

INDUKSI KALUS EMBRIOGENIK DAN DAYA REGENERASI KOPI ARABIKA MENGGUNAKAN 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID DAN 6-BENZYLADENINE

EMBRYOGENIC CALLUS INDUCTION AND REGENERATION POTENTIAL OF ARABICA COFFEE BY 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID AND 6-BENZYLADENINE

*Meynarti Sari Dewi Ibrahim¹⁾, Rr Sri Hartati²⁾, Rubiyo¹⁾, Agus Purwito³⁾, dan Sudarsono³⁾

¹⁾ **Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar**

Jalan Raya Pakuwon km 2 Parungkuda, Sukabumi 43357 Indonesia

²⁾ **Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan**

Jalan Tentara Pelajar No 1, Bogor 16111 Indonesia

³⁾ **Departemen Agronomi dan Hortikultura Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor**

Jalan Kamper Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680 Indonesia

*meynartisaya@yahoo.com

(Tanggal diterima: 18 April 2013, direvisi: 2 Mei 2013, disetujui terbit: 28 Juni 2013)

ABSTRAK

Embriogenesis somatik kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) masih mengalami kendala dalam meregenerasikan planlet dari eksplan yang dikulturkan. Kemampuan eksplan daun membentuk embrio dalam proses embriogenesis somatik kopi sangat dipengaruhi oleh komposisi media dan zat pengatur tumbuh. Penelitian bertujuan untuk melihat pengaruh pemberian 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid dan 6-Benzyladenine dalam proses pembentukan kalus embriogenik dan daya regenerasi kopi Arabika. Penelitian dilakukan di Unit Pengembangan Benih Unggul Pertanian, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian pada bulan Juli 2011 sampai Desember 2012. Bahan tanaman yang digunakan adalah daun kopi Arabika varietas S795 koleksi Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar. Rancangan perlakuan menggunakan rancangan acak lengkap dengan 6 ulangan, masing-masing ulangan terdiri dari 5 eksplan. Induksi kalus menggunakan 5 kombinasi perlakuan 2,4-D 1 mg/l + BA 0 mg/l; 2,4-D 1 mg/l + BA 1 mg/l; 2,4-D 1 mg/l + BA 2 mg/l; 2,4-D 2 mg/l + BA 1 mg/l; dan kontrol (tanpa penambahan 2,4-D dan BA). Peubah yang diamati meliputi jumlah kalus, persentasi kalus embriogenik, berat basah kalus, dan jumlah proembrio. Hasil penelitian menunjukkan perlakuan 2,4-D 1 mg/l + BA 0 mg/l; 2,4-D 1 mg/l + BA 1 mg/l; 2,4-D 1 mg/l + BA 2 mg/l; dan 2,4-D 2 mg/l + BA 1 mg/l dapat membentuk kalus kecuali perlakuan kontrol. Berat kalus, persentasi kalus embriogenik, dan jumlah proembrio tertinggi diperoleh pada media kombinasi 2,4-D 2 mg/l dan BA 1 mg/l. Kalus yang mampu beregenerasi berasal dari media kombinasi 2,4-D 1 mg/l dan BA 2 mg/l dengan persentasi 16,67% dengan 6 kecambah per 0,2 gram kalus.

Kata Kunci: *Coffea arabica*, 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid, 6-Benzyladenine, embriogenesis somatik

ABSTRACT

Regeneration of planlets from cultured explants has been an obstacle in somatic embryogenesis of arabica coffee (*Coffea arabica* L.). The ability of leaf explants to generate embryos in somatic embryogenesis process of coffee was affected by composition of media and plant growth regulators. The objectives of the research was to examine the effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid dan 6-Benzyladenine in the process of embryogenic callus and regeneration potential of arabica coffee. The study was conducted at Agricultural Superior Seed Development Unit, Indonesian Agency for Agricultural Research and Development (IAARD) from July 2011 to December 2012. Plant material used was leaves of S795 variety which is collected by Indonesian Industrial and Beverage Crops Research Institute. The research was arranged in completely randomized design with 6 replications, each replication consist of 5 explants. Callus induction used 5 treatments, i.e. 2,4-D 1 mg/l + BA 0 mg/l; 2,4-D 1 mg/l + BA 1 mg/l; 2,4-D 1 mg/l + BA 2 mg/l; 2,4-D 2 mg/l + BA 1 mg/l; and control (without 2,4-D and BA). Variables observed were number of callus, percentage of embryogenic callus, callus fresh weight and number of proembryo. Result showed that all treatments can produce the callus except control. Combination of 2,4-D 2 mg/l and BA 1 mg/l gave the highest of fresh weight of callus, percentage of embryogenic callus, and number of

proembryo. Regenerating callus of 16.67% with the number of sprouts of 6 per 0.2 gram only derived from combination of 2,4-D 1 mg/l BA and 2 mg/l.

Keywords: *Coffea arabica*, 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid, 6-Benzyladenine, somatic embryogenesis

PENDAHULUAN

Kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) merupakan tanaman perkebunan yang dapat diperbanyak secara generatif dengan menggunakan biji dan vegetatif menggunakan stek, okulasi dan sambung pucuk. Perbanyakannya menggunakan biji tidak menjamin benih yang dihasilkan akan sama dengan induknya, karena tanaman yang menyerbuk sendiri masih ada peluang untuk terjadinya penyerbukan silang. Perbanyakannya vegetatif menghasilkan bibit yang sama dengan induknya, tetapi tidak semua cabang kopi dapat digunakan sebagai sumber bahan tanaman sehingga bibit yang dihasilkan terbatas.

Teknik kultur jaringan memberikan alternatif dalam perbanyakannya bibit kopi. Teknik ini memungkinkan untuk memproduksi bibit yang relatif seragam dalam skala besar, dengan waktu yang lebih singkat, dan bebas hama penyakit. Berbagai pendekatan yang telah dipertimbangkan untuk perbanyakannya kultur jaringan kopi di antaranya, organogenesis (menggunakan tunas adventif dan tunas aksilar), *mikrocutting*, dan embriogenesis somatik (Santana-Buzzy *et al.*, 2007; Andrés *et al.*, 2008).

Perbanyakannya melalui embriogenesis somatik dari berbagai jenis eksplan telah dilakukan dengan menggunakan kultur anther, meristem, biji, hipokotil, epikotil, akar, dan daun. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa penggunaan eksplan daun kopi paling responsif dalam menghasilkan embrio somatik dibandingkan bagian tanaman yang lain (Carneiro, 1999; Oktavia *et al.*, 2003). Penggunaan eksplan daun pada kopi Arabika dalam proses embriogenesis somatik telah banyak dilakukan, di antaranya pada penelitian Etienne *et al.* (2002), Figueroa-Quiroz *et al.* (2002), Priyono (2004), dan Albarra'n *et al.* (2005).

Penelitian embriogenesis somatik kopi Arabika menggunakan kombinasi zat pengatur tumbuh yang berbeda telah dilaporkan oleh banyak peneliti. Neuenschwander dan Baumann (1992) telah berhasil menginduksi embrio dengan

menggunakan tiga kombinasi ZPT, yaitu *Benzyl Amino Purine* (BAP), 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D), dan α -Naphthalene Acetic Acid (NAA). Priyono dan Danimihardja (1991) menggunakan BAP dan kinetine. Priyono (1993) menggunakan *Indole Asetic Acid* (IAA), BAP dan Adenine sulfat. Giridhar *et al.* (2004) menggunakan Thidiazuron, sementara Oktavia *et al.* (2003), Samson *et al.* (2006), dan Arimarsetiowati (2011) menggunakan 2,4-D dengan 6-(*y,y*-dimethylallylamino) purine (2-iP).

Penelitian terdahulu memperlihatkan bahwa kemampuan eksplan daun untuk membentuk embrio dalam proses embriogenesis somatik kopi sangat dipengaruhi oleh media dan zat pengatur tumbuh. Penelitian ini bertujuan melihat pengaruh pemberian 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid dan 6-Benzyladenine dalam menginduksi kalus embriogenik dan daya regenerasi pada proses embriogenesis somatik kopi Arabika.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli 2011 sampai Desember 2012 di Laboratorium Kultur Jaringan, Unit Pengembangan Benih Unggul Pertanian, Badan Litbang Pertanian. Eksplan yang digunakan adalah daun muda yang sudah membuka sempurna dari tanaman kopi Arabika varietas S975.

Media dasar yang digunakan adalah media MS (Murashige dan Skoog) dengan 1/2 konsentrasi garam makro dan mikro yang dilengkapi vitamin B5, sukrosa 30 g/l, dan 250 mg/l polivinilpyrrolidon (PVP). Zat pengatur tumbuh 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) dan 6-Benzyladenine (BA) ditambahkan pada media dengan kombinasi perlakuan 2,4-D 0 mg/l + BA 0 mg/l (kontrol); 2,4-D 1 mg/l + BA 0 mg/l; 2,4-D 1 mg/l + BA 1 mg/l; 2,4-D 1 mg/l + BA 2 mg/l; dan 2,4-D 2 mg/l + BA 1 mg/l. Media diatur pHnya pada 5,7 dan dipadatkan dengan gel gum 3 g/l. Sterilisasi media dilakukan menggunakan

autoklaf pada suhu 121 °C selama 20 menit dengan tekanan 1,5 atm.

Induksi Kalus Embriogenik

Daun muda yang sudah membuka sempurna dipetik dari bibit kopi Arabika yang telah dipelihara di rumah kaca. Daun dibersihkan dengan air mengalir, direndam dalam fungisida yang berbahan aktif Mankozeb 80% dengan konsentrasi 0,2% selama 1 jam, lalu dibilas sampai bersih. Sterilisasi dilakukan dengan menggunakan alkohol 70% selama 3 menit dan sodium hipoklorit 10% selama 15 menit, kemudian daun dibilas sampai bersih menggunakan *aquadest* steril. Daun yang sudah steril dipotong-potong dengan ukuran ± 1 cm x 1 cm dan ditumbuhkan pada media kultur. Semua proses sterilisasi dan penanaman eksplan dilakukan di dalam *laminar air flow*.

Botol kultur yang berisi eksplan diinkubasi dalam ruang gelap pada temperatur ± 25 °C dengan kelembaban relatif $\pm 60\%$ selama 2 bulan. Kalus embriogenik yang terbentuk dipisahkan dari daun, ditimbang beratnya, kemudian dilakukan subkultur pada media yang sama dengan cara menimbang 0,2 gram kalus per botol.

Daya Regenerasi

Kalus embriogenik disubkultur ke media MS dengan 1/2 konsentrasi garam makro dan mikro yang dilengkapi vitamin B5, sukrosa 30 g/l, dan 250 mg/l *Polivynil Pyrolidon* (PVP) dengan penambahan kinetin 2 mg/l. Planlet dibesarkan pada media MS dengan 1/2 konsentrasi garam makro dan mikro yang dilengkapi vitamin B5, sukrosa 30 g/l tanpa pemberian ZPT. Botol diinkubasi dalam ruang terang dengan penyinaran selama 16 jam, intensitas penyinaran 1000-1500 luks, temperatur ± 25 °C dan kelembaban relatif $\pm 60\%$.

Analisis Statistik

Rancangan perlakuan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan 6 ulangan. Satu ulangan terdiri dari satu botol yang berisi 5 eksplan sehingga dalam satu ulangan diperlukan 30 eksplan. Parameter yang diamati adalah kecepatan eksplan membentuk kalus, jumlah kalus yang

terbentuk, persentasi kalus embriogenik, warna kalus, berat basah kalus, jumlah proembrio, dan kecambah yang terbentuk.

Data yang diperoleh diuji secara statistik dengan menggunakan program SAS 9.1, jika terdapat beda nyata maka dilakukan uji lanjut dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf uji 5%.

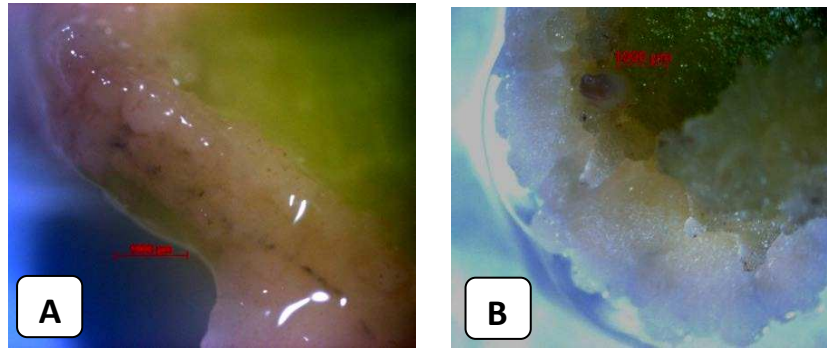
HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi Kalus Embriogenik

Pinggiran daun kopi mulai terlihat membengkak setelah tiga minggu pada semua media induksi kalus yang digunakan. Pada minggu ke empat pengkalusan di bagian bekas sayatan mulai terbentuk pada media kombinasi 2,4-D 2 mg/l + BA 1 mg/l dan 2,4-D 1 mg/l + BA 2 mg/l dan minggu berikutnya pada perlakuan yang lain kecuali pada perlakuan tanpa penambahan ZPT (Kontrol) (Gambar 1A). Hal yang sama dilaporkan oleh Ibrahim *et al.* (2012), perlakuan 2,4-D dan kinetin pada kopi Arabika mampu menghasilkan kalus.

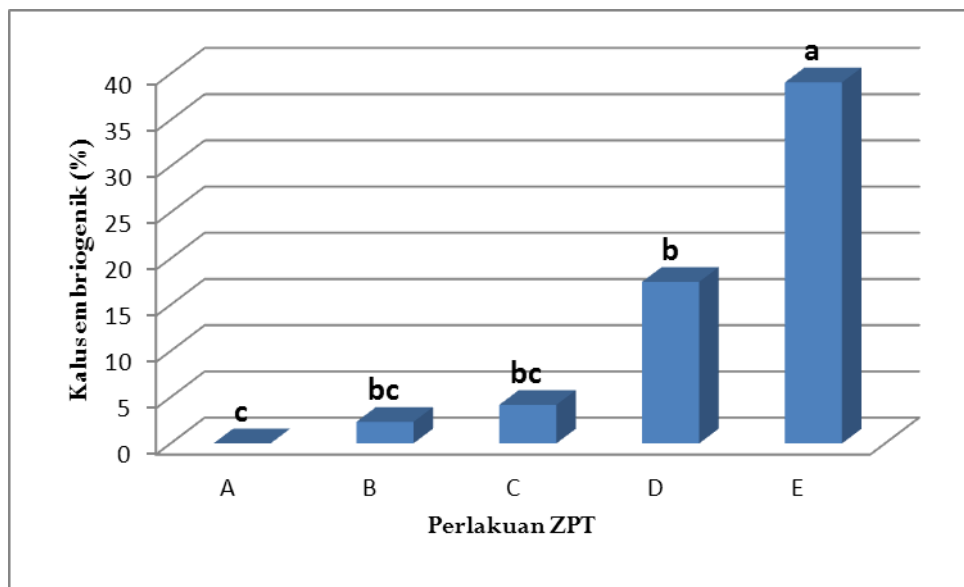
Pembentukan kalus terlihat semakin berkembang seiring dengan bertambahnya waktu. Dua bulan dalam media induksi, kalus yang terbentuk hanya disekitar bekas sayatan saja (Gambar 1B). Hal ini juga dijumpai pada penelitian Oktavia *et al.* (2003) dimana kalus hanya terbentuk dibekas luka sayatan, namun berbeda dengan hasil penelitian Priyono (1993) yang mendapatkan kalus dan embrio somatik pada permukaan maupun sisi daun. Perbedaan ini diduga karena ada perbedaan ukuran eksplan yang digunakan, perbedaan konsentrasi dan ZPT yang ditambahkan ke media inisiasi kalus, lamanya inisiasi, serta perbedaan respon dari genotipe tanaman yang digunakan sehingga tanggap jaringan juga berbeda.

Secara morfologi kalus yang terbentuk tidak semuanya embriogenik. Rataan persentasi pembentukan kalus embriogenik masih rendah, yaitu di bawah 50% (Gambar 2), walaupun ada beberapa satuan percobaan dari ulangan pada kombinasi perlakuan 2,4-D 1 mg/l dan BA 2 mg/l kalus embriogenik ada yang mencapai 90% (data tidak ditampilkan).



Gambar 1. Perkembangan pembentukan kalus pada media induksi dengan perlakuan kombinasi 2,4-D 2 mg/l + BA 1 mg/l. (A) Empat minggu setelah induksi kalus dan (B) dua bulan setelah induksi kalus.

Figure 1. Callus development at induction medium of 2,4-D 2 mg/l + BA 1 mg/l. (A) Four weeks after culture on induction medium and (B) two months after culture on induction medium.

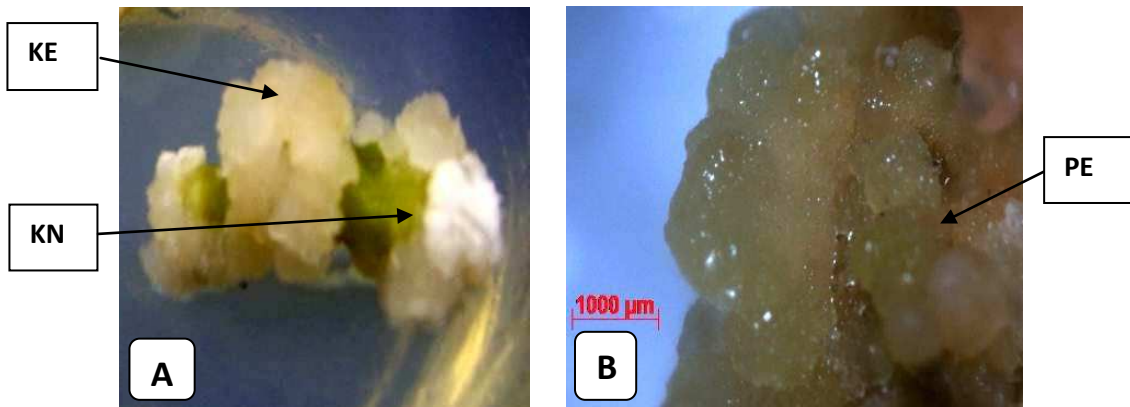


Gambar 2. Persentasi kalus embriogenik yang terbentuk 2 bulan setelah eksplan dikulturkan pada media induksi kalus. (A) Kontrol (Tanpa 2,4-D dan BA), (B) 2,4-D 1 mg/l + BA 0 mg/l, (C) 2,4-D 1 mg/l + BA 1 mg/l, (D) 2,4-D 1 mg/l + BA 2 mg/l, dan (E) 2,4-D 2 mg/l + BA 1 mg/l. Huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan DMRT taraf 5%.

Figure 2. Percentage of embryogenic callus at two months after culture on medium callus induction. (A) Control (without 2,4-D and BA), (B) 2,4-D 1 mg/l + BA 0 mg/l, (C) 2,4-D 1 mg/l + BA 1 mg/l, (D) 2,4-D 1 mg/l + BA 2 mg/l, and (E) 2,4-D 2 mg/l + BA 1 mg/l. Numbers followed by the same letters are not significantly different in DMRT at 5%.

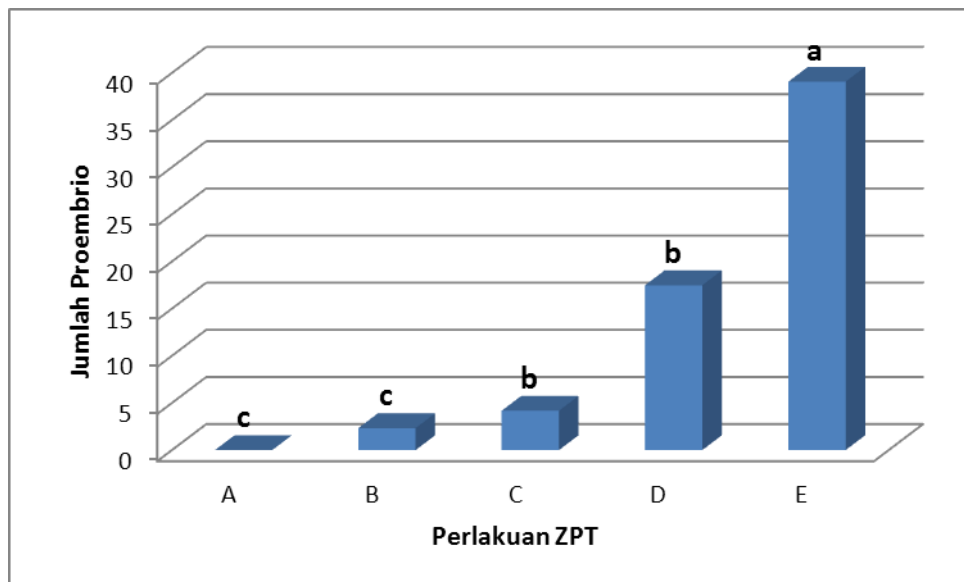
Berdasarkan warna kalus kopi yang terbentuk, kalus dapat dikelompokkan menjadi tiga kelompok, yaitu kalus yang berwarna kekuningan, putih kekuningan, dan putih. Kalus berwarna kekuningan dan putih kekuningan merupakan kalus embriogenik, sementara kalus yang berwarna putih merupakan kalus non embriogenik. Kalus ini biasanya tidak mempunyai kemampuan untuk beregenerasi sehingga dalam proses subkultur tidak

diikutsertakan (Gambar 3A). Kalus embriogenik merupakan kalus yang diharapkan mampu berkembang menjadi embrio somatik. Kalus kopi dengan tiga warna juga dilaporkan pada penelitian Riyadi dan Tirtoboma (2004) yang menggunakan kopi Arabika varietas Kartika, pada media Murashige-Skoog standar yang mengandung 30 g/l sukrosa dan diberi 2,4-D dan kinetin.



Gambar 3. (A) Keragaan kalus embriogenik (KE) dan non embriogenik (KN) (Tanda panah), (B) proembrio pada media induksi kalus (Tanda panah) di bawah mikroskop elektron.

Figure 3. (A) Performance of embryogenic callus (KE) and non-embryogenic callus (KN) (arrow), (B) proembryo on induction medium (arrow) observed under electron microscope



Gambar 4. Rataan jumlah proembrio yang terbentuk pada saat 2 bulan setelah eksplan dikulturkan pada media induksi kalus. (A) Kontrol (Tanpa 2,4-D dan BA), (B) 2,4-D 1 mg/l + BA 0 mg/l, (C) 2,4-D 1 mg/l + BA 1 mg/l, (D) 2,4-D 1 mg/l + BA 2 mg/l, dan (E) 2,4-D 2 mg/l + BA 1 mg/l. Huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan DMRT taraf 5%.

Figure 4. Mean number of proembryo developed at two months after explant cultured on induction medium. (A) Control (without 2,4-D and BA), (B) 2,4-D 1 mg/l + BA 0 mg/l, (C) 2,4-D 1 mg/l + BA 1 mg/l, (D) 2,4-D 1 mg/l + BA 2 mg/l, and (E) 2,4-D 2 mg/l + BA 1 mg/l. Numbers followed by the same letters are not significantly different in DMRT at 5%.

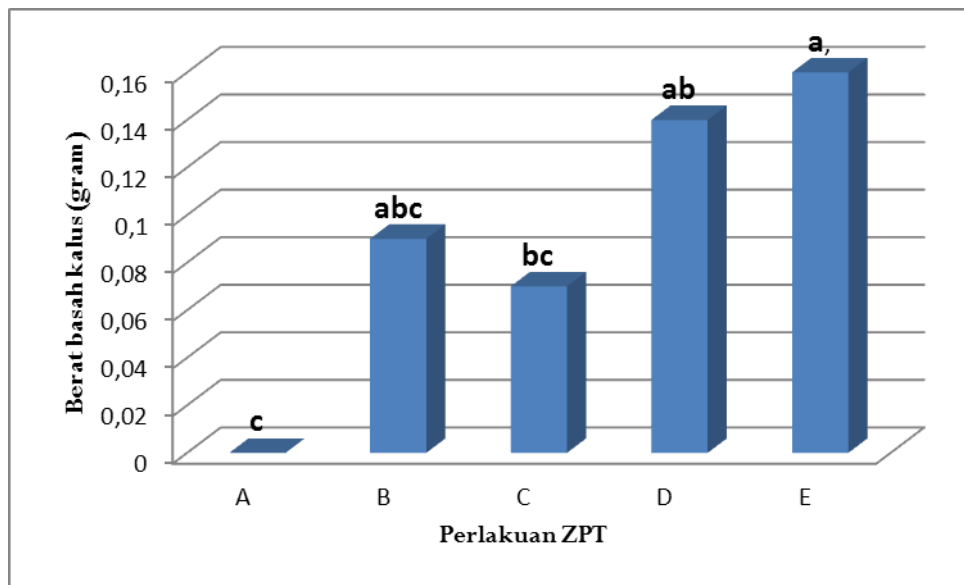
Pengamatan mikroskopik pada umur kultur 2 bulan, di samping terbentuknya kalus juga ditemukan adanya massa proembrio. Proembrio terlihat di bagian bawah dari daun yang berdekatan dengan bagian sayatan dengan warna putih dan permukaan yang licin (Gambar 3B). Massa proembrio yang dihasilkan tersebut mempunyai potensi untuk dikembangkan menjadi embrio globular, namun massa proembrio yang dihasilkan jumlahnya tidak sebanyak yang diinginkan.

Pemberian 2,4-D tunggal tanpa dikombinasikan dengan BA menghasilkan jumlah proembrio lebih sedikit jika dibandingkan ketika dikombinasikan dengan BA (Gambar 4). Jumlah proembrio terbanyak dijumpai pada perlakuan kombinasi 2,4-D 2 mg/l + BA 1 mg/l. Grafik memperlihatkan terjadinya kenaikan jumlah proembrio yang dihasilkan sehingga masih dimungkinkan untuk meningkatkan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan (Gambar 4). Chaudhury dan Qu (2000) menyatakan bahwa

auksin dan sitokinin yang diberikan bersama-sama dapat menstimulasi embriogenesis, akan tetapi diperlukan rasio tertentu dari kombinasi keduanya untuk menginduksi embrio somatik. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa ketika jaringan eksplan kopi Arabika ditempatkan di media nutrisi yang mengandung zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin, sel-sel menjadi terdeferensiasi menjadi kalus dan massa proembrio (Neuenschwander dan Baumann, 1992; Etienne dan Bertrand, 2001; Riyadi dan Tirtoboma, 2004; Samson *et al.*, 2006; Mene'ndez-Yuffa' *et al.*, 2010). Untuk meningkatkan jumlah embrio dalam proses embriogenesis somatik, selain memperhatikan keseimbangan zat pengatur tumbuh, perlu mengatur keseimbangan ammonium (N) dari N tereduksi dan N teroksidasi, mengatur konsentrasi sumber energi, dan asam amino (Gray, 2005).

Berdasarkan data bobot kalus perlakuan kombinasi 2,4-D 2 mg/l + BA 1 mg/l menghasilkan kalus terbanyak. Gambar 5 memperlihatkan berat kalus bertambah dengan bertambahnya 2,4-D, sementara pemberian 2,4-D tanpa BA kalus yang terbentuk lebih sedikit. Hal ini terjadi karena tipe morfogenesis pada kultur jaringan sangat tergantung pada rasio antara auksin dan sitokinin yang diberikan. Kalus akan terbentuk jika terdapat rasio auksin dan sitokinin yang lebih tinggi. Konsentrasi auksin dan sitokinin yang berbeda mengakibatkan arah pertumbuhan yang berbeda sekalipun rasionya dalam jumlah yang sama (George and Sherrington, 1984; Tores, 1989).

Kalus dan proembrio yang terbentuk setelah 2 bulan disubkultur ke media yang sama. Proembrio yang terbentuk menjadi kalus kembali setelah 1 bulan disubkultur. Warna kalus yang tadinya putih kekuningan berubah menjadi kuning kecokelatan pada 2 bulan setelah disubkultur.



Gambar 5. Berat segar kalus pada 2 bulan setelah eksplan dikulturkan pada media induksi kalus. (A) Kontrol (Tanpa 2,4-D dan BA), (B) 2,4-D 1 mg/l + BA 0 mg/l, (C) 2,4-D 1 mg/l + BA 1 mg/l, (D) 2,4-D 1 mg/l + BA 2 mg/l, dan (E) 2,4-D 2 mg/l + BA 1 mg/l. Huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan DMRT taraf 5%.

Figure 5. Fresh weight of callus at two months after explant cultured in induction medium. (A) Control (without 2,4-D and BA), (B) 2,4-D 1 mg/l + BA 0 mg/l, (C) 2,4-D 1 mg/l + BA 1 mg/l, (D) 2,4-D 1 mg/l + BA 2 mg/l, and (E) 2,4-D 2 mg/l + BA 1 mg/l. Numbers followed by the same letters are not significantly different in DMRT at 5%.



Gambar 6. Keragaan kecambah kopi Arabika yang terbentuk melalui proses embriogenesis somatik. (A) Globular (tanda panah), (B) torpedo, dan (C) planlet.

Figure 6. Regeneration performance of Arabica coffee sprouts generated through somatic embryogenesis. (A) Globular (arrow), (B) torpedo, and (C) planlet.

Daya Regenerasi

Kalus yang terbentuk kemudian disubkultur ke media yang diberi zat pengatur tumbuh kinetin 2 mg/l. Dua bulan di media ini pada perlakuan kombinasi 2,4-D 1 mg/l dan BA 2 mg/l kalus yang berwarna cokelat kehitaman timbul bintik-bintik putih yang menandakan mulai terbentuknya embrio somatik. Jika dilihat di bawah mikroskop elektron bintik putih tersebut merupakan kalus yang memasuki fase globular (Gambar 6A).

Globular yang terbentuk akan berkembang menjadi torpedo dan kotiledon. Kecambah kemudian dibesarkan di media MS tanpa pemberian zat pengatur tumbuh. Hal ini sesuai dengan pernyataan George and Sherrington (1984) dan Evans *et al.* (1981) yang menyatakan bahwa awal dari proses embriogenesis somatik dimulai dengan terbentuknya tonjolan membulat, yang biasanya muncul dari eksplan atau kalus. Perkembangan embriogenesis somatik yang normal akan melalui tahapan proembrio, globular, bentuk hati, torpedo dan planlet.

Hasil pengamatan terhadap jumlah embrio somatik yang mampu berkecambah hanya berasal dari media kombinasi 2,4-D 1 mg/l dan BA 2 mg/l dengan persentasi 16,67%. Jumlah kecambah yang terbentuk per 0,2 gram kalus sebanyak 6 buah. Kecambah yang terbentuk terlihat normal dengan hipokotil, daun, dan akar tunggang (Gambar 6C).

KESIMPULAN

Kalus embriogenik berhasil diinduksi dari eksplan daun kopi Arabika. Perlakuan 2,4-D 1 mg/l + BA 0 mg/l; 2,4-D 1 mg/l + BA 1 mg/l; 2,4-D 1 mg/l + BA 2 mg/l; dan 2,4-D 2 mg/l + BA 1 mg/l dapat membentuk kalus kecuali perlakuan kontrol. Berat kalus, persentasi kalus embriogenik, dan jumlah proembrio tertinggi diperoleh pada media kombinasi 2,4-D 2 mg/l dan BA 1 mg/l. Kalus yang mampu beregenerasi berasal dari media kombinasi 2,4-D 1 mg/l dan BA 2 mg/l dengan persentasi 16,67% dengan jumlah kecambah sebanyak 6 buah per 0,2 gram kalus.

Pada penelitian selanjutnya disarankan untuk lebih mengatur pemberian zat pengatur tumbuh, mengatur nisbah N tereduksi dan N teroksidasi, dan menambahkan asam amino seperti casein hidrolisat dan ekstrak malt. Dengan perbaikan komposisi media yang digunakan diharapkan kalus embriogenik yang terbentuk lebih banyak dengan daya regenerasi yang lebih tinggi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada Badan Litbang Pertanian yang telah memberikan pendanaan melalui APBN pada Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. Terimakasih juga penulis sampaikan kepada Dr. Syafaruddin yang telah memberikan bibit kopi

untuk digunakan sebagai sumber eksplan dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Albarra'n, J. B. Bertrand, M. Lartaud, and H. Etienne. 2005. Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water, and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 81: 27–36.
- Andrés, M, A. M. Gatica-Arias, G. Arrieta-Espinoza, and A. M. E. Esquivel. 2008. Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuai. *Electronic Journal of Biotechnology* © 2008 by Pontificia Universidad Católica de Valparaíso—Chile 11 (1): 1-9. [Februari 2013].
- Arimarsetiowati, R. 2011. Pengaruh auksin 2,4-D dan sitokinin 2-ip terhadap pembentukan embriogenesis somatik langsung pada eksplan daun *Coffea arabica* L. *Pelita Perkebunan* 27 (2): 68-77.
- Carneiro, M. F. 1999. Advances in coffee biotechnology. *AgBiotechnet* 1: 1-7.
- Chaudhury, A. and R. Qu. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: Effect of 6-benzyladenine in calli induction medium. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.* 60: 113-120.
- Etienne, H. and B. Bertrand, 2001. Trueness-to-type and agronomic characteristics of *Coffea arabica* trees micropropagated by the embryogenic cell suspension technique. *Tree Physiol.* 21: 1031-1038.
- Etienne, H., F. Anthony, S. Dussert, D. Fernandez, P. Lashermes, and B. Bertrand. 2002. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.) *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 38: 129-138.
- Evans, D. A., W. A. Sharp, and C. E. Flick. 1981. Growth and behavior of cell cultures. *In Embryogenesis and Organogenesis in Plant Tissue Culture: Methods and Application in Agriculture* (Thorpe, T.A ed). Academic Press. New York. p. 45-59.
- Figuerola-Quiroz, F. R., C. F. J. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera, and V. M. Loyola-Vargas. 2002. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports* 20: 1141–1149.
- George, F. F. and Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetic Ltd. England.
- Giridhar, P., V. Kumar, E. P. Indu, Ravishankar, and A. Chandrasekar. 2004. Thidiazuron induced somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* P ex Fr. *Acta Botanica Croatica* 63 (1): 25-33.
- Gray, D. J. 2005. Propagation from nonmeristematic tissue culture: non zygotic embryogenesis. *In Trigano, R. N. and D. J. Gray (Eds).* RCR Press. LLC. New York. p. 187-200.
- Ibrahim, M. S. D., Sudarsono, Rubiyo, dan Syafaruddin. 2012. Pengaruh komposisi media terhadap pembentukan kalus menuju induksi embrio somatik kopi Arabika (*Coffea arabica*). *Buletin Riset Tanaman Rempah dan Aneka Tanaman Industri* 3 (1): 13-22.
- Mene'ndez-Yuffa, A., D. Dominique Barry-Etienne, B. Bertrand, F. Georget, and H. Etienne. 2010. A comparative analysis of the development and quality of nursery plants derived from somatic embryogenesis and from seedlings for large-scale propagation of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 102: 297–307.
- Neuenschwander, B. and T. W. Baumann. 1992. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep.* 10: 608-612.
- Oktavia, F., Siswanto, A. Budiani, dan Sudarsono. 2003. Embriogenesis somatik langsung dan regenerasi planlet kopi Arabika (*Coffea arabica*) dari berbagai eksplan. *Menara Perkebunan* 71 (2): 44-55.
- Priyono dan S. Danimihardja. 1991. Reproduksi embrio somatik kopi arabika dengan menggunakan BAP dan Kinetin serta regenerasi planlet dengan menggunakan Ca-P dan biotin. *Dalam Prosiding Seminar Bioteknologi Perkebunan dan Lokakarya Biopolimer Untuk Industri*. Pusat Antar Universitas IPB. Bogor, 10-11 Desember 1991.
- Priyono. 1993. Embriogenesis somatik langsung pada kultur *in vitro* eksplan daun kopi Arabika (*Coffea arabica*). *J. Il. Pert. Indon.* 3 (1): 16-20.
- Priyono. 2004. Kultur *in vitro* daun kopi untuk mengetahui kemampuan embriogenesis somatik beberapa varietas kopi. *Pelita Perkebunan* 20 (3): 110-122.
- Riyadi, A. dan Tirtoboma. 2004. Pengaruh 2,4-D terhadap induksi embrio somatik kopi arabika. *Buletin Plasma Nufah* 10 (2): 82-89.
- Samson, N. P., C. Campa, L. Le Gal, M. Noirot, G. Thomas, T. S. Lokeswari, and A. de Kochko. 2006. Effect of primary culture medium composition on high frequency somatic embryogenesis in different *Coffea* species. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.* 86: 37–45.
- Santana-Buzzy, N., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Ávalos, J. R. Ku-Cauic, J. Mijangos-Cortés, and L. C. Gutierrez-Pacheco, A. Canto, F. Quiroz-Figueroa, V. M. Loyola-Vatgas. 2007. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 43: 507-520.
- Tores, K. C. 1989. *Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops*. Van Nostrand Reinhold. New York. 285 p.