto, B., & Avivi, S. (2021). Pengaruh hormon 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid Terhadap Induksi Kalus Tanaman Sorgum (*Sorghum bicolor* (L.)). *Agritop*, 19(1), 12–18.
- Santosa, E. (2015). PENGEMBANGAN TANAMAN ILES-ILES TUMPANGSARI UNTUK KESEJAHTERAAN PETANI DAN KEMANDIRIAN INDUSTRI PANGAN NASIONAL. *RISALAH KEBIJAKAN PERTANIAN DAN LINGKUNGAN: Rumusan Kajian Strategis Bidang Pertanian Dan Lingkungan*, 1(2), 73.
- Silvia, M., Hazmi, M., Murtiyaningsih, H., & Arum, L. S. (2021). Regenerasi Sorgum (*Sorghum bicolor*) melalui Kultur *In vitro*. *JURNAL BUDIDAYA PERTANIAN*, 17(1), 68–75.
- SUMARWOTO, S. (1970). Iles-iles (*Amorphophallus muelleri* Blume); description and other characteristics. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 6(3).
- Taylor, M. G., & Vasil, I. K. (1996). The ultrastructure of somatic embryo development in pearl millet (*Pennisetum glaucum*; Poaceae). *American Journal of Botany*, 83(1), 28–44.
- Williams, E. G., & Maheswaran, G. (1986). Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. In *Annals of Botany* (Vol. 57, Issue 4, pp. 443–462). Oxford University Press.
- Zhong, L., Liu, E., Yang, C., Jin, S., Diao, Y., & Hu, Z. (2017). High embryogenic ability and regeneration from floral axis of *Amorphophallus konjac* (Araceae). *Open Life Sciences*, 12(1), 34–41.