

Pengaruh Auksin 2,4-D dan Sitokinin 2-ip Terhadap Pembentukan Embriogenesis Somatik Langsung Pada Eksplan Daun *Coffea arabica* L.

The Effect of Auxin 2,4-D and Cytokinin 2-ip on Direct Somatic Embryogenesis Formation of Coffea arabica L. Leaf Explant

Rina Arimarsetiowati*¹⁾

Ringkasan

Salah satu teknik perbanyakan untuk memproduksi tanaman kopi adalah dengan kultur jaringan. Teknik kultur jaringan untuk *Coffea arabica* L. menghadapi berbagai kendala terutama dalam regenerasi pembentukan planlet dari eksplan. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh kombinasi 2,4-D dan 2-ip dalam pembentukan embriogenesis somatik langsung pada eksplan daun *C. arabica* L. Auksin (2,4-D) dan sitokinin (2-ip) dengan konsentrasi masing-masing 1; 5 μ M dan 5; 10; 15; 20 μ M digunakan sebagai perlakuan. Penelitian dirancang dengan rancangan acak lengkap dengan 10 ulangan. Pengamatan induksi embriogenesis somatik dilakukan secara kuantitatif dengan menghitung persentase daun yang berkalus dan kalus embriogenik yang terbentuk. Di samping itu dilakukan pengamatan secara kualitatif deskriptif terhadap perkembangan pembentukan embriogenesis. Hasil penelitian pada kopi Arabika klon AS 2K menunjukkan bahwa daun dapat diinduksi pada semua kombinasi medium kecuali pada kombinasi medium yang mengandung 5 μ M 2,4-D dan 20 μ M 2-ip. Pada kopi Arabika varietas S 795, Sigararutang dan AS 1 menunjukkan bahwa daun dapat diinduksi pada semua kombinasi medium. Hasil terbaik daun yang membentuk kalus pada klon AS 2K, Sigararutang dan AS 1 dicapai pada kombinasi medium yang mengandung 1 μ M 2,4-D dan 10 μ M 2-ip, sedangkan pada S 795 hasil terbaik daun yang membentuk kalus dicapai pada kombinasi medium yang mengandung 5 μ M 2,4-D dan 10 μ M 2-ip. Persentase kalus embriogenik somatik tertinggi pada semua varietas kopi Arabika dicapai pada kombinasi media 5 μ M 2,4-D dan 5 μ M 2-ip.

Summary

One of the propagation technique for coffee plant production is tissue culture. Tissue culture technique for Coffea arabica L. faces some problems, mainly in the planlet formation regenerated from explants. The objective of this experiment was to examine the effect 2,4-D and 2-ip combination on the formation of direct somatic embryogenesis of Coffea arabica L. in leaves explant. Auxin (2,4-D) and cytokinin (2-ip) concentrations of, respectively, 1; 5 μ M and 5; 10; 15; 20 were used as treatments. This research was conducted using completely randomized design with 10 replications. Observation to induce somatic embryos was done by quantitatively on number of callus from explant and number of embryogenic callus. Beside that, observation by qualitative descriptive was also done on deve-

Naskah diterima (received) 30 Desember 2010, disetujui (accepted) 25 Maret 2011.

1) Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, Jl. PB. Sudirman No. 90, Jember, Indonesia.

*) Alamat penulis (Corresponding Author) : rina_arimar@yahoo.co.id

lopment of embryogenesis. The results showed that Arabica coffee leaves explant of AS 2K clones could be induced in all medium combination except 5 μ M 2,4-D and 20 μ M 2-ip combination. Arabica coffee leaves explant of S 795, Sigararutang and AS 1 varieties could be induced in all medium combination. The highest frequency of callus formation was found in AS 2K, Sigararutang and AS 1 varieties on medium containing 1 μ M 2,4-D in combination with 10 μ M 2-ip, whereas for the S 795 variety on medium containing 5 μ M 2,4-D in combination with 10 μ M 2-ip. The highest frequency of embryogenic callus in all Arabica coffee variety could be reached on medium containing 5 μ M 2,4-D in combination with 15 μ M 2-ip.

Key words : *Coffea arabica* L., somatic embryogenesis, 2,4-D, 2-ip, tissue culture, leaves, callus embryogenic.

PENDAHULUAN

Tanaman kopi merupakan komoditas tropis yang sangat penting dalam perdagangan dunia dengan lebih dari 6,5 juta ton biji dihasilkan setiap tahun dari sekitar 11 juta hektar (Giridhar *et al.*, 2004). Produksi kopi komersial yang utama dari 2 spesies yaitu *Coffea arabica* dan *C. canephora*. *C. arabica* menghasilkan lebih dari 70% produksi kopi dunia dan mempunyai rasa dan kualitas istimewa dibandingkan *C. canephora* (Priyono *et al.*, 2010).

Perbanyakan kopi Arabika umumnya dilakukan secara generatif menggunakan biji atau secara vegetatif menggunakan stek, okulasi dan sambung pucuk. Cara perbanyakan ini memiliki keterbatasan dalam jumlah bahan tanam. Dengan teknik kultur jaringan diharapkan kendala tersebut dapat diatasi, sehingga bahan tanam klonal berjumlah besar dapat disediakan dalam waktu yang relatif singkat (Gunawan, 1992).

Penggandaan biakan dalam kultur jaringan dapat dilakukan melalui jalur organogenesis dan embriogenesis somatik. Cara yang paling banyak diterapkan untuk meregenerasikan planlet dari kultur jaringan adalah melalui embriogenesis somatik. Embriogenesis somatik merupa-

kan suatu proses dengan sel somatik (baik haploid maupun diploid) berkembang membentuk tumbuhan baru melalui tahap perkembangan embrio yang spesifik tanpa melalui fusi gamet (Williams & Maheswara, 1986). Cara embriogenesis somatik menghasilkan jumlah propagul banyak dan efisien dalam waktu relatif singkat (Priyono *et al.*, 2010). Regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik merupakan metode perbanyakan tanaman yang paling efektif untuk menghasilkan tanaman klonal tetraploid ($2n = 44$) pada *Coffea arabica* L. (Etienne-Barry *et al.*, 2002).

Pada tanaman kopi beberapa sistem model induksi embriogenesis somatik yang menggunakan eksplan daun telah banyak dilaporkan. Quiroz-Figueroa *et al.* (2001) mengembangkan kultur suspensi sel embriogenik *Coffea arabica* cv. Caturra Rojo menggunakan eksplan daun. Quiroz-Figueroa *et al.* (2002) menganalisis histologi dari eksplan daun *Coffea arabica* untuk mendorong embriogenesis somatik. Albarra'n *et al.* (2005) telah mendapatkan embrio somatik pada *Coffea arabica* dari kultur kalus menggunakan eksplan daun. Etienne *et al.* (2002) menjelaskan tahap awal untuk memproduksi kalus embriogenik menggunakan potongan daun yang masih muda yang telah disterilisasi sebagai

eksplan. Riyadi & Tirtoboma (2004) menggunakan eksplan berupa daun muda yang masih berwarna hijau kemerahan dari tanaman kopi Arabika varietas Kartika 1 untuk menginduksi embrio somatik. Papanastasiou *et al.* (2008) menggunakan eksplan daun yang berumur 6 bulan yang dikembangkan dari benih kopi Arabika Ruiru 11 untuk menginduksi kalus.

Usaha perbanyak kopi Arabika melalui kultur jaringan telah lama dilakukan namun sampai saat ini masih menghadapi berbagai kendala (Oktavia *et al.*, 2003). Hal ini dikarenakan kemampuan regenerasi spesies kopi dengan teknik embriogenesis somatik sangat bervariasi dan tergantung pada spesies yang dikulturkan (Priyono, 2004) serta hormon pertumbuhan tanaman (Yasuda *et al.*, 1985). Komposisi media kultur menentukan lingkungan sel dan jaringan kultur *in vitro*. Pada awal inisiasi, kalus tumbuh pada potongan permukaan eksplan yang dikulturkan (Santana *et al.*, 2007). Pada dasarnya tergantung pada faktor genetik dan lingkungan (Priyono *et al.*, 2010). Di samping pemilihan jaringan yang tepat sebagai sumber eksplan, keberhasilan embriogenesis somatik juga ditentukan oleh beberapa faktor di antaranya genotipe (Bieysee *et al.*, 1993) dan komposisi zat pengatur tumbuh antara auksin dan sitokinin (Gunawan, 1992). Zat pengatur tumbuh 2,4-D merupakan auksin yang paling umum digunakan untuk menginduksi embriogenesis somatik (Wattimena, 1988). Selain berpengaruh terhadap diferensiasi sel dalam proses embriogenesis somatik beberapa jenis sitokinin yang biasa digunakan dalam menginduksi embriogenesis somatik pada tanaman kopi adalah BAP, kinetin, zeatin dan 2-ip (Sondahl *et al.*, 1994).

Kehadiran auksin dalam media sangat esensial dalam inisiasi embrio (Razdan,

2003). Chung *et al.* (2005) melaporkan bahwa sitokinin (2iP, BA, kinetin, TDZ, and zeatin) lebih efektif dalam embriogenesis somatik secara langsung pada eksplan daun tanaman anggrek *Dendrobium* kultivar Chiengmai Pink sedangkan auksin (2,4-D, IAA, IBA, and NAA) sebagai penghambat. Penambahan 2,4-D dan 2-ip berkombinasi mampu menginduksi embriogenesis somatik langsung pada kopi Arabika BP 426 A pada eksplan daun, epikotil, hipokotil, akar (Oktavia *et al.*, 2003). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh 2,4-D yang dikombinasi dengan 2-ip terhadap pembentukan dan perkembangan embriogenesis somatik langsung.

BAHAN DAN METODE

Sumber dan Sterilisasi Eksplan

Penelitian ini menggunakan kopi Arabika klon AS 2K, S 795, Sigararutang dan AS 1 yang berasal KP Andungsari, Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. Bahan tanam yang digunakan untuk induksi kalus adalah daun yang berada pada posisi kedua sampai ketiga dari atas tanaman yang ditanam dalam rumah kaca (Priyono *et al.*, 2010).

Sterilisasi daun dilakukan dengan cara merendam daun dalam larutan Tween sebanyak 2–3 tetes selama 20 menit dilanjutkan dengan merendam daun dalam larutan Benlate sebanyak 2g/L selama 30 menit. Setelah itu daun direndam dalam kalsium hipoklorit 30% selama 40 menit. Daun direndam dalam alkohol 70% selama 5 menit. Daun dibilas sampai bersih, diletakkan dalam gelas petri steril kemudian dipotong-potong dengan ukuran 0,5x0,5 cm dengan tulang daun dihilangkan. Penghilangan tulang daun ini dimaksudkan untuk menghindari kontaminasi

bakteri. Seluruh pekerjaan dilakukan dalam *Laminar Air Flow*.

Induksi Embriogenesis Somatik (ES) Langsung

Medium dasar yang digunakan untuk induksi ES adalah setengah konsentrasi garam makro dan mikro MS (Murashige & Skoog, 1962) yang dilengkapi dengan vitamin B5 (Gamborg *et al.*, 1968), 30 g/L sukrosa, 2 g/L gelrite dan 250 mg/L polivinil pirolidon. Zat pengatur tumbuh yang ditambahkan terdiri atas delapan kombinasi, yaitu 1 dan 5 μ M 2,4-D (2,4-dichloro phenoxy acetic acid) dengan 5, 10, 15 dan 20 μ M 2-ip (2-indole phenolic acid) (Oktavia *et al.*, 2003). Penelitian disusun menurut rancangan acak lengkap faktorial dengan menggunakan uji Duncan. Masing-masing perlakuan diulang sepuluh kali, setiap ulangan terdiri atas enam eksplan, sehingga untuk masing-masing perlakuan dikulturkan sebanyak 60 eksplan. Kultur diinkubasi dalam ruang gelap yang bersuhu sekitar 28°C. Pengamatan dilakukan secara kuantitatif (persentase) untuk jumlah eksplan yang membentuk kalus dan jumlah kalus yang embriogenik. Selain itu juga dilakukan pengamatan kualitatif deskriptif untuk mengetahui perkembangan pembentukan embriogenesis. Pengamatan secara kuantitatif dilakukan setelah kultur berumur 16 minggu sedangkan pengamatan perkembangan embrio diamati setiap minggu dari sejak eksplan dikulturkan hingga kultur berumur delapan bulan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembentukan somatik embriogenesis langsung pada kopi Arabika menggunakan eksplan daun berdasarkan hasil pengujian Oktavia *et al.* (2003) pada kopi Arabika

BP 426 A menggunakan 4 jenis eksplan (daun, epikotil, hipokotil, akar) menunjukkan bahwa eksplan daun menghasilkan embrio somatik lebih banyak dibandingkan eksplan lainnya. Hal ini juga sesuai dengan penelitian Priyono *et al.* (2010) menggunakan daun sebagai eksplan induksi kalus. Hasil penelitian pada kopi Arabika klon AS 2K menunjukkan bahwa daun dapat diinduksi membentuk kalus pada beberapa kombinasi medium kecuali pada kombinasi medium yang mengandung 5 μ M 2,4-D dan 20 μ M 2-ip (Tabel 1). Pada kopi Arabika varietas S 795, Sigararutang dan AS 1 menunjukkan bahwa daun dapat diinduksi pada semua kombinasi medium (Tabel 1). Hasil terbaik daun yang membentuk kalus pada klon AS 2K, Sigararutang dan AS 1 dicapai pada kombinasi medium yang mengandung 1 μ M 2,4-D dan 10 μ M 2-ip (Tabel 1), sedangkan pada S 795 hasil terbaik daun yang membentuk kalus dicapai pada kombinasi medium yang mengandung 5 μ M 2,4-D dan 10 μ M 2-ip (Tabel 1). Persentase kalus embriogenik somatik tertinggi pada semua varietas kopi Arabika dicapai pada kombinasi media 5 μ M 2,4-D dan 5 μ M 2-ip (Tabel 2).

Penambahan 2,4-D dan 2-ip yang berkombinasi ke dalam medium mampu menginduksi pembentukan ES langsung. Secara umum, pada medium dengan penambahan 1 μ M 2,4-D berkombinasi dengan 5,10,15 dan 20 μ M 2-ip, menunjukkan bahwa persentase pembentukan embriogenesis somatik meningkat dan kemudian menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi 2-ip pada semua varietas. Pada perlakuan 1 μ M 2,4-D dan 10 μ M 2-ip dapat menginduksi kalus lebih banyak sehingga proses perbanyakannya menjadi lebih cepat pula (Tabel 2).

Pada semua varietas, peningkatan konsentrasi 2,4-D dari 1 μ M menjadi 5 μ M

Tabel 1. Pengaruh zat pengatur tumbuh terhadap kemampuan daun membentuk kalus pada empat varietas kopi Arabika
 Table 1. The effect of plant growth regulator on callus formation from leaves in the four of Arabica coffee varieties

Zat pengatur tumbuh, μM <i>Plant growth regulator, μM</i>		Respon tumbuh varietas kopi Arabika, % <i>Growth response of Arabica coffee variety, %</i>			
2-ip	2,4-D	AS 2K	S 795	Sigararutang	AS 1
5	1	2.0 d	2.7 g	17.8 b	1.5 e
	5	1.6 e	2.5 h	8.3 c	1.7 d
10	1	4.1 a	5.3 c	32.4 a	3.4 a
	5	2.7 c	5.9 a	18.8 b	2.8 b
15	1	3.3 b	4.3 e	19.5 b	2.5 c
	5	2.6 c	5.7 b	18.5 b	2.6 c
20	1	2.7 c	3.8 f	18.2 b	1.8 d
	5	0.0 f	4.7 d	18.3 b	1.5 e

Catatan (Notes) : Data dalam kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji Duncan 5%
 (Numbers in the same column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan test 5%).

pada medium induksi mengakibatkan penurunan daun yang membentuk kalus dan meningkatkan jumlah kalus embriogenik (Tabel 1 dan 2). Hal ini sesuai dengan pernyataan Razdan (2003) bahwa inisiasi kalus embriogenik dibutuhkan media yang kaya auksin 2,4-D. Jaringan atau kalus dipelihara secara terus-menerus dalam media tanpa auksin maka tidak akan membentuk embrio. Kebanyakan 2,4-D digunakan untuk induksi embriogenesis somatik. Tingkat kemudahan daun yang membentuk kalus dan kalus embriogenik yang terbentuk antarvarietas kopi Arabika sangat bervariasi. Masing-masing perlakuan memberikan persentase tanggap induksi kalus embriogenik yang berbeda. Hal ini diduga terjadi karena pengaruh perbandingan konsentrasi 2,4-D dengan 2-ip mg/L (auksin dengan sitokinin) yang berbeda dari semua perlakuan. Riyadi & Tirtoboma (2004) melaporkan bahwa variasi konsentrasi auksin menyebabkan respon induksi embrio somatik kopi Arabika berbeda antarperlakuan. Hasil penelitian Priyono (2004) menunjukkan bahwa kemampuan embriogenesis somatik

kopi sangat berbeda. Perbedaan tersebut diduga disebabkan perbedaan genetik antar spesies.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kopi Arabika klon AS 2K, Sigararutang dan AS 1 memerlukan sitokinin dengan konsentrasi yang cukup tinggi ($10\mu\text{M}$) dan auksin dengan konsentrasi rendah ($1\mu\text{M}$) untuk induksi kalus sedangkan untuk pembentukan kalus embriogenik memerlukan sitokinin dengan konsentrasi yang cukup rendah ($5\mu\text{M}$) dan auksin dengan konsentrasi tinggi ($5\mu\text{M}$). Pada kopi Arabika varietas S 795 memerlukan sitokinin dan auksin dengan konsentrasi yang cukup tinggi ($10\mu\text{M}$ dan $5\mu\text{M}$) untuk induksi kalus sedangkan untuk pembentukan kalus embriogenik memerlukan sitokinin dengan konsentrasi yang cukup rendah ($5\mu\text{M}$) dan auksin dengan konsentrasi tinggi ($5\mu\text{M}$). Kehadiran auksin dalam media sangat esensial dalam inisiasi kalus embriogenik. Jaringan atau kalus dipelihara secara terus-menerus dalam media tanpa auksin maka tidak akan membentuk embrio. Yasuda *et al.* (1985) dan Hatanaka *et al.* (1991) melaporkan bahwa embrio-

Tabel 2. Pengaruh zat pengatur tumbuh terhadap pembentukan kalus embriogenik pada empat varietas kopi Arabika

Table 2. The effect of plant growth regulator on embryogenic callus formation in the four of Arabica coffee varieties

Zat pengatur tumbuh, μM Plant growth regulator, μM		Respon tumbuh varietas kopi Arabika, % Growth response of Arabica coffee variety, %			
2-ip	2,4-D	AS 2K	S 795	Sigararutang	AS 1
5	1	0.1 c	0.4 d	0.9 f	0.1 c
	5	1.5 a	2.3 a	7.4 a	1.6 a
10	1	0.4 b	0.8 b	1.7 e	0.2 c
	5	0.5 b	0.9 b	3.3 b	0.4 b
15	1	0.1 c	0.3 d	0.4 g	0.1 c
	5	0.1 c	0.7 c	3.1 c	0.1 c
20	1	0.0 c	0.1 e	0.1 h	0.1 c
	5	0.0 c	0.3 d	2.2 d	0.1 c

Catatan (Notes) : Data dalam kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji Duncan 5% (Numbers in the same column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan test 5%).

genesis somatik tanaman kopi dapat diinduksi hanya dengan penambahan sitokinin saja. Oktavia *et al.* (2003) melaporkan kombinasi auksin ($1\mu\text{M}$) dan sitokinin ($15\mu\text{M}$) pada kopi Arabika menghasilkan embriogenesis somatik tertinggi. Peningkatan konsentrasi auksin menurunkan pembentukan embrioid. Selain faktor hormon tumbuh, Ramos *et al.* (1993) menunjukkan bahwa embriogenesis kopi Robusta dipengaruhi oleh genotipe kopi. Dari penelitian lain juga terbukti bahwa jumlah embriogenik terbanyak diperoleh pada media yang mengandung sitokinin yaitu 2-ip $5\mu\text{M}$ dalam Hatanaka *et al.* (1991) atau zeatin $10\mu\text{M}$ dalam Ramos *et al.* (1993), tanpa auksin.

Gunawan (1992) mengatakan bahwa interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke dalam medium dan yang diproduksi oleh sel secara endogen dapat menentukan arah perkembangan suatu kultur. Penambahan auksin pada medium dapat mengubah nisbah zat pengatur tumbuh endogen yang

kemudian menjadi faktor penentu untuk proses pertumbuhan dan morfogenesis dari eksplan.

Pada penelitian ini, selain terbentuk kalus juga dapat dihasilkan pembentukan embrio somatik secara langsung. Inisiasi embrioid mulai terlihat 12 minggu setelah kultur, yang terbentuk secara langsung pada eksplan tanpa melalui fase pembentukan kalus. Pembentukan ES diawali dengan terbentuknya embrioid berbentuk bintik-bintik putih pada eksplan sekitar 12 minggu setelah dikulturkan, selanjutnya kalus yang terbentuk menyebar di sekeliling daun. Kalus tersebut berkembang dan berwarna kecoklatan. Kalus yang berwarna kecoklatan berubah menjadi embrio fase globular berwarna putih setelah berumur 6 bulan. Embrio fase globular mulai berkembang menjadi fase hati dan torpedo pada umur 7 bulan, selanjutnya embrio fase globular mulai memperbanyak diri.

George & Sherrington (1984) dan Evans *et al.* (1981) mengemukakan bahwa permulaan pertumbuhan embrioid dimulai

dengan terbentuknya tonjolan yang membulat, biasanya muncul dari eksplan atau kalus. Tiap embrioid yang terbentuk sebelumnya melalui urutan perkembangan diawali stadium proembrio berkembang menjadi stadium globuler, bentuk jantung, torpedo dan planlet. Pada penelitian ini masih sampai pada stadium torpedo.

Eksplan daun memberikan respon terhadap pola pembentukan embrio somatik yang tumbuh pada sisi eksplan bekas pemotongan yang bersinggungan langsung dengan medium. Hal ini diduga bahwa pada eksplan daun sitokinin dan auksin tidak diserap melalui epidermis daun, tetapi hanya diserap oleh jaringan yang bersentuhan langsung dengan medium, tidak ditranslokasikan ke seluruh jaringan daun. Hal yang sama juga terjadi pada kultur kopi Robusta, bahwa ES hanya terbentuk pada sisi daun (Hatanaka *et al.*, 1991). Namun pada percobaan yang dilakukan oleh Priyono (1993), ES dapat terbentuk pada permukaan maupun sisi daun. Gunawan (1992) menyatakan bahwa kemampuan morfogenesis berhubungan dengan tempat sel-sel yang berkompeten. Dengan rangsangan zat pengatur tumbuh yang tepat, sel-sel yang berkompeten tersebut kemudian beregenerasi. Hal ini diharapkan juga terjadi pada perkembangan embriogenesis somatik kopi Arabika.

KESIMPULAN

Pada kopi Arabika klon AS 2K, daun dapat diinduksi pada beberapa kombinasi medium kecuali pada kombinasi medium yang mengandung 5 μ M 2,4-D dan 20 μ M 2-ip. Di lain pihak pada varietas S 795, Sigararutang dan AS 1 daun dapat diinduksi pada semua kombinasi medium.

Hasil terbaik daun yang membentuk kalus pada klon AS 2K, Sigararutang dan

AS 1 dicapai pada kombinasi medium yang mengandung 1 μ M 2,4-D dan 10 μ M 2-ip, kecuali untuk S 795 pada kombinasi 5 μ M 2,4-D dan 10 μ M 2-ip.

Persentase kalus embriogenik somatik tertinggi pada semua varietas kopi Arabika dicapai pada kombinasi media 5 μ M 2,4-D dan 5 μ M 2-ip.

DAFTAR PUSTAKA

- Albarra'n, J.; B. Bertrand; M. Lartaud & 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.
- Bieysse, D.; A. Gofflot & N. Michaux-Ferriere (1993). Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Canadian Journal of Botany*, 71, 1496–1502.
- Chung, Hsiao-Hang; Jen-Tsung Chen & Wei-Chin Chang (2005). Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium* Chiengmai Pink and subsequent plant regeneration. *In Vitro Cell Development Biology Plant*, 41, 765–769.
- Evans, D.A.; W.R. Sharp & C.E. Flick (1981). Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. p. 45–113. *In*: T.A. Thorpe (ed) *Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture*, New York, Academic Press.
- Etienne-Barry, D.; B. Bertrand; A. Schlo'nvoigt & H. Etienne (2002). The morphological variability within a population of coffee somatic embryos produced in a bioreactor affects the regeneration and the development of plants in the nursery. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 68, 153–162.

- Etienne, H.; F. Anthony; S. Dussert; D. Fernandez; P. Lashermes & B. Bertrand (2002). Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). *In Vitro Cell Development Biology Plant.*, 38, 129–138.
- Figueroa-Quiroz, F.R.; C.F.J. Fuentes-Cerda; R. Rojas-Herrera; 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.
- Figueroa-Quiroz, F.R.; M. Méndez-Zeel; A. Larqué-Saavedra & V.M. Loyola Vargas (2001). Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture. *Plant Cell Reports*, 20, 679–684.
- Gamborg, O.L.; R.A. Miller & K. Ojima (1968). Nutrient requirements for suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50, 151–158.
- George, E.F. & P.D. Sherrington (1984). Plant propagation by tissue culture. p. 171–457. **In:** Handbook and Directory of Commercial Laboratories.
- Giridhar P.; V. Kumar; E.P. Indu; G.A. Ravishankar & A. Chandrasekar (2004). Thidiazuron induced somatic embryogenesis in *Coffea arabica* and *C. canephora*. *Acta Botanica Croatica*, 63, 25–33.
- Gunawan, L.W. (1992). *Teknik Kultur Jaringan*. Bogor, Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor.
- Hatanaka, T.; O. Arakawa; T. Yasuda; N. Uchida & T. Yamaguchi (1991). Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. *Plant Cell Reports*, 10, 179–182.
- Riyadi, I. & Tirtoboma (2004). Pengaruh 2,4–D terhadap induksi embrio somatik kopi Arabika. *Buletin Plasma Nutfah*, 10, 82–89.
- Murashige, T. & F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiology Plant.*, 15, 473–497.
- Oktavia, F.; Siswanto; A. Budiani & Sudarsono (2003). Embriogenesis somatik langsung dan regenerasi planlet kopi Arabika (*Coffea arabica*) dari berbagai eksplan. *Menara Perkebunan*, 71, 44–55.
- Papanastasiou, I.; K. Soukouli; G. Moschopoulou; J. Kahia & S. Kintzios (2008). Effect of liquid pulses with 6-benzyladenine on the induction of somatic embryogenesis from coffee (*Coffea arabica* L.) callus cultures. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 92, 215–225.
- Priyono (1993). Embriogenesis somatik langsung pada kultur in vitro eksplan daun kopi Arabika (*Coffea arabica*). *Jurnal Pertanian Indonesia*, 3, 16–20.
- Priyono (2004). In vitro culture of coffee leaves for evaluating the capability of somatic embryogenesis of several coffee species. *Pelita Perkebunan*, 20, 110–122.
- Priyono; B. Florin; M. Rigoreau; J.P. Ducos; U. Sumirat; S. Mawardi; C. Lambot; P. Broun; V. Pe'tiard; T. Wahyudi & D. Crouzillat (2010). Somatic embryogenesis and vegetative cutting capacity are under distinct genetic control in *Coffea canephora* Pierre. *Plant Cell Reports.*, 29, 343–357.
- Ramos, L.C.S.; E.Y. Yokoo & W. Goncalves (1993). Direct somatic embryogenesis in genotype specific in coffee. p. 763–766. **In:** *Quinzieme Colloque Scientifique International Sur le Café*. Vol. II. ASIC Montpellier, 6–11 June 1993.

- Razdan, M.K. (2003). *Introduction to Plant Tissue Culture*. Science Publishers, Inc., Enfield, NH, India.
- Santana-Buzzy; Nancy; R. Rojas-Herrera; M. Rosa; Galaz-Ávalos; R.J. Kuc-
Cauich; J.M. Cortés; L.C. Guti-
érrez-Pacheco; A. Canto; F. Quiroz-
Figueroa & V.M. Loyola-Vargas
(2007). Advances in coffee tissue
culture and its practical applications.
*In Vitro Cell Development Biology
Plant.*, 43, 507–520.
- Sondahl, M.R.; W.R. Romig & A. Bragin
(1994). *Induction and Selection of
Somaclonal Variation in Coffee*.
United States Patent. USA.
- Wattimena, G.A. (1988). *Zat Pengatur
Tumbuh Tanaman*. Bogor, Pusat Antar
Universitas IPB.
- Williams, E.G. & G. Maheswaran (1986).
Somatic embryogenesis; factors in-
fluencing coordinated behavior of
cells as an embryogenic group.
Annales. Botanici, 57, 443–462.
- Yasuda, T.; Y. Fujii & T. Yamaguchi (1985).
Embryogenic callus induction from
Coffea arabica leaf explants by
benzyladenine. *Plant Cell Physio-
logy*, 26, 595–597.
- *****