



## Embriogenesis Somatik Kopi: Prinsip dan Keunggulannya : Review

Qudus Sabha Adhinugraha<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung

Corresponding Author: [qudussabha21@gmail.com](mailto:qudussabha21@gmail.com)

Info Artikel	Abstrak
Kata Kunci: Embriogenesis, <i>Coffea</i> spp, Regenerasi Sel, Somaklon	Perbanyakkan tanaman kopi ( <i>Coffea</i> spp.) secara <i>in vitro</i> dapat menjadi solusi dalam permasalahan pemenuhan kebutuhan bibit kopi dalam skala besar serta dengan klon yang seragam dalam waktu singkat. Perlu diketahui lebih lanjut mengenai embriogenesis somatik pada kopi, serta perbandingan tanaman hasil embriogenesis somatik dengan tanaman hasil perbanyakkan secara konvensional. Perbanyakkan kopi melalui embriogenesis somatik secara <i>in vitro</i> lebih umum digunakan karena mampu menghasilkan bibit kopi dalam skala besar dengan biaya produksi yang lebih rendah. Sedangkan perbanyakkan melalui pola regenerasi organogenesis melalui beberapa kesulitan seperti sulitnya sterilisasi eksplan, adanya dominansi apikal, serta laju multipikasi tunas yang rendah. Adapun tahap dari embriogenesis somatik terdiri atas pemilihan dan sterilisasi eksplan, induksi kalus, perbanyakkan kalus, dan induksi kalus embriogenik. Berbagai sumber menyatakan bahwa pertumbuhan bibit kopi hasil dari embriosomatik lebih baik dibandingkan dengan penggunaan bibit hasil perbanyakkan konvensional (asal biji).
Diterima: 01 Mei 2024 Disetujui : 03 Juni 2024	

### 1. PENDAHULUAN

Kopi (*Coffea* spp.) merupakan salah satu minuman yang paling banyak dikonsumsi secara global. Tanaman ini juga memegang peranan penting dalam perekonomian sebagai sumber pendapatan devisa lebih dari 60 negara, terutama di Amerika Selatan, Afrika, dan Asia. Secara umum, spesies dari genus *Coffea* yang paling banyak dibudidayakan adalah *Coffea arabica* (kopi arabika) dan *Coffea canephora* (kopi robusta). Spesies *C. arabica* merupakan spesies kopi yang paling banyak dibudidayakan. Spesies ini berkontribusi pada hampir 75% produksi kopi di dunia, sedangkan sisanya sebesar 25% adalah *C. canephora* (Gatica *et al.*, 2008).

Perbanyakkan kopi umumnya dilakukan secara vegetatif, yakni dengan metode sambung (grafting) ataupun dengan metode tempel. Perbanyakkan kopi menggunakan metode sambung ataupun tempel dapat menyediakan benih yang bermutu, karena bersifat *true to type* dengan induknya dan secara genetik stabil. Namun, perbanyakkan kopi secara vegetatif dengan metode konvensional tersebut sulit untuk memenuhi kebutuhan bibit kopi yang semakin meningkat. Perbanyakkan tanaman secara *in vitro* dapat menjadi solusi dalam permasalahan pemenuhan kebutuhan bibit kopi. Perbanyakkan tanaman secara *in vitro* dapat menghasilkan bibit kopi dengan skala besar serta seragam dalam waktu yang singkat.

Pola regenerasi dari perbanyakkan secara *in vitro* dapat melalui tiga pola, yaitu perbanyakkan tunas aksilar (axillary branching), organogenesis, dan embriogenesis somatik. Pola axillary branching bekerja dengan menginduksi mata tunas yang sudah ada sehingga tumbuh menghasilkan tunas baru (Yusnita,

2003). Berbeda dengan pola axillary branching, pola organogenesis adalah proses pembentukan propagul yang berasal dari eksplan berupa potongan daun, akar, dan lain-lain. Sedangkan embriogenesis somatik adalah proses pembentukan embrio somatik yang terbentuk dari eksplan yang terdiri atas sel-sel somatik. Perbanyak kopi secara in vitro umumnya menggunakan pola regenerasi embriogenesis somatik (Dwiyani, 2015). Hal ini disebabkan karena potensinya untuk menghasilkan bibit kopi dalam skala besar dengan biaya produksi yang lebih rendah (Kumar et al., 2006). Pola regenerasi organogenesis kurang disukai dalam perbanyak kopi karena memiliki efisiensi yang rendah. Terdapat beberapa kesulitan perbanyak kopi menggunakan pola organogenesis, yakni sterilisasi eksplan yang sulit, konsentrasi fenol yang tinggi, dominansi apikal, dan laju multipikasi tunas yang rendah (Ribeiro & Carneire, 1989).

Perlu diketahui lebih lanjut mengenai embriogenesis somatik pada kopi, mencakup metode embriogenesis somatik, sistem regenerasi pada embriogenesis somatik, dan perbandingan tanaman hasil embriogenesis somatik dengan tanaman hasil perbanyak secara konvensional.

### **Embriogenesis Somatik Kopi: Prinsip dan Keunggulannya**

Embriogenesis somatik adalah proses terbentuknya embrio yang terbentuk dari sel-sel somatik yang berasal dari jaringan eksplan. Seiring dengan berjalannya proses pembentukan embrio, sel-sel dari jaringan eksplan akan mengalami beberapa kali perubahan bentuk, yakni bentuk globular (*globular stage*), bentuk hati (*heart stage*), bentuk torpedo (*torpedo stage*), dan fase kotiledon. Embrio somatik dapat terbentuk secara langsung (*direct somatic embryogenesis*) dan secara tidak langsung (*indirect somatic embryogenesis*). Terbentuknya embrio somatik secara langsung merupakan pembentukan embrioid yang langsung berasal dari jaringan eksplan tanpa adanya proliferasi kalus. Sedangkan pembentukan embrio somatik secara tidak langsung diawali dengan pembentukan kalus dan embrioid yang dihasilkan melalui induksi kalus. Selanjutnya, kalus embriogenik dapat diinduksi dengan menggunakan zat pengatur tumbuh dari kelompok auksin. Kemudian embrio somatik diinduksi dengan penurunan konsentrasi auksin dan atau tanpa penambahan zat pengatur tumbuh dari kelompok sitokinin.

Tahapan dari embriogenesis somatik dimulai dengan pemilihan eksplan, eksplan dapat berupa potongan daun, akar, atau bunga dari tanaman induk. Kemudian eksplan dilakukan sterilisasi untuk mencegah kontaminasi patogen. Tahap selanjutnya adalah penanaman eksplan pada medium induksi kalus, perbanyak kalus, dan induksi kalus embriogenik. Kalus embriogenik dipindahkan ke dalam medium dengan konsentrasi auksin dan atau tanpa penambahan zat pengatur tumbuh dari kelompok sitokinin untuk menginduksi pembentukan embriosomatik. Lalu embriosomatik yang terbentuk dikecambahkan hingga membentuk planlet. Planlet yang sudah berumur cukup, kemudian diaklimatisasi sebelum dipindahkan pada kondisi lapang.

### **Pemilihan dan Sterilisasi Eksplan**

Tahapan pertama dalam embriogenesis somatik adalah pemilihan dan sterilisasi eksplan. Eksplan dapat berupa potongan daun, akar, atau bunga dari tanaman induk. Dalam embriogenesis somatik kopi, eksplan yang umumnya digunakan adalah potongan daun. Potongan daun dibersihkan dengan air mengalir selama 10 menit, kemudian direndam dalam larutan fungisida 0,2% yang mengandung bahan aktif mancozeb 80% selama satu jam atau direndam dalam larutan etanol 70% selama 30 detik, lalu dibilas dengan air suling untuk menghilangkan fungisida dan etanol yang tersisa. Potongan daun disterilkan kembali dengan mencelupkan etanol 70% selama 3 menit diikuti dalam hipoklorit 10% selama 15 menit dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Eksplan yang telah direndam, dibilas tiga kali dalam air suling steril, dipotong menjadi berukuran 1 cm x 1 cm (Ahmed *et al.*, 2013; Ibrahim *et al.*, 2013). Selain potongan daun, potongan akar juga dapat digunakan dalam embriogenesis somatik kopi. Potongan akar diperoleh dari hasil kultur biji kopi yang dikulturkan pada medium MS + 30 g.l<sup>-1</sup> sukrosa + 3 g.l<sup>-1</sup> gelrite. Sebelumnya, benih disterilisasi menggunakan etanol 70% diikuti dalam larutan 0,5% natrium hipoklorit dengan beberapa

tetes *Tween-20* selama 10 menit. Biji kopi yang telah direndam, dibilas tiga kali dalam air suling steril (Wang *et al.* 2018).

### **Induksi dan Proliferasi Kalus**

Tahapan kedua setelah pemilihan dan sterilisasi eksplan adalah induksi kalus. Kalus merupakan kumpulan sel-sel yang tidak terorganisasi dan belum terdiferensiasi. Kalus dapat terinduksi apabila nisbah antara auksin dan sitokinin sama. Beberapa penelitian menunjukkan eksplan yang dikulturkan dalam media MS yang mengandung auksin dan sitokinin dapat menginduksi kalus (Ahmed *et al.*, 2013; Ibrahim *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018). Hasil penelitian Ahmed *et al.* (2013), menunjukkan bahwa eksplan daun kopi arabica yang dikulturkan pada media MS yang mengandung  $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$  2,4-D +  $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$  BAP dapat menghasilkan persentase pembentukan kalus hingga 96%. Sementara itu, hasil penelitian yang dilakukan oleh Ibrahim *et al.* (2013), eksplan daun kopi arabica yang dikulturkan pada media Murashige and Skoog (MS) yang mengandung  $9,04 \mu\text{M}$  2,4-D +  $9,08 \mu\text{M}$  thidiazuron dapat menginduksi pembentukan kalus hingga mencapai 84%. Hasil penelitian lainnya (Wang *et al.* 2018) menunjukkan bahwa eksplan yang dikulturkan pada media MS yang mengandung  $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$  BA +  $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$  NAA menghasilkan laju proliferasi kalus hingga 10,8 setelah dikulturkan selama 3 bulan.

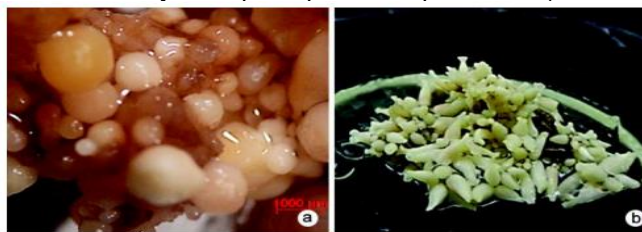
### **Induksi Embrio Somatik**

Embrio somatik dapat terbentuk secara langsung (*direct somatic embryogenesis*) dan secara tidak langsung (*indirect somatic embryogenesis*). Secara umum, pembentukan embrio somatik secara tidak langsung lebih sering terjadi dibandingkan pembentukan embrio somatik secara langsung.

### **Pembentukan embrio somatik secara tidak langsung**

Pembentukan embrio somatik secara tidak langsung diawali dengan menginduksi pembentukan kalus. Setelah kalus terbentuk, kalus disub-kultur ke dalam media regenerasi untuk membentuk kalus embriogenik yang selanjutnya akan menghasilkan embrio somatik. Salah satu faktor keberhasilan pembentukan kalus embriogenik adalah komposisi media regenerasi. Komposisi media regenerasi yang berbeda akan menghasilkan persentase pembentukan kalus embriogenik yang berbeda. Hasil penelitian Ahmed *et al.* (2013) menunjukkan bahwa kalus yang dikulturkan pada media induksi kalus embriogenik (ECIM) yang mengandung  $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$  KIN +  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  IBA dapat menghasilkan kalus embriogenik dengan persentase pembentukan mencapai 39,3% dan bobot segar 598,9 mg. Sementara itu hasil penelitian yang dilakukan oleh Ibrahim *et al.* (2013) menunjukkan bahwa kalus embriogenik berkembang dengan baik pada media regenerasi MS yang mengandung  $9,04 \mu\text{M}$  2,4-D +  $9,08 \mu\text{M}$  thidiazuron.

Setelah dikultur dalam media regenerasi selama dua bulan, warna kalus embriogenik berubah dari kuning menjadi hitam kecoklatan. Kalus yang telah berumur tiga bulan menunjukkan pertumbuhan pra-embrio berwarna coklat kehitaman dan putih. Setelah empat bulan dalam medium regenerasi, pra-embrio berkembang menjadi globular dan menjadi torpedo pada delapan bulan (Ibrahim *et al.*, 2013) (Gambar 1).

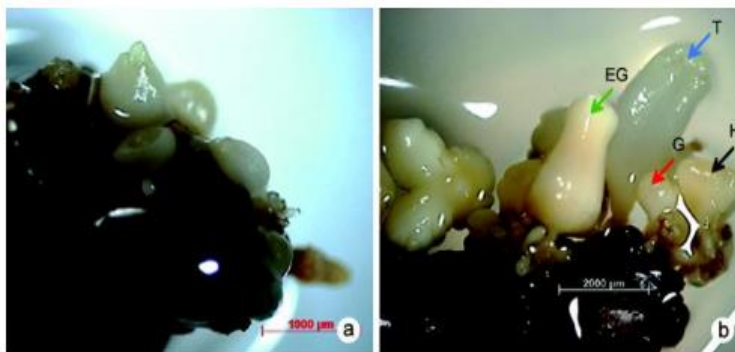


**Gambar 1. Perkembangan kalus melalui pembentukan embriosomatik secara tidak langsung. (a) fase globular, (b) fase torpedo**

Sumber: Ibrahim *et al.* (2013)

### **Pembentukan embrio somatik secara langsung**

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kultur embrio somatik kopi dapat dihasilkan melalui embriogenesis somatik secara langsung. Terbentuknya embrio somatik secara langsung merupakan pembentukan embrioid yang langsung berasal dari jaringan eksplan tanpa adanya proliferasi kalus. Hasil penelitian Ibrahim *et al.* (2013) menunjukkan bahwa *pra*-embrio terbentuk di sepanjang lokasi sayatan daun yang mengindikasikan proses embriogenesis langsung daun (Gambar 2). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Ahmed *et al.* (2013), menunjukkan bahwa kalus primer yang disub-kulturkan pada media MS yang mengandung 4,0 mg.l<sup>-1</sup> BAP dapat meningkatkan persentase pembentukan embrio pada eksplan hingga mencapai 80%, serta menghasilkan jumlah embrio hingga 58,0 ± 22,8 embrio. Hasil ini lebih baik dibandingkan dengan kalus primer yang disubkulturkan pada media MS yang mengandung 1,0; 2,0; dan 3,0 mg.l<sup>-1</sup> BAP. Sehingga, peningkatan konsentrasi BAP memiliki efek positif terhadap laju induksi embrio somatik secara langsung. Sementara itu, hasil penelitian yang dilakukan oleh Ibrahim *et al.* (2013) menunjukkan bahwa eksplan daun kopi arabica yang dikulturkan pada media MS yang mengandung 2,4-D (2,26 µM) + thidiazuron (9,08 µM) dapat menghasilkan embrio fase globular dan torpedo hingga mencapai 5 (fase globular) dan 11 (fase torpedo). Hal ini lebih baik dibandingkan dengan *pra*-embrio yang dikulturkan pada media 2,4-D (2,26 µM) + thidiazuron (4,54 µM) Hasil tersebut menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi sitokinin golongan thidiazuron pada media regenerasi dapat meningkatkan jumlah pembentukan embrio fase globular dan torpedo pada embriogenesis somatik secara langsung.



**Gambar 2.** Penampilan berbagai bentuk kultur embriogenesis somatik kopi arabica melalui embriogenesis langsung; (a) bentuk globular dari kultur sel embriogenik yang terdapat pada jaringan daun, (b) globular (G, panah merah), jantung (H, panah hitam), embrio memanjang (EG, panah hijau) dan torpedo (T, panah biru).

Sumber: Ibrahim *et al.* (2013)

### **Perkecambahan dan Konversi Embrio Menjadi Planlet**

Embrio somatik yang telah terbentuk disubkultur ke media induksi perkecambahan embrio somatik. Media induksi perkecambahan embrio dapat berupa media MS semi-padat yang mengandung 2,0 mg.l<sup>-1</sup> BAP yang dikombinasikan dengan 0,5 mg.l<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>. Selain itu untuk menginduksi perakaran pada planlet, planlet dipindahkan ke media MS yang mengandung 0,5 mg.l<sup>-1</sup> IBA (Ahmed *et al.*, 2013) atau media MS yang mengandung 0,1 mg.l<sup>-1</sup> IBA (Wang *et al.*, 2018). Hasil penelitian Ahmed *et al.* (2013) menunjukkan bahwa embrio berkembang menjadi planlet pada semua media MS semi-padat yang digunakan untuk perkecambahan embrio dan konversi planlet setelah 10 minggu. Media MS yang mengandung 2,0 mg.l<sup>-1</sup> BAP ditambah 0,5 mg.l<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> menghasilkan jumlah embrio berkecambah (14,0 ± 1,7) dan tinggi pucuk (1,4 ± 0,3 cm) tertinggi. Selain itu, empat daun muda per eksplan diperoleh dari embrio yang dikultur pada media MS yang mengandung 4,0 mg.l<sup>-1</sup> BAP. Sementara itu, hasil penelitian yang dilakukan oleh Wang *et al.* (2013) menunjukkan bahwa media MS yang mengandung 0,1 mg.l<sup>-1</sup> IBA, dapat menghasilkan rata-rata 4,0 daun dan 3,3 akar per planlet setelah dikulturkan selama 2 bulan.

### Aklimatisasi Planlet

Tahap akhir dalam embriogenesis somatik kopi adalah aklimatisasi planlet. Planlet yang dihasilkan dari kultur *in vitro* harus dilakukan penyesuaian terlebih dahulu sebelum dipindahkan pada kondisi lapang sesungguhnya. Aklimatisasi dilakukan dengan memindahkan planlet ke media aklimatisasi dengan intensitas cahaya rendah dan kelembapan nisbi tinggi, kemudian secara berangsur-angsur kelembapannya diturunkan dan intensitas cahayanya dinaikkan. Faktor yang berpengaruh dalam tahapan aklimatisasi adalah media tanam serta kondisi lingkungan aklimatisasi. Media tanam yang dapat digunakan dalam proses aklimatisasi planlet adalah campuran tanah steril, sekam kopi, dan pasir dengan perbandingan 4:2:1 (Ahmed *et al.* 2013) atau campuran tanah humus dan vermikulit dengan perbandingan 1:1 (Wang *et al.* 2018). Hasil penelitian Ahmed *et al.* (2013) menunjukkan bahwa persentase tanaman hidup yang ditanam pada media aklimatisasi campuran tanah steril, sekam kopi, dan pasir dapat mencapai 96,9%. Sedangkan tanaman yang ditanam pada media campuran tanah humus dan vermikulit dengan perbandingan 1:1 dapat menghasilkan persentase tanaman hidup hingga 100% (Wang *et al.*, 2018).

Regenerasi melalui embriogenesis somatik memiliki banyak kelebihan dibandingkan dengan metode perbanyakan konvensional, antara lain mampu menyediakan bibit dalam jumlah banyak dan relatif seragam dalam waktu yang singkat, menghasilkan bibit yang bebas penyakit, serta dapat mendukung program perbaikan tanaman. Menendez-Yuffa (2010) melakukan penelitian mengenai perbandingan antara pertumbuhan bibit kopi arabica hasil embrio somatik dengan pertumbuhan bibit hasil perbanyakan secara konvensional (asal biji) selama persemaian. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bibit kopi arabica asal embrio somatik menghasilkan pertumbuhan daun yang lebih baik dibandingkan dengan bibit hasil perbanyakan konvensional terutama ketika bibit sudah mencapai ukuran  $\pm 30$  cm. Namun, pada fase awal pertumbuhan bibit (ukuran tanaman  $\pm 10$  cm) perbedaan pertumbuhan antara bibit kopi hasil embrio somatik dengan bibit hasil perbanyakan konvensional tidak terlalu nyata (Tabel 1). Perbedaan pertumbuhan yang tidak nyata antara bibit kopi arabica hasil embrio somatik dengan bibit hasil perbanyakan konvensional juga terjadi pada pertumbuhan akar bibit (Tabel 2). Berdasarkan hasil penelitian tersebut, bibit kopi hasil embriosomatik menghasilkan pertumbuhan daun yang lebih baik. Pertumbuhan daun berkaitan dengan laju fotosintesis, sehingga bibit kopi arabica hasil embrio somatik berpotensi untuk tumbuh dengan baik.

**Tabel 1. Perbandingan pertumbuhan daun embrio somatik (somaklon) dan biji dari dua kultivar *Coffea arabica* (ukuran tanaman 10 dan 30 cm)**

Kultivar <i>C. arabica</i> / ukuran tanaman/ asal bibit	Jumlah daun	Lebar daun (cm <sup>2</sup> )	Daun kering (g)
Caturra/10 cm/somaklonal	6,5 a	194 a	1,1 a
Caturra/10 cm/seedling	5,0 b	212 a	1,2 a
CR95/10 cm/somaklonal	7,2 a	233 a	1,5 a
CR95/10 cm/seedling	4,2 b	197 a	1,1 b
Caturra/30 cm/somaklonal	16,5 a	1280 a	12,0 a
Caturra/30 cm/seedling	9,7 b	891 b	7,5 b
CR95/30 cm/somaklonal	13,2 a	1067 a	8,5 a
CR95/30 cm/seedling	9,4 b	732 b	7,0 b

Keterangan: Nilai yang diikuti oleh huruf sama sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5% uji LSD. Sumber: Menendez-Yuffa *et al.* (2010)

**Tabel 2. Perbandingan pertumbuhan daun embrio somatik (somaklon) dan biji dari dua kultivar *Coffea arabica* (ukuran tanaman 10 dan 30 cm)**

Kultivar <i>C. arabica</i> /ukuran tanaman/ asal bibit	Jumlah akar	Panjang akar (cm)	Bobot kering akar (g)
Caturra/10 cm/somaklonal	562 a	768 b	0,27 a
Caturra/10 cm/seedling	696 a	1000 a	0,28 a
CR95/10 cm/somaklonal	953 a	1135 a	0,35 a
CR95/10 cm/seedling	777 a	885 b	0,28 b
Caturra/30 cm/somaklonal	4390 a	5135 a	2,70 a
Caturra/30 cm/seedling	3833 a	5282 a	1,88 b
CR95/30 cm/somaklonal	3462 a	4801 a	1,91 a
CR95/30 cm/seedling	4095 a	4492 a	1,82 a

Keterangan: Nilai yang diikuti oleh huruf sama sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5% uji LSD. Sumber: Menendez-Yuffa *et al.* (2010)

## 2. KESIMPULAN

1. Tahapan dari embriogenesis somatik terdiri atas pemilihan dan sterilisasi eksplan, induksi kalus, perbanyakan kalus, dan induksi kalus embriogenik. Embriosomatik yang dihasilkan kemudian dikecambahkan hingga menghasilkan planlet. Planlet diaklimatisasi sebelum dipindahkan dalam kondisi lapang sesungguhnya.
2. Embrio somatik dapat terbentuk secara langsung (*direct somatic embryogenesis*) dan secara tidak langsung (*indirect somatic embryogenesis*).
3. Pertumbuhan bibit kopi hasil dari embriosomatik lebih baik dibandingkan dengan bibit hasil perbanyakan konvensional (asal biji) pada parameter jumlah daun, lebar daun, dan bobot kering daun.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, W., Feyissa, T., & Disasa T. (2013). Somatic Embryogenesis of a Coffe (*Coffea arabica* L.) Hybrid using Leaf Explants. *The Journal of Holticultural Science and Biotechnology*, 88(4): 469-475.
- Dwiyani, R. (2015). *Bahan Ajar Teknik Kultur Jaringan (Sistem Regenerasi Tanaman)*. Universitas Udayana. Denpasar.
- Gatica, A.M., Arrieta, G., & Espinoza, A.M. (2008). Direct Somatic Embryogenesis in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuai: Effect of Triacontanol, Light Condition, and Medium Consistency. *Agronomía Costarricens*, 32(1): 139-147.
- Ibrahim, M.S.D., Hartati, S., Rubiyo., Purwito, A., & Sudarsono. (2013). Direct and Indirect Somatic Embryogenesis on Arabica Coffee (*Coffea arabica*). *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 14(2): 79-86.
- Kumar, V., Madhava, N., & Ravishankar, G.A. (2006). Developments in Coffee Biotechnology in vitro Plant Propagation and Crop Improvement. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 87: 49-65.
- Menendez-Yuffa, A., Barry-Etienne, D., Bertrand, B., Georget, F., Etienne, H. (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. Org. Cult.* 102: 297–307.

- Ribeiro, T.O., & Carneiro, M.F. (1989). Micropropagation by Nodal Culture of Cultivars Caturra, Geisha and Catimor Regenerated in vitro. ASIC Publishers (Eds.) 13th *International Scientific Colloquium on Coffee*. Paipa, Colombia, 21-25 August 1989, pp. 757-765.
- Wang, Y.C., Lin, M.Z., Huang, B., & Chung, H.H. (2018). Thidiazuron Enhanced Somatic Embryogenesis from Callus Lines of Arabica Coffee and Subsequent Plant Regeneration. *Acta Biologica Cracoviensia*, 60(2): 35-44.
- Yusnita. (2003). *Kultur Jaringan Cara Memperbanyak Tanaman secara Efisien*. Agromedia Pustaka. Tangerang.