

PENGARUH KOMPOSISI MEDIA TERHADAP PEMBENTUKAN KALUS EMBRIOGENESIS SOMATIK KOPI ARABIKA (*Coffea arabica*)

Meynarti Sari Dewi Ibrahim¹⁾, Sudarsono²⁾, Rubiyono¹⁾ dan Syafaruddin¹⁾

¹Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar

Jalan Raya Pakuwon km 2 Parungkuda, Sukabumi 43357

balittri@gmail.com

²Departemen Agronomi dan Hortikultura. Fakultas Pertanian. IPB.

Jl. Meranti, Darmaga, Bogor. 16680

(Diajukan tanggal 2 Desember 2011, diterima tanggal 21 Februari 2012)

ABSTRAK

Induksi embrio somatik pada kopi arabika (*Coffea arabica*) dengan menggunakan beberapa zat pengatur tumbuh (ZPT) telah berhasil dilakukan. Pengaruh komposisi media terutama kombinasi antara jenis ZPT yang berbeda dan tanggap genotipe tanaman dilaporkan sangat bervariasi. Tujuan penelitian untuk mengkaji pengaruh pemberian 2,4-D dan kinetin dalam proses pembentukan dan pertumbuhan kalus embriogenik asal daun. Penelitian dilakukan di Laboratorium Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan (Puslitbangun) Agustus 2011 sampai Januari 2012. Bahan tanaman yang digunakan adalah daun dari kopi arabika varietas Sigarar Utang yang merupakan tanaman koleksi Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar (Balittri). Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan 5 ulangan, masing-masing ulangan terdiri dari 5 eksplan. Peubah yang diamati, meliputi persentasi kalus yang terbentuk, morfologi kalus, berat basah kalus, dan jumlah globular. Hasil menunjukkan semua perlakuan dapat membentuk kalus, penambahan berat eksplan tertinggi diperoleh pada media kombinasi 2,4-D 1 mg/l atau 2 mg/l dan kinetin 1 sampai 4 mg/l. Embrio somatik terbanyak diperoleh pada media yang diberi 2,4-D 0,5 mg/l dan kinetin 1 mg/l. Selain kalus, massa proembrio dan embrio, juga terbentuk akar adventif yang jumlahnya tidak nyata antar perlakuan.

Kata Kunci : *Coffea arabica*, 2,4-D, kinetin, embrio somatik

ABSTRACT

The Effect of Composition Media to Callus Formation of Somatic Embryogenesis of Arabica Coffee (Coffea arabica). Induction of somatic embryos with plant growth regulators (PGR) has successfully performed in arabica coffee. However, the influence of media composition combined with different PGR, explants and genotype of plants is widely various in response yields. The objective of this study was to examine the effects of 2,4-D and kinetin in process of formation and growth of embryogenic callus developed from leaves of arabica coffee. The study was carried out at a laboratory of Indonesian Research Center for Estate Crops (Puslitbangun) from August 2011 to January 2012. Plant materials used are coffee leaves var. Sigarar Utang taken from a germplasm collection of the crop grown at Pakuwon Research Station, Indonesian Research Institute for Industry Crops (Balittri) located at Sukabumi, West Java. A completely randomized design with 5 replications and plot size of five explants was used. Parameters observed are percentage of callus formation, morphology of the callus, fresh weight of callus, and number of globular. Results show that all treatments examined are able to form callus. The highest increase in weight of explants was obtained from the media treated with 2,4-D (conc. of 1 mg/l or 2 mg/l) and kinetin (conc. of 1 to 4 mg/l). While, the most number of somatic embryo formed was obtained from those of treated with 2,4-D 0.5 mg/l and kinetin 1 mg/l. In addition to callus formation, proembryo mass, embryo and adventive roots were also formed in spite of not significant between different the treatments.

Keywords : *Coffea arabica*, 2,4-D, kinetin, somatic embryos

PENDAHULUAN

Tanaman kopi merupakan salah satu tanaman perkebunan penting karena merupakan komoditas ekspor yang mendatangkan sumber devisa cukup besar bagi negara. Selain itu, kopi juga mempunyai pengaruh ganda dalam perekonomian karena penanaman kopi mendorong kegiatan perekonomian lain seperti sarana produksi, pengolahan pasca panen, perdagangan biji kopi, warung-warung kopi, dan tumbuhnya industri hilir produk berbahan baku kopi (Mawardi, 1999). Peranan kopi yang sangat penting ini mengakibatkan tanaman kopi merupakan salah satu tanaman yang mendapat perhatian besar dari pemerintah.

Meskipun jenis tanaman kopi yang dilaporkan lebih dari 80 spesies, namun dalam dunia perdagangan hanya ada dua jenis kopi yang dikenal, yaitu kopi arabika (*Coffea arabica*) dan kopi robusta (*Coffea canephora*). Dengan memiliki kualitas dan cita rasa yang lebih baik, maka harga kopi arabika (*C. arabica*) di pasaran internasional lebih tinggi dibandingkan kopi robusta (*C. canephora*).

Perbanyakan kopi arabika dapat dilakukan secara generatif menggunakan biji atau secara vegetatif menggunakan stek, okulasi, dan sambung pucuk. Perbanyakan dengan kedua cara tersebut masih terdapat beberapa kelemahan. Salah satu kendalanya adalah rendahnya produksi tunas air sebagai sumber bahan tanaman yang akan diperbanyak sehingga ketersediaan bibit yang dihasilkan rendah. Penggunaan teknik kultur jaringan diharapkan dapat mengatasi masalah tersebut sehingga bahan tanam klonal berjumlah besar dapat disediakan dalam waktu yang relatif singkat. Selain itu, ketersediaan teknik perbanyakan embriogenesis somatik tanaman kopi arabika juga sangat diperlukan dalam program pemuliaan untuk mendapatkan bibit unggul dengan sifat-sifat tertentu yang diinginkan, seperti produksi tinggi sekaligus tahan hama atau penyakit (Priyono, 1993; Sumaryono dan Tahardi, 1993; Suryowinoto, 1996; Oktavia *et al.*, 2003).

Usaha perbanyakan kopi arabika menggunakan teknik kultur jaringan telah lama dilakukan, namun sampai saat ini masih menghadapi berbagai kendala. Priyono dan Hartana (1991) berhasil meregenerasikan planlet

melalui pembentukan tunas adventif. Pembentukan embrio somatik dari berbagai jenis eksplan juga telah dilaporkan (Warga-Dalem, 1985; Priyono, 1991; Priyono, 1993; Bieysee *et al.*, 1993; Samson *et al.*, 2006; Gatica *et al.*, 2008), namun tingkat keberhasilannya masih sangat bervariasi.

Dari penelitian terdahulu ditemukan bahwa keberhasilan embriogenesis sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain sumber eksplan, komposisi media, zat pengatur tumbuh, genotipe tanaman, dan keadaan fisiologi sel (Terzi and Loschiavo, 1990; Bieysee *et al.*, 1993; Ehsanpour, 2002). Zat pengatur tumbuh telah diketahui memegang peran penting dalam menentukan arah pertumbuhan suatu kultur. Zat pengatur tumbuh 2,4-D merupakan auksin yang paling umum digunakan untuk menginduksi embriogenesis somatik. Selain auksin, pemberian zat pengatur tumbuh sitokinin juga berpengaruh terhadap diferensiasi sel dalam proses embriogenesis somatik (Wattimena, 1988). Beberapa jenis sitokinin yang biasa dikombinasikan dengan auksin dalam menginduksi embrio somatik kopi diantaranya adalah BA, kinetin dan 2-ip (Priyono, 1993; Carneiro, 1999; Oktavia *et al.*, 2003; Riyadi dan Tirtoboma, 2004; Santos-Briones and Hernández-Sotomayor, 2006).

Kemampuan eksplan membentuk embriogenesis somatik pada kopi sangat tergantung pada spesies dan genotipe/varietas. Hasil penelitian Priyono (2004) dan Samson *et al.*, (2006) memperlihatkan perbedaan yang nyata dalam pembentukan embrio somatik di antara spesies dan varietas yang digunakan. Perbedaan respon ini memberikan peluang sekaligus tantangan dalam penelitian embriogenesis kopi, terutama kopi arabika yang menurut beberapa referensi lebih sulit dibandingkan dengan kopi robusta. Selain genotipe/varietas, jaringan sumber eksplan mempunyai respon yang berbeda dalam penyerapan zat pengatur tumbuh.

Penelitian ini bertujuan mengkaji pengaruh pemberian 2,4-D dan kinetin dalam proses pembentukan dan pertumbuhan kalus embriogenik asal daun kopi menuju induksi embrio somatik kopi arabika (*C. arabica*).

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan dari bulan Agustus 2011 sampai Januari 2012 di Laboratorium Kultur Jaringan, Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan, Bogor. Bahan tanaman yang digunakan sebagai sumber eksplan adalah tanaman kopi arabika (*C. arabica*) varietas Sigarar Utang koleksi dari Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar (Balittri) yang telah dipelihara di rumah kaca, Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan.

Sumber eksplan untuk induksi kalus adalah daun muda yang sudah membuka sempurna. Medium dasar yang digunakan untuk induksi kalus adalah $\frac{1}{2}$ konsentrasi garam makro dan mikro MS (Murashige dan Skoog) yang dilengkapi dengan vitamin B5, 30 g/L dan 250 mg/L *polivinil pyrrolidon* (PVP). Bahan tersebut disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 20 menit dengan tekanan 1,5 atm, pH medium diatur 5,7 kemudian ditambahkan gelrite atau Gellan Gum sebanyak 2,5 g/l. Zat pengatur tumbuh yang digunakan pada percobaan ini adalah 2,4-D dan kinetin dengan konsentrasi (0 sampai 4 mg/l). Jumlah ulangan sebanyak 5 botol dengan tiap botol berisi 5 eksplan sehingga dalam satu ulangan ada 25 eksplan.

Pelaksanaan Percobaan

Eksplan yang berupa daun muda dan petiol diambil dari tanaman yang telah ditumbuhkan di rumah kaca (Gambar 1), dibersihkan dengan air mengalir. Daun disterilisasi menggunakan larutan 0,2% Dithane M-45 selama 30 menit, lalu dibilas sampai bersih. Di dalam *laminar air flow*, daun direndam dalam alkohol 70% selama 3-5 menit dilanjutkan dengan perendaman dalam Calsium hipoklorit 20% selama 15 menit. Selanjutnya daun dibilas sampai bersih dengan air steril, daun kemudian dipotong-potong dengan ukuran ± 1 cm x 1 cm.

Kultur diinkubasi dalam ruang gelap pada temperatur 24 °C dan kelembaban relatif $\pm 60\%$ selama 2 bulan. Setelah 2 bulan disubkultur ke media yang sama untuk menginduksi kalus sekunder. Peubah yang diukur adalah persentasi

kalus yang terbentuk, morfologi kalus, berat basah kalus, dan jumlah globular.

Data yang diperoleh diuji secara statistik dengan anova atau sidik ragam. Kemudian nilai rata-rata antar perlakuan diuji jarak dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf uji 5%.



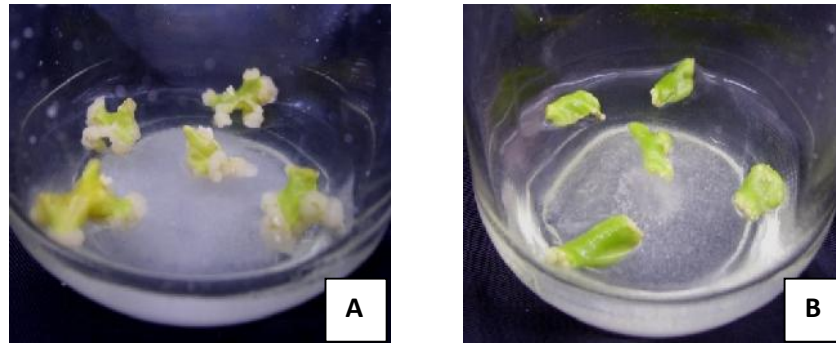
Gambar 1. Keragaan tanaman kopi arabika yang digunakan sebagai sumber eksplan

Figure 1. Growth performance of arabica coffee on which their leaves are used as an explant source

HASIL DAN PEMBAHASAN

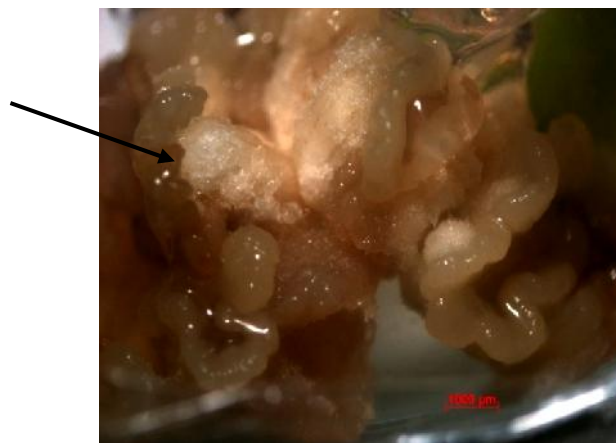
Sumber Eksplan Daun Muda Kopi Arabika

Hasil pengamatan terhadap perkembangan kalus dari eksplan daun sampai terbentuk kalus memperlihatkan bahwa dalam media induksi, eksplan mulai membengkak tiga minggu setelah pengkulturan. Pada minggu keempat terlihat adanya pengkalusan dibagian bekas sayatan. Kalus dan massa proembrio mulai terlihat nyata dan semakin bertambah banyak setelah 2 bulan dalam media perlakuan (Gambar 2). Hal ini berbeda dengan perlakuan kontrol (media tanpa zat pengatur tumbuh) tidak terlihat adanya pembentukan kalus, pada pinggiran bekas sayatan hanya terlihat sedikit pembengkakan jaringan dan tidak menunjukkan perkembangan untuk menjadi kalus.



Gambar 2. Keragaan eksplan daun kopi yang berkalus pada media dengan penambahan 2,4-D dan kinetine 2 bulan setelah tanam (A). Eksplan yang tidak berkalus dalam media kontrol tanpa pemberian ZPT (B).

Figure 2. Performance of coffee leaf explants on media treated with 2,4-D and kinetine for two months after planting (A), and no callus formed on those of without PGR (B).



Gambar 3. Keragaan kalus non embriogenik (tanda panah) yang masih terdapat diantara kalus embriogenik

Figure 3. Performance of non-embryonic callus (arrow) observed among of the embryonic callus

Berbeda dengan hasil penelitian Priyono (1993), yang mendapatkan kalus dan embrio somatik pada permukaan maupun sisi daun. Pada penelitian ini kalus maupun massa proembrio hanya terbentuk di dekat bekas sayatan saja. Perbedaan ini juga dijumpai pada penelitian Oktavia *et al.*, (2003) bahwa kalus hanya terbentuk dibekas luka sayatan eksplan. Perbedaan ini kemungkinan besar dikarenakan respon dari genotipe tanaman yang digunakan berbeda sehingga tanggap jaringan terhadap ZPT juga berbeda.

Pada perlakuan dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin, persentasi pembentukan kalus embriogenik masih belum seperti yang diharapkan. Walaupun semua ekplan berhasil membentuk kalus namun persentasi

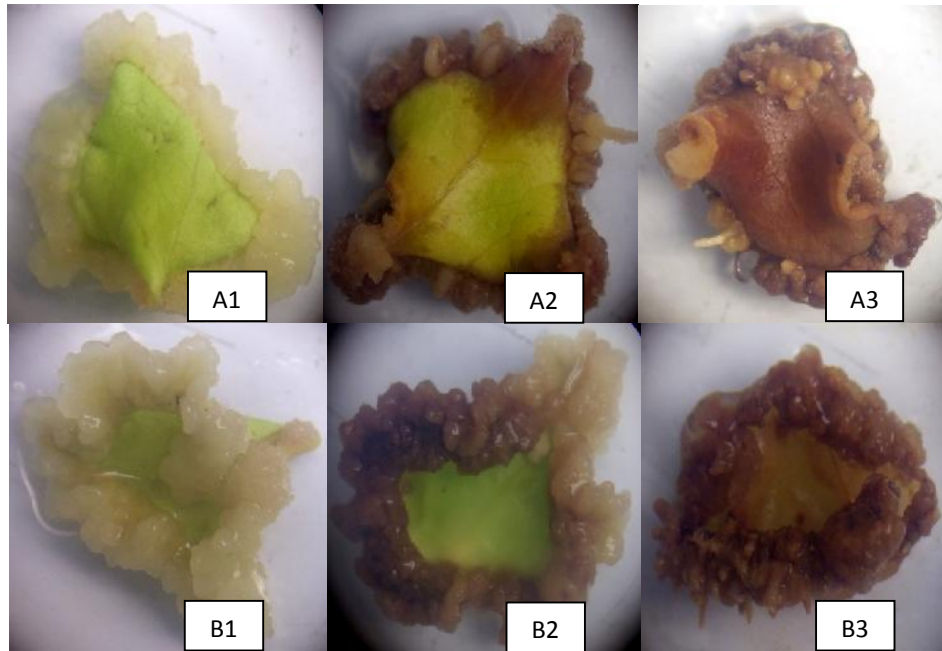
pembentukan kalus embriogenik belum ada yang mencapai 100%. Dari kalus yang terbentuk masih ditemukan kalus yang non embriogenik di antara kalus embriogenik. Kalus non embriogenik yang terbentuk berwarna putih berstruktur kompak seperti kapas (Gambar 3). Kalus non embriogenik merupakan kalus yang tidak mempunyai kemampuan untuk beregenerasi membentuk planlet.

Dalam perkembangannya, proembrio mulai jelas bentuk dan warnanya setelah 2 bulan dalam media kultur. Embrio yang mulai membesar berbentuk bulat (granular) dengan warna transparan kuning kecokelatan. Permukaan embrio terlihat halus dan mengkilap. Disamping terbentuk proembrio dan embrio, juga terbentuk kalus

berstruktur remah di sisi eksplan yang tidak ditumbuhi embrio somatik. Tahapan perubahan dari kalus menjadi embrio globular dapat dilihat pada Gambar 4.

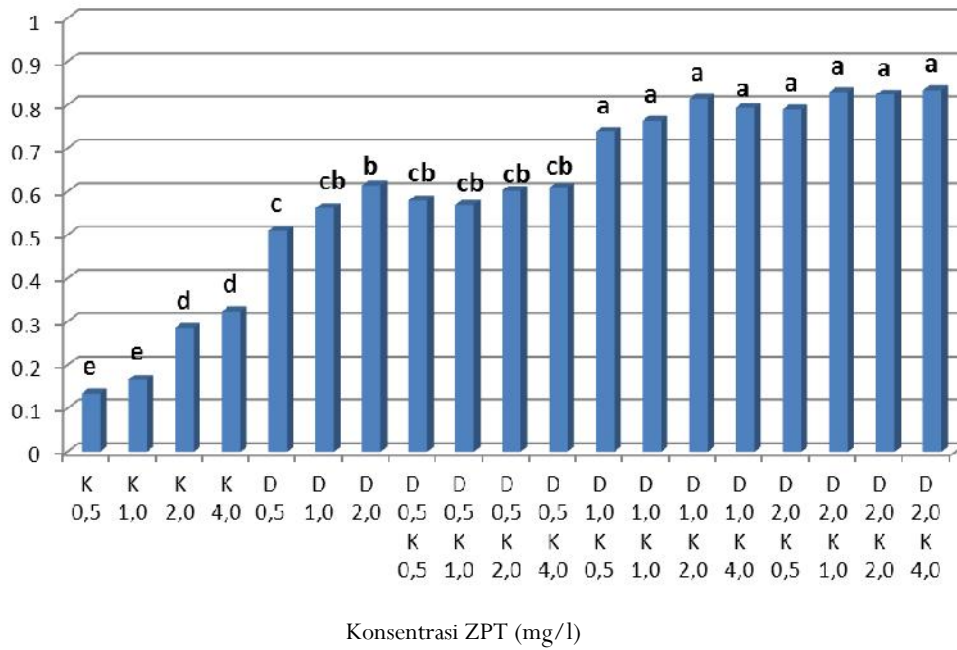
Hasil penimbangan terhadap bobot eksplan setelah dikultur selama 2 bulan pada media perlakuan memperlihatkan peningkatan. Pertambahan berat ini secara sangat nyata berbeda antara kombinasi perlakuan 2,4-D dan kinetin yang

diberikan (Gambar 5). Perlakuan dengan pemberian zat pengatur tumbuh kombinasi 2,4-D dan kinetin mempunyai berat jauh lebih besar dibandingkan dengan pemberian secara tunggal. Hasil ini menunjukkan bahwa untuk menginduksi kalus embriogenik dan massa proembrio kopi arabika selain membutuhkan auksin juga memerlukan sitokinin.



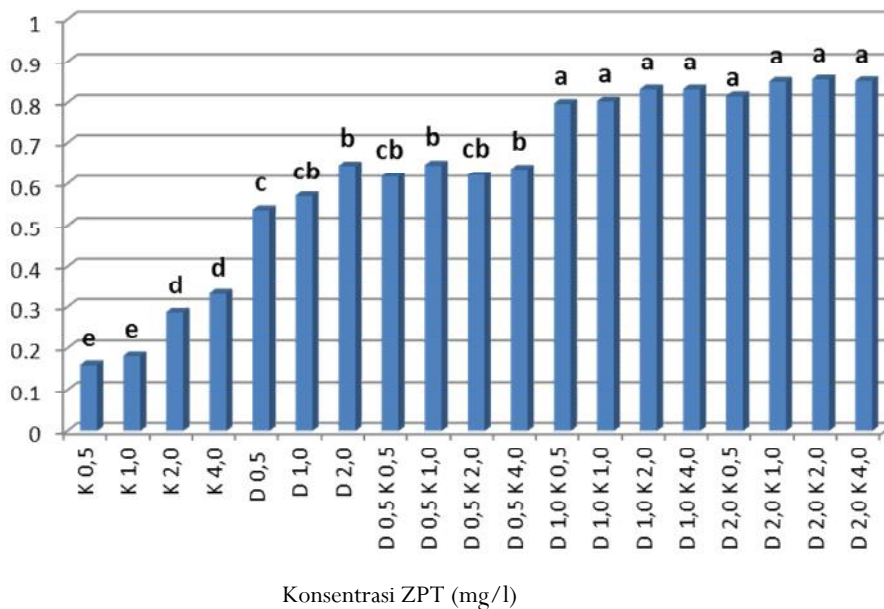
Gambar 4. Keragaan perkembangan kalus embriogenik dan massa proembrio berkembang menjadi embrio melalui proses embriogenesis pada media induksi. Keragaan eksplan dilihat dari arah atas (A1-A3), sementara Gambar B1-B3 ketika posisi eksplan dilihat dari bawah. Kalus embriogenik dan massa proembrio yang terbentuk 2 bulan setelah kultur (A1 dan B1). Kalus dan massa proembrio yang berwarna putih kekuningan berubah menjadi kuning kecokelatan 3 bulan setelah kultur. Proembrio dan embrio terlihat mulai terbentuk (A2 dan B2). Embrio yang terbentuk berwarna coklat dan sebagian membentuk akar adventif (A3 dan B3).

Figure 4. Performance of embryogenic callus and proembryo mass developed to become embryo through embriogenesis processes on induction media. Explants shown from above side (A1 - A3), and those of below side (B1-B3). Embriogenic dan proembryo mass were formed for two months after planting (A1 dan B1). Callus dan proembryo mass having in yellowish white, turn becoming brownish yellow for three months after planting: Proembryo and embryo were then formed (A2 dan B2), and those embryo formed in brown colour and partly form adventive roots (A3 dan B3).



Gambar 5. Grafik pertambahan rata-rata bobot basah eksplan setelah dikulturkan selama 2 bulan di dalam media induksi dengan berbagai konsentrasi ZPT. Huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan ($\alpha = 0,05$).

Figure 5. Increase mean of fresh weight of explant cultured for two months on induction media at various concentration of PGR. Those are followed by same letters being not significantly different in Duncan Test ($\alpha = 0,05$).



Gambar 6. Grafik pertambahan rata-rata bobot basah eksplan setelah disubkultur pada media induksi yang sama selama 2 bulan dengan berbagai konsentrasi ZPT. Huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan ($\alpha = 0,05$).

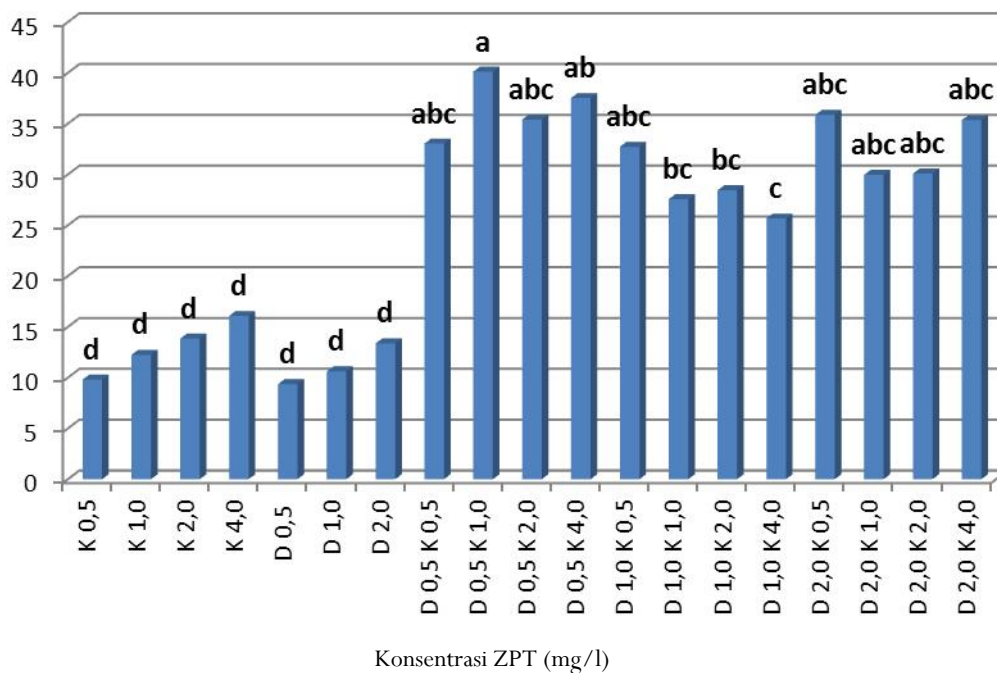
Figure 6. Increase mean of fresh weight of explant after subcultured on induction media for two months at various concentration of PGRs. Those are followed by same letters being not significantly different in Duncan Test ($\alpha = 0,05$).

Menurut Chaudhury dan Qu (2000), auksin yang digunakan bersama-sama dengan sitokinin dapat menstimulasi embriogenesis, namun untuk menginduksi embrio somatik diperlukan rasio tertentu dari kombinasi auksin dan sitokinin tersebut. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa ketika jaringan eksplan kopi arabika ditempatkan di medium 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).

Bobot eksplan bertambah berat setelah disubkultur selama 2 bulan ke dalam media yang sama (Gambar 6). Namun, pertambahan berat relatif kecil dibandingkan pertambahan bobot basah pada kutur sebelumnya. Hal ini diduga pada saat ini massa proembrio sedang mengalami desikasi sehingga pertambahan bobot tidak begitu banyak berubah. Proses desikasi ini ditandai oleh

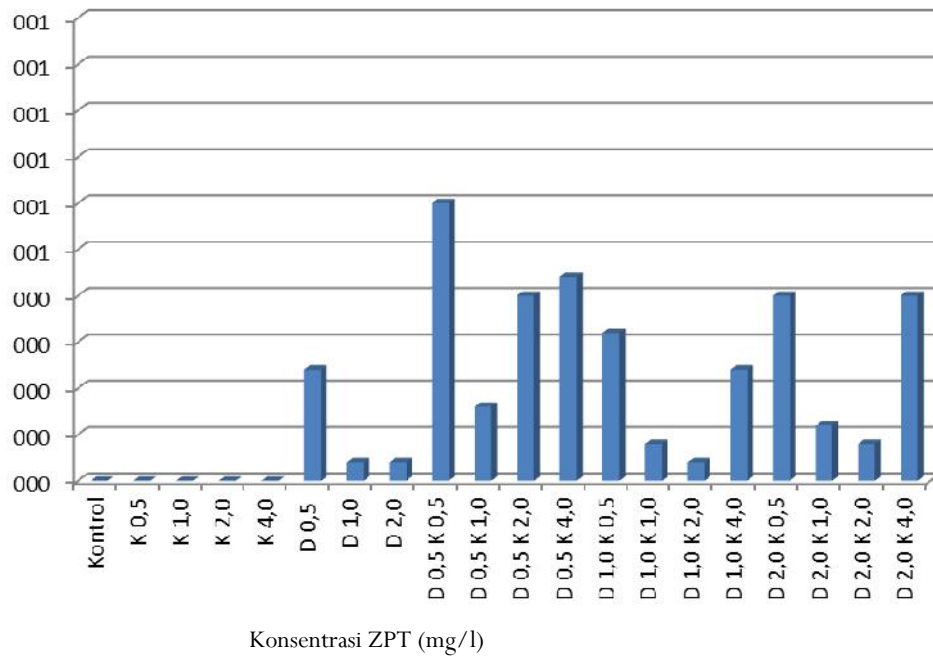
perubahan warna dari putih kekuningan menjadi kuning kecokelatan dan cokelat.

Hasil pengamatan terhadap induksi embrio pada tanaman kopi arabika varietas Sigarar Utang memperlihatkan semua perlakuan baik pemberian 2,4-D dan kinetin secara tunggal dan kombinasi antara keduanya membentuk embrio. Namun masing-masing perlakuan memberikan kecepatan tanggap induksi embrio yang berbeda. Hal ini mungkin terjadi karena pengaruh perbandingan konsentrasi 2,4-D, kinetin dan kombinasi 2,4-D dengan kinetin yang berbeda dari semua perlakuan. Keadaan ini hampir sama dengan hasil penelitian, Sumaryono dan Tahardi (1993), Riyadi dan Tirtoboma (2004), yang melaporkan bahwa variasi konsentrasi auksin menyebabkan tanggap induksi embrio somatik kopi berbeda antar perlakuan. Pada penelitian ini perlakuan kombinasi 0,5 mg/l 2,4-D dan 4 mg/l kinetin menghasilkan jumlah embrio tertinggi dengan jumlah rataannya 40,12. Keragaan grafik jumlah embrio yang terbentuk pada semua perlakuan dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Grafik rata-rata jumlah embrio yang terbentuk setelah disubkultur pada media induksi yang sama selama 2 bulan dengan berbagai konsentrasi ZPT. Huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan ($\alpha = 0,05$)

Figure 7. Mean of embryo number formed after subcultured on the same of induction media for two months at various concentration of PGRs. Those are followed by same letters being not significantly different in Duncan Test ($\alpha = 0,05$)



Gambar 8. Grafik rata-rata jumlah akar yang terbentuk pada media induksi 4 bulan setelah kultur dengan berbagai konsentrasi ZPT.
 Figure 8. Mean of roots formed on induction media for four months after planting at various concentration of PGRs.

Selain membentuk kalus, massa proembrio dan embrio, perlakuan 2,4-D dan kinetin baik secara tunggal maupun kombinasi dari keduanya juga menghasilkan akar adventif. Dari hasil pengamatan walaupun tidak menunjukkan hasil yang signifikan secara statistik, perlakuan 2,4-D konsentrasi 0,5 mg/l dan kinetin 0,5 mg/l menghasilkan jumlah akar tertinggi dengan jumlah rata-ratanya 0,6, disusul dengan 2,4-D 0,5 mg/l dan kinetin 4 mg/l. Akar adventif ini diduga karena pengaruh dari kandungan auksin endogen pada eksplan sehingga secara total kandungan auksin menjadi meningkat.

Menurut Wattimena *et al.* (1992) dan Gunawan (1992), keseimbangan antara zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin yang diberikan pada media kultur serta kandungan endogen akan sangat mempengaruhi dan menentukan arah perkembangan eksplan. Akar terbentuk jika konsentrasi auksin lebih tinggi dari sitokinin. Dari Gambar 8, terlihat bahwa pemberian 2,4-D yang lebih tinggi dari 0,5 mg/l dapat menekan terbentuknya akar adventif dan dapat meningkatkan bobot basah eksplan. Namun, pemberian 2,4-D saja tanpa dikombinasikan dengan

kinetin menghasilkan jumlah embrio yang lebih sedikit.

Pemberian konsentrasi auksin yang rendah dan sitokinin yang lebih tinggi diharapkan dapat menghindari terbentuknya akar adventif dan jumlah embrio yang dihasilkan cukup banyak. Selain mengatur konsentrasi zat pengatur tumbuh, mengatur nisbah dari N tereduksi dan N teroksidasi, mengatur konsentrasi sumber energi, dan mengatur konsentrasi asam amino juga merupakan hal yang perlu diperhatikan dalam proses embriogenesis somatik (Gray, 2005). Sehingga untuk penelitian lebih lanjut faktor-faktor tersebut perlu diperhatikan keberadaannya dalam media kultur.

KESIMPULAN

Media MS dengan 0,5 konsentrasi garam makro dan mikro yang dilengkapi vitamin B5, zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin baik secara tunggal maupun kombinasi dapat menginduksi kalus dan massa proembrio kopi arabika varietas Sigarar Utang 2 bulan setelah kultur. Pertambahan berat eksplan tertinggi diperoleh pada media yang

ditambahkan kombinasi 2,4-D 1 mg/l atau 2 mg/l dan kinetin 1 sampai 4 mg/l. Embrio somatik terbanyak diperoleh pada media yang diberi 2,4-D 0,5 mg/l dan kinetin 1 mg/l. Selain kalus, massa proembrio dan embrio terbentuk akar adventif yang jumlahnya tidak signifikan antar perlakuan.

DAFTAR PUSTAKA

- Bieysse, D., A. Gofflot and N. Michaux-ferriere. 1993. Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Can. J. Bot.* 71, 1496-1502.
- 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 callus induction medium. *Plant Cell, Tissue Organ. Cult.* 60: 113-120.
- Ehsanpour, A. A. 2002. Induction of Somatic Embryogenesis from Endosperm of Oak (*Quercus castanifolia*). In A. Taji and R. Williams (ed.) *The Importance of Plant Tissue Culture and Biotechnology in Plant Sciences*. Univ. of New England Unit, Australia. pp 273-277.
- Etienne, H. and B. Bertrand. 2001. The effect of the embryogenic cell suspension micropropagation technique on the trueness to type, field performance, bean biochemical content and cup quality of *Coffea arabica* trees. *Tree Physiol* 21:1031-1038.
- Gatica, A. M., G. Arrieta, and A. M. Espinoza. 2008. Direct Somatic Embryogenesis in *Coffea arabica* L. CVS. Caturra and Catuai: Effect of Triacetonol, light condition, and medium Consistency *Agronomía Costarricense* 32(1): 139-147. ISSN:0377-9424 / 2008. www.mag.go.cr/revagr/inicio.htm. Diakses : 2 Agustus 2011.
- Gray, D. J. 2005. Propagation from Nonmeristematic Tissue Culture: Non Zygotic Embryogenesis. Dalam Triigano R.N. and Gray D.J. (Eds). RCR Press. LLC. 2005. New York. Hlm. 187-200.
- Gunawan, L. W. 1992. Teknik Kultur jaringan. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman. PAU. Bioteknologi Tanaman. IPB. Bogor. 252 hlm.
- Mawardi, S. 1999. Kopi Spesialti sebagai Alternatif Pengembangan Kopi di Indonesia. *Warta Pusat Penelitian Kopi dan Kakao* 15(1): 28-40.
- 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 Tiss. 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, Budiani A., dan Sudarsono. 2003. Embriogenesis somatik langsung dan regenerasi planlet kopi arabika (*Coffea arabica*) dari berbagai eksplan. *Menara Perkebunan* 71(2): 44-55.
- Priyono. 2004. Kultur in vitro daun kopi untuk mengetahui kemampuan embriosomatik beberapa spesies kopi. *Pelita Perkebunan* 20(3): 110-130.
- Priyono. 1991. Organogenesis dan embriogenesis somatik pada kultur in vitro jaringan hipokotil kopi arabika. *Pelita Perkebunan* 6(4): 97-102.
- Priyono dan I. Hartana. 1991. Perbanyak mikro kopi arabika melalui teknik induksi tunas adventif secara langsung dan penggandaan tunas aksilar. *Prosiding Seminar Bioteknologi Perkebunan dan Lokakarya Biopolimer Untuk Industri*. Bogor, 10-11 Desember 1991. Pusat Antar Universitas IPB. Bogor.

- Priyono. 1993. Embriogenesis somatic langsung pada kultur *in vitro* eksplan daun kopi arabika (*Coffea arabica*). *J. Pert. Indonesia* 3 (1): 16-20.
- Riyadi, A. dan Tirtoboma. 2004. Pengaruh 2,4-D terhadap induksi embrio somatik kopi arabika. *Buletin Plasma Nutfah* 10 (2).
- Samson N. P., C. Campa, L. Le Gal, M. Noirot, G. Thomas, T. S. Lokeswari, and de Kochko. 2006. Effect of primary culture medium composition on high frequency somatic embryogenesis in different *Coffea* spesies *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 86: 37-45.
- Santos-Briones, C. D. L. and S. M. T. Hernández-Sotomayor. 2006. Coffee biotechnology. *Braz. J. Plant Physiol.* 18(1): 217-227.
- Sumaryono dan J. S. Tahardi. 1993. Perbanyak klon kopi robusta toleran nematoda melalui embriogenesis somatik langsung. *Menara Perkebunan* 61(3): 50-55.
- Suryowinoto, M. 1996. Prospek Kultur Jaringan dalam Perkembangan Pertanian Modern. Universitas Gadjah Mada. hal. 1-10.
- Terzi, M. and F. Loschiavo. 1990. Somatic Embryogenesis. In S.S. Bhajwani (ed.) *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo. p. 55-66.
- Warga-Dalem, S. K. 1985. Embriogenesis Somatik dan Regenerasi Tanaman pada Kultur Daun Kopi Robusta (*Coffea canephora*). Bogor, Fakultas Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. 66 hal. (tidak dipublikasikan).
- Wattimena, G. A. (1988). *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Pusat Antar Universitas IPB. Bogor.
- Wattimena, G. A., L. W. Gunawan, N. A. Matjik, E. Syamsudin, N. M. A. Wiendi, dan A. Ernawati. 1992. *Bioteknologi Tanaman*. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat antar Universitas Bioteknologi. IPB. 309 hal.