



## Induksi Somatic Embriogenesis dan Kultur Suspensi Sel pada Tanaman Porang (*Amorphophallus muelleri* Blume)

*Induction of Somatic Embryogenesis and Cell Suspension Culture in Amorphophallus muelleri* Blume

Author(s): Veronenci Yuliarbi Farlisa<sup>(1)</sup>; Parawita Dewanti<sup>(1)</sup>; Kacung Hariyono<sup>(1)</sup>; Tri Handoyo<sup>(1)</sup>; Didik Pudji Restanto<sup>(1)\*</sup>

<sup>(1)</sup> Universitas Jember

\* Corresponding author: [restanto.lemlit@unej.ac.id](mailto:restanto.lemlit@unej.ac.id)

Submitted: 7 Dec 2021

Accepted: 4 Jun 2022

Published: 30 Sep 2022

### ABSTRAK

Porang adalah tanaman yang tumbuh di daerah tropis dibawah tegakan hutan. Porang termasuk tanaman komersial banyak diminati oleh masyarakat karena mengandung glukomanan yang cukup tinggi. Kebutuhan bibit melalui katak dan umbi relative mahal dalam budidaya porang sehingga dengan pendekatan kultur jaringan melalui Somatic Embryogenesis (SE) dan suspensi sel untuk perbanyakkan masal bibit porang sangat memungkinkan. Hasil SE digunakan untuk kultur suspensi sel agar menghasilkan bibit dalam jumlah banyak. Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan SE dalam jumlah banyak sebagai bahan kultur suspensi sel. Perbanyakkan SE menggunakan Rancangan Acak lengkap (RAL) factorial, factor pertama konsentrasi NAA dengan konsentrasi 0,5 ppm, 1 ppm, dan 1,5 ppm. Factor kedua konsentrasi 2,4-D konsentrasi 1 ppm dan 2 ppm sehingga terdapat 6 kombinasi perlakuan diulang sebanyak 4 kali. Hasil SE terbaik selanjutnya dikultur suspensi sel menggunakan hormon NAA 0,25 ml di-shaker selama 8 minggu diinkubasi pada kondisi gelap. Parameter pengamatan terdiri dari kedinian munculnya kalus, persentase kalus, struktur, warna kalus, proliferasi kalus, histologi kalus, respon hasil suspensi, proliferasi kalus hasil kultur suspensi. Data dianalisis menggunakan DMRT pada taraf 5%, sedangkan parameter suspensi sel dianalisis secara deskriptif. Hasil penelitian SE terbaik pada perlakuan kombinasi 1 ppm NAA + 2 ppm 2,4-D menghasilkan persentase kalus tertinggi yaitu 90%, warna kalus dengan skoring 5Y 8/6 berwarna putih susu yang remah. Hasil kultur suspensi menggunakan hormon NAA dengan konsesntansi 0,25 ppm menunjukkan pertumbuhan kalus tertinggi yaitu dengan menghitung volume endapan kalus terjadi pada fase eksponensial (7 minggu inkubasi) mencapai 3,67 ml.

### Kata Kunci:

2,4-D;  
NAA;  
Kultur suspensi sel;  
Somatik Embryogenesis (SE);  
Tanaman porang

### ABSTRACT

#### Keywords:

2,4-D;  
Cell suspension culture;  
NAA;  
Porang;  
Somatic Embryogenesis (SE)

*Porang is a plant that grows in the tropics under forest stands. Porang is a commercial plant in great demand by the public because it contains high levels of glucomannan. The need for seeds through bulbils and tubers is relatively expensive in porang cultivation so the tissue culture approach through Somatic Embryogenesis (SE) and cell suspension for mass propagation of porang seedlings are possible. SE results were used for cell suspension culture to produce large seedlings. This study aims to produce large amounts of SE as a cell suspension culture material. Propagation of SE used a factorial completely randomized design (CRD), the first factor being the concentration of NAA with a concentration of 0.5 ppm, 1 ppm, and 1.5 ppm. The second factor was the concentration of 2,4-D with a concentration of 1 ppm and 2 ppm so there were 6 treatment combinations repeated 4 times. The best SE results were cultured with cell suspension using 0.25 ml of NAA hormone in a shaker for 8 weeks and incubated in the dark. Observation parameters consisted of early callus emergence, callus percentage, structure, callus color, callus proliferation, callus histology, suspension response, and callus proliferation resulting from suspension culture. Data were analyzed using the DMRT at the 5% level, while the cell suspension parameters were analyzed descriptively. The results of the best SE research on the combination treatment of 1 ppm NAA + 2 ppm 2,4-D resulted in the highest callus percentage, namely 90%, and the color of callus with a score of 5Y 8/6 was milky-whitely crumbs. The results of suspension culture using NAA hormone with a concentration of 0.25 ppm showed the highest callus growth by calculating the volume of callus deposits that occurred in the exponential phase (7 weeks of incubation) reaching 3.67 ml.*



## PENDAHULUAN

Porang (*Amorphophallus muelleri*) berasal dari family Aracea, termasuk tanaman komersial karena memiliki kandungan glukomanan yang tinggi, digunakan sebagai bahan baku pangan, kosmetik dan kegiatan farmasi (Ibrahim, 2019). Tanaman porang mampu tumbuh dan berkembang pada kondisi iklim tropis dalam kondisi lingkungan dengan intensitas penyinaran yang rendah seperti halnya pada wilayah hutan, perkebunan, agroforestri dan ladang campuran (Santosa et al., 2017). Tanaman porang memiliki karakteristik yang unik yaitu terdapat umbi katak pada ketiak daun dan pertumbuhannya memiliki fase dorman pada waktu tertentu. Penanaman porang saat ini masih menggunakan bulbil atau umbi mini sebagai bahan tanam, akan tetapi harga yang mahal menjadikan masalah bagi petani porang.

Permasalahan ketersediaan bahan tanam porang untuk memenuhi ketersediaan bibit dapat diatasi dengan perbanyak tanaman melalui kultur jaringan. Perbanyak kultur jaringan berasal dari bagian terkecil dari organ tanaman seperti pada bagian tulang daun, batang, sel tanaman hingga bagian lainnya. Perbanyak melalui teknik kultur jaringan dapat dilakukan dengan pembentukan *somatic embryogenesis* (SE), karena mengandung sel *somatic* yang terus berkembang. Perkembangan SE melalui tahapan dediferensiasi kemudian menjadi sel induk dengan kondisi yang sesuai maka akan terjadi deferensiasi (Hapsoro et al., 2020). Sel SE digunakan sebagai bahan mikropropagasi tanaman, proliferasi tanaman lebih cepat, transformasi genetik untuk perbaikan sifat dan perbanyak bibit melalui kultur suspensi sel (Faisal et al., 2021).

Produksi SE meningkat dipengaruhi oleh penggunaan hormon yang sesuai terhadap perkembangan sel *somatic*, yang menggunakan hormon dari golongan

auksin yaitu 2,4-D dan NAA. Menurut Zhong et al. (2017) induksi tanaman porang berdasarkan persentase induksi kalus mencapai 79,8% dengan media MS dengan tambahan 9,04  $\mu$ M 2,4-D dan 5,37  $\mu$ M NAA. Peran auksin digunakan untuk menginduksi kalus agar membentuk sel embriogenik dalam jumlah tinggi, hal ini dipengaruhi oleh aktivitas gen yang mengalami diferensiasi sehingga terjadi pembelahan sel secara terus menerus (Reflini, 2017). Hasil penelitian Liang et al. (2020) menunjukkan perkembangan eksplan daun *Scaevola sericea* menggunakan hormon 2,4-D konsentrasi 0,5 hingga 2,5 mg/L menghasilkan kalus embrionik dengan warna kuning.

Kalus embriogenik diperbanyak melalui metode suspensi sel, yang bertujuan agar seluruh permukaan sel terdispersi oleh hormon auksin untuk mempercepat pertumbuhan sel (Santos-Ballardo et al., 2019). Penelitian kultur suspensi sel tanaman *A.muelleri* menggunakan hormon NAA 0,25 mg/L memproduksi kalus lebih banyak, akan tetapi hasil kultur suspensi digunakan sebagai metabolit sekunder (Chotigamas et al., 2009). Menurut penelitian Thorat et al. (2017), hasil kultur suspensi sel pada tanaman *Saccharum officinarum* L. dapat diregenerasikan menjadi bibit baru dalam jumlah banyak. Menurut Ramulifho et al. (2019) kultur suspensi sel tanaman *Shorghum bicolor* menunjukkan pertumbuhan sel mengandung kurang lebih 15 hingga 20% cell volume (SCV) merupakan metode persentase volume suspensi yang ditempati masa sel, menggunakan hormon auksin berupa NAA 2,5 mg/L dan 2,4-D 3 mg/L. Tujuan penelitian ini untuk memperoleh kualitas SE yang baik dalam jumlah banyak yang digunakan sebagai kultur suspensi sel untuk diregenerasikan.

## METODOLOGI

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, Program studi Agronomi, Fakultas Pertanian Universitas Jember, Jawa Timur. Bahan tanam yang digunakan antara lain adalah eksplan kuncup daun tanaman porang, Murashige dan skoog (MS) basal, hormon 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) dan 1-Naphthaleneacetic acid (NAA), bakto agar, sukrosa, *Sodium hypochlorite* (7,4%), dan aquades. Alat yang digunakan meliputi neraca analitik, autoklaf, laminar air flow, pinset, *scalpel* dan mikroskop Leica. Rancangan penelitian ini menggunakan RAL faktorial dengan 6 kombinasi perlakuan yaitu NAA 0,5 ppm + 2,4-D 1ppm, NAA 1 ppm + 2,4-D 1 ppm, NAA 1,5 ppm + 2,4-D 1 ppm, NAA 0,5 ppm + 2,4-D 2 ppm, NAA 1 ppm + 2,4-D 2 ppm, NAA 1,5 ppm + 2,4-D 2 ppm yang diulang sebanyak 4 kali. Media induksi SE menggunakan MS phytoTech lab dengan konsentrasi 4,43 g/l dengan menambahkan sukrosa sebanyak 30 g/l, hormon NAA dan 2,4-D sesuai dengan perlakuan, dengan pH media 5,8 dan agar sebanyak 8 g/l. Hormon yang digunakan untuk kultur suspensi yaitu 0,25 ppm NAA. Sterilisasi menggunakan autoklaf dengan tekanan 17,5 psi selama 45 menit.

Eksplan daun *A. muelleri* dicuci menggunakan detergen dibilas menggunakan air mengalir bertujuan agar kotoran yang menempel dibagian permukaan eksplan daun hilang. Eksplan daun *A.muelleri* di dalam laminar air flow disterilkan menggunakan larutan *Sodium hypochlorite* (7,4%), kemudian digojok selama 3 menit, dan dibilas menggunakan aquades sebanyak 3 kali. Eksplan yang telah dipotong dimasukkan ke dalam media induksi sesuai perlakuan. Botol kultur induksi diletakkan di ruang inkubasi dengan suhu 22-26°C dengan adanya pencahayaan 1.500 Lux selama 16

jam/hari. Induksi kalus diamati setiap hari selama 30 hari.

Kalus yang membentuk SE pada fase globular dipindahkan pada media suspensi dengan 0,25 ppm NAA. Pemeliharaan suspensi ditempatkan pada ruang gelap dengan suhu 22-26°C dan digojok menggunakan shaker dengan kecepatan 120 rpm selama 2 bulan. Pengamatan yang dilakukan meliputi: kedinian munculnya kalus (pengamatan dilakukan sejak awal penanaman eksplan hingga eksplan muncul kalus), warna kalus hasil induksi yang diamati menggunakan munsell color chart dan struktur kalus, proliferasi kalus yang diamati menggunakan mikroskop stereo leica EZ4 HD, pengamatan histologi, respon pertumbuhan suspensi dengan mengamati endapan kalus dan pengamatan morfologi dan anatomi hasil suspensi melalui *Scanning Electron Microscopy* (SEM), dan persentase kalus dengan rumus:

$$\frac{\Sigma \text{ eksplan yang tumbuh kalus}}{\Sigma \text{ seluruh eksplan}} \times 100\%$$

Data dianalisis menggunakan ANOVA (Analisis ragam) apabila terdapat perbedaan antar perlakuan diuji lanjut dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5%.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kedinian munculnya kalus

Kedinian munculnya kalus merupakan tahap awal perkembangan kalus pada kultur jaringan. Komposisi media hormon yang sesuai ditandai dengan lama terbentuknya kalus pada eksplan daun. Bagian eksplan yang mengalami bekas luka terjadi pembengkakan, sehingga membuat bagian jaringan mengalami penebalan disebabkan oleh aktivitas pembelahan sel. Kedinian munculnya kalus terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kedinian munculnya kalus dengan beberapa konsentrasi NAA dan 2,4-D  
 Table 1. Days to callus appearance in different concentrations of NAA and 2,4-D

Konsentrasi Hormon <i>Hormone Concentrations</i>	Kedinian munculnya kalus (hari) <i>Appearance of callus (day)</i>
0,5 ppm NAA + 1 ppm 2,4-D	26,50±1,29 c
1 ppm NAA + 1 ppm 2,4-D	22,50±1,29 ab
1,5 ppm NAA + 1 ppm 2,4-D	22,75±1,71 ab
0,5 ppm NAA + 2 ppm 2,4-D	23,50±1,29 ab
1 ppm NAA + 2 ppm 2,4-D	21,50±1,29 a
1,5 ppm NAA + 2 ppm 2,4-D	23,75±1,26 b

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata pada uji DMRT taraf 5%.  
 Remarks: Numbers followed by the same alphabet show significant different based on DMRT at 5%.

Hasil Tabel 1 menunjukkan kedinian munculnya kalus lebih cepat pada perlakuan 1 ppm NAA + 2 ppm 2,4-D dengan rata-rata pertumbuhan 21,5 HST. Pembentukan kalus paling lama pada perlakuan A1 0,5 ppm NAA + 1 ppm 2,4-D dengan rata-rata 26,5 HST. Induksi kalus paling lama dipengaruhi oleh penggunaan hormon auksin tidak seimbang karena penggunaan NAA rendah yaitu 0,5 ppm, sedangkan penggunaan hormon 2,4-D lebih tinggi.

Hasil penelitian Bhati et al., (2017) menunjukkan penggunaan hormon auksin 2,4-D dan NAA yang sesuai pada tanaman *Phoenix dactylifera* mampu meningkatkan pembelahan dan pemanjangan sel sehingga membentuk kalus lebih cepat karena dapat menekan proses morfogenesis. Kombinasi konsentrasi hormon auksin yang sesuai mampu merangsang pembelahan sel lebih

cepat, hal ini disebabkan oleh adanya perpaduan efektivitas eksogen berasal dari hormon auksin dan pengaruh endogen dari jaringan tanaman (Rasud & Bustaman, 2020). Pertambahan ukuran dan pertumbuhan sel PEM (*proembryonic mass*) dipengaruhi oleh kemampuan eksplan menyerap air dan unsur hara (Ibrahim et al., 2016). PEM merupakan sekumpulan agregat sel yang bersifat meristematik, ikatan sel pada kondisi PEM mudah untuk dilepaskan, sehingga PEM berkembang menjadi somatic embryogenesis (Egertsdotter, 2019).

#### Persentase kalus

Tahap awal perkembangan SE ditandai dengan pembentukan kalus, hasil pengamatan persentase kalus selama 60 hari pada kombinasi NAA dan 2,4-D berpengaruh nyata terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Persentase kalus yang terbentuk di media induksi dengan penambahan NAA dan 2,4-D

Table 2. Percentage of callus formed in the induction medium with the addition of NAA and 2,4-D

Perlakuan <i>Treatment</i>	Persentase kalus (%) <i>Callus percentage (%)</i>
0,5 ppm NAA + 1 ppm 2,4-D	80±16,33 ab
1 ppm NAA + 1 ppm 2,4-D	75±19,15 ab
1,5 ppm NAA + 1 ppm 2,4-D	85±10,00 ab
0,5 ppm NAA + 2 ppm 2,4-D	65±10,00 bc
1 ppm NAA + 2 ppm 2,4-D	90±11,55 a
1,5 ppm NAA + 2 ppm 2,4-D	55±19,15 c

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata pada uji DMRT taraf 5%.

Remarks: Numbers followed by the same alphabet show significant different based on DMRT 5%

Jaringan kalus terdiri dari kumpulan sel parenkim yang memiliki bentuk tidak beraturan tumbuh pada bagian luka eksplan. Pada Tabel 2, persentase kalus tertinggi pada perlakuan kombinasi 1 ppm NAA + 2 ppm 2,4-D mencapai 90%. Menurut penelitian Budisantoso et al. (2017), konsentrasi 2 ppm 2,4-D menghasilkan persentase pembentukan kalus terbaik pada tanaman *Phaleonopsis* sp dengan rata-rata 83,3%. Konsentrasi hormon auksin (NAA dan 2,4-D) pada perlakuan tertinggi efektif dalam pembentukan SE, konsentrasi hormon 2,4-D yang tinggi memiliki peran untuk merangsang pembelahan dan pembesaran sel dalam pembentukan kalus. Hormon auksin dapat meningkatkan pembelahan sel setelah mengalami proses diferensiasi

selanjutnya akan kembali pada proses awal pertumbuhan. Perlakuan 1,5 ppm NAA dan 2 ppm 2,4-D menunjukkan nilai rerata persentase kalus terendah sebesar 55%, hal ini disebabkan penggunaan hormon NAA lebih tinggi. Hasil penelitian (Bhati et al., 2017) menyatakan konsentrasi NAA dan 2,4-D yang tinggi mampu menekan perkembangan kalus, sehingga respon pembentukan kalus mengalami kemunduran.

### Struktur dan warna kalus

Hasil pengamatan induksi kalus berdasarkan warna dan struktur kalus terlihat pada Tabel 3 dengan pengamatan skoring warna menggunakan *Munsell Color Charts For Plants Tissues*.

Tabel 3. Warna dan struktur kalus dengan konsentrasi NAA dan 2,4-D

Table 3. Callus color and structure with concentration NAA and 2,4-D

Perlakuan <i>Treatments</i>	Warna <i>Color</i>	Struktur Kalus <i>Callus structure</i>
0,5 ppm NAA + 1 ppm 2,4-D	5Y 8/6 (Putih kekuningan)	Kompak
1 ppm NAA + 1 ppm 2,4-D	5Y 7/2 (Putih keabu-abuan)	Intermediet
1,5 ppm NAA + 1 ppm 2,4-D	5Y 8/6 (Putih kekuningan)	Remah
0,5 ppm NAA + 2 ppm 2,4-D	5Y 8/6 (Putih kekuningan)	Intermediet
1 ppm NAA + 2 ppm 2,4-D	5Y 8/6 (Putih kekuningan)	Remah
1,5 ppm NAA + 2 ppm 2,4-D	5Y 7/8 (Putih kuning kehijauan)	Kompak

Tabel 3 menunjukkan perlakuan 0,5 ppm NAA + 1 ppm 2,4-D, 1,5 ppm NAA + 1 ppm 2,4-D, 0,5 ppm NAA + 2 ppm 2,4-D dan 1 ppm NAA + 2 ppm 2,4-D menghasilkan warna kalus dengan sekoring 5Y 8/6 berwarna putih kekuningan. Indikator warna kalus digunakan untuk menentukan umur kalus yang mengalami pembelahan sel aktif atau sel mati, selain itu warna kalus di pengaruhi oleh konsentrasi hormon yang sesuai. Pertumbuhan dan berkembang kalus dipengaruhi oleh kandungan nutrisi yang cukup dan kondisi lingkungan yang sesuai seperti pencahayaan dan suhu. Warna kalus putih

keabu-abuan seperti pada perlakuan 1 ppm NAA + 1 ppm 2,4-D termasuk kalus dengan kualitas baik karena termasuk jaringan embrionik, dimana sel pada kalus aktif membelah, sehingga mudah untuk diperbanyak. Kualitas kalus yang baik mengandung pati dalam bentuk polisakarida berupa cadangan makanan yang dimiliki tumbuhan, selain itu belum terdapat kandungan kloroplas (Junairiah et al., 2018).

Kalus yang bersifat embriogenik dicirikan dengan struktur kalus yang bersifat remah seperti pada perlakuan 1,5 ppm NAA + 1 ppm 2,4-D dan 1 ppm NAA + 2

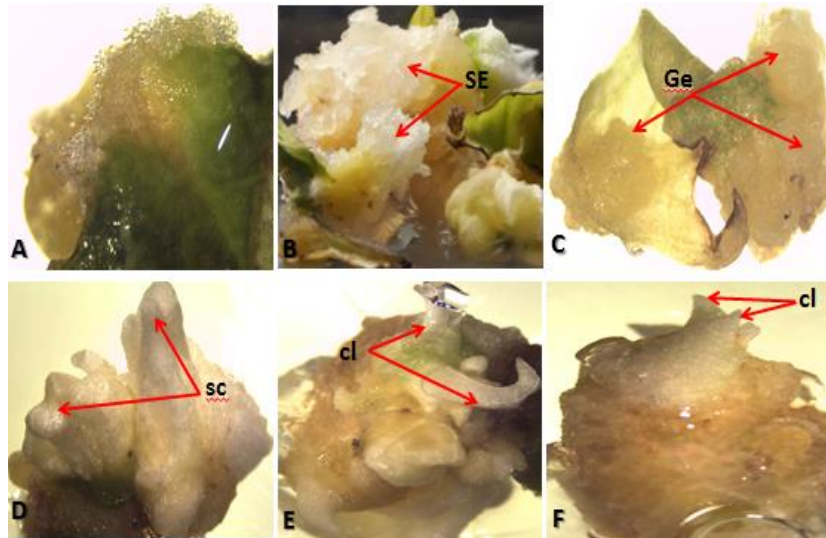
ppm 2,4-D. Kalus remah disebabkan sel mudah melepaskan menjadi sel tunggal, sehingga mudah digunakan perbanyakan masal dan kultur suspensi sel. Perlakuan terbaik NAA 1 ppm dan 2,4-D 2 ppm memperoleh kalus remah bersifat embrionik cukup tinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Penggunaan hormon auksin menyebabkan sel pada kalus menjadi longgar mempengaruhi peningkatan aerasi oksigen pada sel (Rasud & Bustaman, 2020). Perlakuan 0,5 ppm NAA + 1 ppm 2,4-D dan 1,5 ppm NAA + 2 ppm 2,4-D dengan konsentrasi hormon yang terlalu rendah dan tinggi memiliki tekstur lebih padat, keras karena terjadi proses lignifikasi yang disebabkan ketidaksesuaian hormon media. Kalus bersifat intermediet pada perlakuan 1 ppm NAA + 1 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm NAA + 2 ppm 2,4-D memiliki ciri-ciri yang unik yaitu sekumpulan sel kalus memiliki tekstur kompak dan *friable*/remah.

Kalus yang memiliki warna putih kekuningan dengan struktur kalus remah sebagai indikator sel masih aktif membelah memiliki potensi untuk proses proliferasi menghasilkan somatic embryogenesis. Pembentukan kalus saat fase pro embriogenik ditandai dengan bagian kalus berwarna putih bening seperti pada Gambar 1.A (pro embriogenik) tumbuh pada eksplan yang telah dilukai. Bentuk pro embriogenik ditandai dengan bentuk tekstur lebih rapuh, berwarna putih mengkilat dan warnanya seperti transparan, setelah kalus berumur kurang lebih dua minggu maka akan terbentuk fase globular (Alfian et al., 2019). Tanaman porang termasuk tanaman monokotil memiliki tahapan SE yang meliputi fase globular, skutelar, koleoptilar dan tunas.

Perkembangan fase globular tumbuh pada bagian permukaan kalus selanjutnya akan berkembangnya menjadi fase skutelar dan koleoptilar, pertumbuhan SE perkembangannya relatif lebih cepat ketika kalus pada fase globular disubkultur pada media baru.

### **Proliferasi kalus**

Kalus embriogenik disubkultur pada media sesuai perlakuan saat induksi kalus dan mengamati tahapan perkembangan SE agar tidak salah dalam mengambil fase globular yang akan digunakan sebagai bahan tanam kultur suspensi sel. Pengamatan proliferasi kalus pada perlakuan terbaik yaitu 1 ppm NAA dan 2 ppm 2,4-D membentuk fase globular. Perlakuan hormon 1,5 ppm NAA dan 2 ppm 2,4-D eksplan memasuki fase skutelar dengan struktur kalus lebih kompak dan membentuk fase coleoptilar (Gambar 1). Kalus *A. mueleri* yang telah memasuki fase skutelar memiliki struktur lebih kompak sehingga mudah menyesuaikan perubahan kondisi lingkungan baru dan mudah untuk proses subkultur. Media menggunakan hormon 2,4-D lebih tinggi meningkatkan produksi kalus muda, kalus muda memiliki peran aktif dalam pembelahan sel yang akan berkembang melalui pembentukan tunas. Menurut penelitian Restanto dkk. (2021), penggunaan hormon auksin pada tanaman anggrek mampu meningkatkan perkembangan PLB yang terus berkembang. Hormon pertumbuhan dipengaruhi oleh faktor eksogen dan endogen pada waktu subkultur kalus *Oryza sativa* lebih awal, sehingga mempercepat pembentukan kalus yang nantinya akan tumbuh menjadi tunas (Carsono et al., 2021).



Gambar 1. Tahapan kalus SE pada kombinasi NAA dan 2,4-D. A) *Pro Embryo Mass* (PEM). B) SE: kalus SE dengan konsentrasi 2,4-D 2ppm + NAA 1ppm. C) Ge: globular pada pembesaran mikroskop 10X dengan konsentrasi 2,4-D 2ppm + NAA 1ppm. D) sc: skutelar pada pembesaran mikroskop 10X, konsentrasi 2,4-D 2ppm + NAA 1,5 ppm. E-F) cl: koleoptilar pembesaran mikroskop 10X.

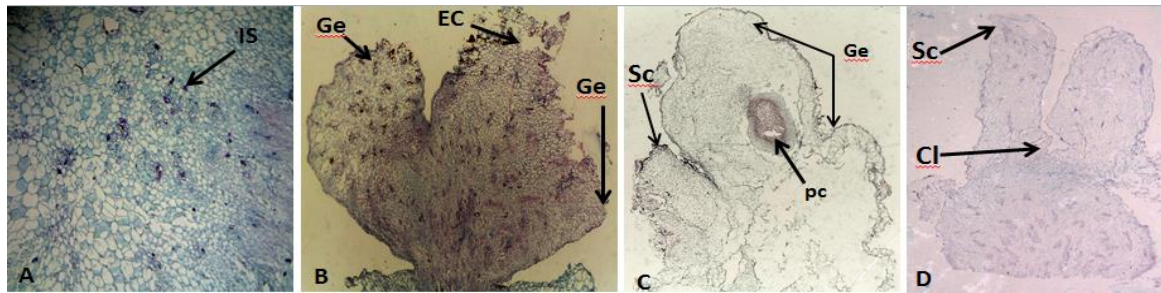
Figure 1. SE stages in the combination of NAA and 2,4-D. A) *Pro Embryo Mass* (PEM). B) SE: SE with concentration 2,4-D 2 ppm + NAA 1 ppm. C) Ge: globular at a magnification of 10X with 2,4-D 2 ppm + NAA 1 ppm. D) sc: Scutelar at a magnification of 10X with 2,4-D 2 ppm + NAA 1,5 ppm. E-F) cl: Coleoptilar at a magnification of 10X.

Pengamatan pada Gambar 1.C fase globular memiliki karakteristik nodul berbentuk bulat dengan tekstur *friable* berwarna hijau kekuningan. Fase skutelar pada Gambar 1.D memiliki bentuk lebih memanjang dengan bentuk menyerupai hati berwarna putih, bagian sel mulai memanjang dengan membuat tonjolan di ujung mulai terjadi proses deferensiasi yang akan berkembang menjadi koleoptilar. Fase koleoptilar sel memanjang mengandung sitoplasma mulai muncul meristem apikal sehingga bagian ujung lebih runcing akan berkembang

menjadi calon tunas karena akan muncul meristem perakaran. Hormon golongan auksin misalnya NAA dan 2,4-D memiliki peran untuk merangsang bagian sel, pembentukan kalus, pemanjangan tunas selain itu untuk merangsang pembedakan akar (Maulida et al., 2014).

### Histologi

Hasil pengamatan histologi terlihat pada Gambar 2, bagian jaringan sel embriogenik berkembang menjadi beberapa tahapan SE.



Gambar 2. Histologi pertumbuhan dan perkembangan kalus somatik embriogenesis. A) IS: inti sel. B) Ge: globular, EC: embriosomatik. C) Sc: scutelar, pc: procambial. D) Sc: scutelar, Cl: coleoptil.

Figure 2. Histology of growth and development somatik embryogenesis. A) IS: cell nucleus. B) Ge: globular, EC: somatic embryo. C) Sc: scutelar, pc: procambial. D) Sc: scutelar, Cl: colioptil.

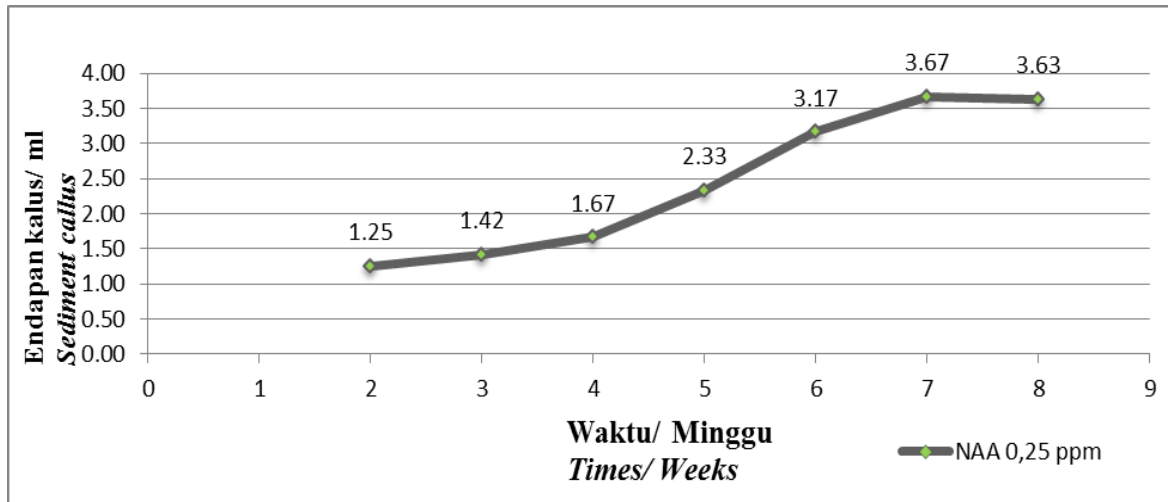
Pro embrionik seperti Gambar 2B menunjukkan embrio somatik bagain sel-selnya akan terus membelah dengan peran sitoplasma dan nucleus maka berkembang menjadi SE sehingga akan terbentuk fase globular. Pro embrionik membentuk SE sekunder diawali dengan fase globular berkembang melalui permukaan tepi kalus, yang terbentuk dari kumpulan sel yang mengalami pembelahan secara aktif peran suspensor (Bogdanović et al., 2021). Perkembangan fase globular menjadi fase skutelar ditunjukkan sel terus membelah, ditandai dengan bentuk tonjolan lebih memanjang membentuk skutelum (gambar 2C dan 2D). Bagian ujung memudahkan sel untuk terus membelah dengan interval pembelahan lebih cepat, selanjutnya akan berkembang menjadi fase koleoptilar. Bagian tepi sel terus membelah berubah menjadi calon meristem apikal membentuk

calon ujung batang mengandung materi seluler digunakan sebagai pertumbuhan menjadi planlet. Fase koleoptilar pada Gambar 2D sel mengalami pemanjangan bagian ujung berubah menjadi lebih kompak dan runcing terdapat meristem apikal untuk tumbuhnya tunas.

### Respon pertumbuhan hasil kultur suspensi

Respon pertumbuhan hasil kultur suspensi sel diamati dengan mengukur volume suspensi interval 7 hari sekali dengan mengukur volume endapan kalus yang diamati hingga minggu ke 8. Hasil pengukuran pertumbuhan sel terlihat pada kurva sigmoidal terdiri dari tiga fase yaitu fase lag, fase eksponensial dan fase stasioner (Gambar 3).



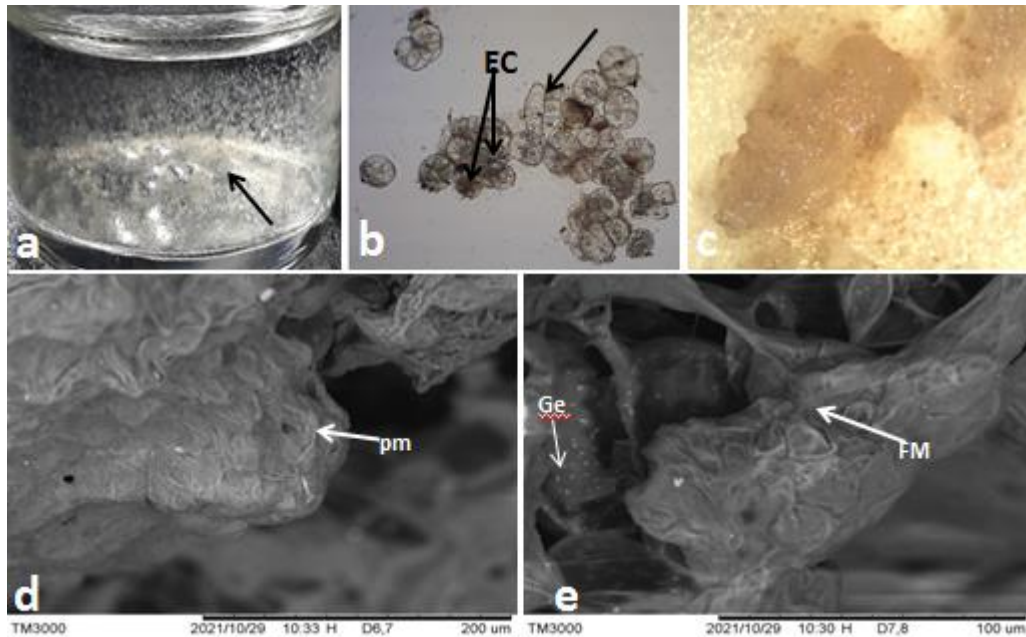


Gambar 3. Respon pertumbuhan hasil suspensi selama 8 minggu.

Figure 3. Growth response of suspension for 8 weeks.

Pengamatan Gambar 3, fase awal proliferasi suspensi hingga minggu ke dua mengalami fase lag merupakan fase awal pertumbuhan kalus. Fase eksponensial pertumbuhan kalus meningkat setiap minggunya, peningkatan kalus diawali minggu ke ketiga hingga minggu ke tujuh. Inokulum sel mengalami peningkatan pada minggu ke tujuh mencapai 3.67 ml. Memasuki fase eksponensial pertumbuhan sel meningkat disebabkan oleh sel aktif membelah, maka hasil suspensi dapat segera diregenerasikan pada media padat. Keberhasilan pertumbuhan kultur suspensi sel dipengaruhi oleh kualitas kalus yang digunakan, kepadatan sel, kondisi daya tumbuh sel tanaman dan spesies tanaman seperti pada tanaman porang. Pengamatan respon pertumbuhan suspensi berhenti pada minggu ke delapan dipengaruhi oleh dua kendala, di antaranya terjadi perubahan warna sel kalus menjadi kuning kecoklatan dan sel kalus pertumbuhannya stagnan bahkan menurun (Ramulifho et al., 2019).

Pengamatan hasil suspensi minggu ke delapan terlihat pada Gambar 4a, pertumbuhan kalus hasil suspensi berwarna putih susu (tanda panah) hal ini menandakan bahwa pertumbuhan sel porang tumbuh dan berkembang. Pengamatan anatomi sel dilakukan dengan memipet hasil kultur suspensi sel selanjutnya diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x. Gambar 4b menunjukkan sel embrionik dan sel non embrionik jumlahnya lebih sedikit. Sel embrionik memiliki karakteristik bentuk bulat ditandai dengan adanya inti sel sehingga terbentuk sekumpulan sel yang membentuk koloni selanjutnya membentuk jaringan. Sedangkan sel non embrionik mempunyai pertumbuhan selnya secara individu atau sel tunggal berbentuk silindris dan lambat dalam pembelahan sel (Thorat et al., 2017).



Gambar 4. Suspensi sel menggunakan NAA 0,25 ppm. a) kalus suspensi sel minggu ke 8 (panah hitam), b) sel suspensi perbesaran 40x, EC: embrionik dan NE: non embrionik c) kalus hasil suspensi pada media padat NAA 0,25 ppm, d-e) SEM hasil suspensi pm: *Pro Embryo Mass* (PEM), Ge: globular dan FM: fibrillar material.

Figure 4. Cell suspension with 0.25 ppm NAA. a) callus cell suspension 8 week, b) callus suspension at a magnification of 40x, EC: embryogenic and NE: non embryogenic, c) callus suspension on medium with 0.25 ppm NAA, d-e) SEM suspension results pm: *Pro Embryo Mass* (PEM), Ge: globular dan FM: fibrillar material.

Sel embrionik hasil suspensi akan membentuk kalus embrionik dan diregenerasikan pada media padat yang sama dan diinkubasikan selama 15 hari. Subkultur dilakukan agar kalus dapat beradaptasi dan berkembang pada media padat yang sama untuk diregenerasi terlihat pada (Gambar 4c). Kalus hasil suspensi membentuk fase globular setelah kalus mampu beradaptasi dan dipindahkan ke media regenerasi untuk menjadi tunas. Hasil kultur suspensi sel juga diamati dengan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) pada kalus berumur 30 hari setelah pemindahan dari kultur suspensi sel ke media regenerasi. Gambar 4d menunjukkan kalus berada pada fase pro embrionik (PEM) bagian ujung terdapat tonjolan mengandung sel meristematis yang ditandai dengan perkembangan sel

terus membelah membentuk fase globular. Perkembangan pro embriogenik berasal dari bagian sekumpulan sel terdalam yang mengalami masa transisi awal embrio somatik, terdapat bagian dinding sel baru membentuk mikrofibril selulosa baru (Nic-Can et al., 2013). Mikrofibril selulosa pada preembrionik terus memanjang, terdapat suspensor pada fase globular terjadi saat fase awal transisi embrio berkembang. Pro embriogenik memasuki fase diferensiasi kalus menonjol bagian dalamnya terdapat kumpulan sel pada nucleolus dan nucleus berbentuk menonjol, permukaan dinding menebal, dan bentuknya simetris (Gatica-Arias et al., 2019).

## KESIMPULAN

Kalus embriogenik terbaik dari kultur porang dihasilkan pada media dengan penambahan hormon 2,4-D 2 ppm dan NAA 1 ppm dengan persentase kalus tertinggi mencapai 90%. Kultur suspensi sel menghasilkan sel embrionik pada hormon NAA 0,25 ppm menghasilkan volume kalus pada minggu ke 7 memasuki fase eksponensial mencapai 3,67ml.


## UCAPAN TERIMA KASIH


Terima kasih kepada Keris In-vitro Seedling Production yang telah mensupport penelitian ini, dan Laboratorium Kultur Jaringan Prodi Agronomi UNEJ yang telah memfasilitasi penelitian.


## DAFTAR PUSTAKA


- Alfian, F. N., Afdhoria, N. N., Dewanti, P., Restanto, D. P., & Sugiharto, B. (2019). Liquid culture of somatic embryogenesis cell proliferation of sugarcane (*Saccharum officinarum*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 21(4), 905–910.
- Bhati, A., Singh, D., & Sivalingam, P. N. (2017). Effect of 2, 4-D and NAA on callus induction in date palm cv Halawy and Medjool Effect of 2, 4-D and NAA on callus induction in date palm cv Halawy and Medjool. *International Journal of Farm Sciences*, 7(3), 132–136.
- Bogdanović, M. D., Čuković, K. B., Subotić, A. R., Dragičević, M. B., Simonović, A. D., Filipović, B. K., & Todorović, S. I. (2021). Secondary Somatic Embryogenesis in *Centaureum erythraea* Rafn. *Plants*, 10(2), 199.
- Budisantoso, I., Amalia, N., & Kamsinah, K. (2017). In Vitro Callus Induction from Leaf Explants of *Vanda* sp Stimulated by 2,4-D. *Biosaintifika*: *Journal of Biology & Biology Education*, 9(3), 492.
- 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.
- Chotigamas, T., Sripaoraya, S., Gateprasert, M., Vanichsritatana, W., & Sirisansaneeyakul, S. (2009). *The tissue culture optimization for *Amorphophallus oncophyllus* cell suspension for konjac glucomannan production* (pp. 1–7).
- Egertsdotter, U. (2019). Plant physiological and genetical aspects of the somatic embryogenesis process in conifers. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 34(5), 360–369.
- Faisal, M., Abdel-Salam, E. M., Alatar, A. A., & Qahtan, A. A. (2021). Induction of somatic embryogenesis in *Brassica juncea* L. and analysis of regenerants using ISSR-PCR and flow cytometer. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 1147–1153.
- Gatica-Arias, A., Vargas-Corrales, K., Benavides-Acevedo, M., Bolívar-González, A., Sánchez-Chacón, E., García-Díaz, E., Delgado-Rodríguez, F., Weng Huang, N. T., Hegele, M., Jens-Norbert, W., & Valdez-Melara, M. (2019). Morphological and biochemical changes during somatic embryogenesis in mahogany, *swietenia macrophylla* (meliaceae). *Revista de Biología Tropical*, 67(3), 406–418.
- Hapsoro, D., Hamiranti, R., & Yusnita, Y. (2020). In vitro somatic


embryogenesis of superior clones of robusta coffee from Lampung, Indonesia: Effect of genotypes and callus induction media. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(8), 3811–3817.

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.

Ibrahim, M. S. D., Hartati, R. R. S.,  Rubiyo, R., Purwito, A., & Sudarsono, S. (2016). The Induction of Primary and Secondary Somatic Embryo to Support Arabica Coffee Propagation. *Journal of Tropical Crop Science*, 2(3), 6–13.


Junairiah, Sofiana, D. A., Manuhara, W.,  Sri, Y., & Surahmida. (2018). Induksi Kalus Piper retrofractum Vahl. dengan Zat Pengatur Tumbuh Auksin dan Sitokinin. *Journal of Pharmacy and Science*, 3(2), 41–46.


Liang, H., Xiong, Y., Guo, B., Yan, H.,  Jian, S., Ren, H., Zhang, X., Li, Y., Zeng, S., Wu, K., Zheng, F., Teixeira da Silva, J. A., Xiong, Y., & Ma, G. (2020). Shoot organogenesis and somatic embryogenesis from leaf and root explants of *Scaevola sericea*. *Scientific Reports*, 10(1), 11343.


Maulida, D., Rugayah, R., & Andalasari, T.  D. (2014). PENGARUH PEMBERIAN IBA (Indole Butyric Acid) DAN KONSENTRASI NAA (Naphthalene Acetic Acid)


TERHADAP KEBERHASILAN PENYETEKAN SIRIH MERAH (*Piper crocatum* Ruiz and Pav.). *Jurnal Agrotek Tropika*, 2(1), 151–158.


Nic-Can, G. I., López-Torres, A., Barredo-Pool, F., Wrobel, K., Loyola-Vargas, V. M., Rojas-Herrera, R., & De-la-Peña, C. (2013). New Insights into Somatic Embryogenesis: LEAFY COTYLEDON1, BABY BOOM1 and WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4 Are Epigenetically Regulated in *Coffea canephora*. *PLoS ONE*, 8(8), e72160.


Ramulifho, E., Goche, T., Van As, J.,  Tsilo, T. J., Chivasa, S., & Ngara, R. (2019). Establishment and Characterization of Callus and Cell Suspension Cultures of Selected Sorghum bicolor (L.) Moench Varieties: A Resource for Gene Discovery in Plant Stress Biology. *Agronomy*, 9(5), 218.

Rasud, Y., & Bustaman, B. (2020).  In Vitro Callus Induction from Clove (*Syzygium aromaticum* L.) Leaves on Medium Containing Various Auxin Concentrations. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 25(1), 67–72.

Reflini, R. (2017).  Evaluation of 2.4-D and NAA Concentrations for Callus and Somatic Embryos Formation in Oil Palm. *Journal of Advanced Agricultural Technologies*, 4(3), 215–218.

Restanto, D. P., Kriswanto, B., Iqmatullah, N., & Dewanti, P. (2021).  Pengaruh Naphthalene Acetic Acid (NAA) dan Kinetin terhadap Perkembangan Protocorm-Like Body (PLB) dan Regenerasi Anggrek Phalaenopsis sp. Hybrid. *Agrikultura*, 32(2), 93.

Santos-Ballardo, D. U., Germán-Báez, L.  J., Ambriz-Pérez, D. L., Meza-Ayala, K. A., Luna-Avelar, K. D., & Valdez-Ortiz, A. (2019). Optimizing the particle bombardment conditions in cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum* and expression of the recombinant antihypertensive amarantin. *South African Journal of Botany*, 125, 329–336.

Santosa, E., Lian, C. L., Sugiyama, N.,  Misra, R. S., Boonkorkaew, P., & Thanomchit, K. (2017). Population structure of elephant foot yams (*Amorphophallus paeoniifolius* (Dennst.) Nicolson) in Asia. *PLOS*

*ONE*, 12(6), e0180000.

Thorat, A. S., Sonone, N. A., Choudhari, V. V., Devarumath, R. M., & Babu, K. H. (2017). Plant regeneration from cell suspension culture in *Saccharum officinarum* L. and ascertaining of genetic fidelity through RAPD and ISSR markers. *3 Biotech*, 7(1), 16.

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.