



AGROPROSS
National Conference
Proceedings of Agriculture

Prosiding
Seminar dan Bimbingan Teknis Pertanian Politeknik Negeri Jember 2024
Peningkatan Ketahanan Pangan Melalui Adaptasi Perubahan Iklim
Untuk Pertanian Berkelanjutan
13 – 14 Juni 2024

Publisher:
Agropross, National Conference Proceedings of Agriculture
E-ISSN: 2964-0172

Pembentukan Kalus pada Eksplan Daun Kopi Robusta dan Arabika pada Beberapa Konsentrasi Media MS (Murashige and Skoog)

Callus Formation on Robusta and Arabica Coffee Leaf Explants at Various Concentrations of MS (Murashige and Skoog) Medium

Author(s): Sepdian Luri Asmono^{1*}, Rahmawati¹, Hazaratul Husna¹, Anis Sulala¹, Shefy Auliya¹, Eko Hadi Cahyono¹

⁽¹⁾ *Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember*

*Corresponding author: sepdian@polije.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menguji beberapa konsentrasi media Murashige and Skoog (MS) (MS Full, ¼ MS, dan ½ MS) terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus dari daun muda kopi Robusta dan Arabika. Penelitian yang dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, Politeknik Negeri Jember selama 2 bulan, dirancang menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial. Faktor pertama adalah jenis kopi (Robusta dan Arabika) dan faktor kedua adalah konsentrasi media MS (MS Full, ¼ dan ½ Konsentrasi). Setiap perlakuan ditambahkan 1 ppm 2,4-D dan 1 ppm Kinetin. Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa perbedaan konsentrasi media MS berpengaruh sangat nyata pada parameter persentase eksplan membentuk kalus dan berat segar kalus, namun berbeda tidak nyata pada hari kemunculan kalus, karena rata-rata kemunculan kalus pada 10 s/d14 HST. Sedangkan jenis kopi Arabika dan Robusta tidak memberikan perbedaan yang nyata pada semua parameter. Media ½ MS memiliki persentase pembentukan kalus paling besar yaitu sebesar 91,7%, dengan berat rata-rata 1.082 gr. Selain itu, kalus yang terbentuk pada media ½ MS bertekstur remah dan bernodul serta berwarna putih kekuningan dan putih kecoklatan. Maka, dalam penelitian ini konsentrasi media yang berpotensi sebagai media dasar dalam pembentukan kalus kopi robusta dan arabika yaitu media ½ MS.

Kata Kunci:
Kalus,
Kopi,
Media ½ MS

Keywords: ABSTRACT

Callus,

Coffee,

half strength MS Medium

The study aims to test some of the media concentrations of Murashige and Skoog (MS) medium (MS Full, ¼ MS, and ½ MS) against the formation and calus growth of young Robusta and Arabica coffee leaves. The research was conducted at the Plant Tissue Culture Laboratory, Politeknik Negeri Jember for 2 months. The study was designed using the Completely Randomized Design (CRD) Factorial method. The first factor is the type of coffee (Robusta and Arabica) and the second factor is MS media concentration (MS Full, ¼ MS and ½ MS). Each treatment added 1 ppm of 2.4-D and 1 ppm of Kinetin. Based on the results of this study, it can be concluded that the difference in media concentration of MS has a very significant effect on the percentage parameters of explant forming the callus and the weight of the fresh callus, but there is no significant result on the day of the appearance of the callus because the average occurrence of callus at 10 -14 DAP. Whereas Arabica and Robusta coffee types do not give a significant difference in all parameters. The medium ½ MS has the largest percentage of callus formation at 91.7%, with an average weight of 1.082 grams. In addition, the callus formed on the medium ½ MS is fragile and nodular textured and yellowish white and brownish white. In this study, the concentration of potential media as the basic medium in the formation of robusta and arabica coffee callus is ½ MS medium.



PENDAHULUAN

Kopi merupakan komoditas tanaman perkebunan Indonesia. Saat ini Indonesia masuk dalam 5 besar negara produsen kopi dunia. Tanaman kopi Robusta dan Arabika merupakan jenis komoditi kopi utama yang dibudidayakan di Indonesia. Berdasarkan data Badan Pusat Statistik Indonesia (2024) sampai akhir 2023 perkebunan kopi Indonesia luasnya 1.268 ribu hektar (ha), luasan tersebut mengalami peningkatan dari tahun 2022 dengan luasan 1.266 ribu ha. Berdasarkan data tersebut, diproyeksikan luasan lahan kopi akan terus meningkat setiap tahunnya. Oleh sebab itu kebutuhan bibit unggul kopi sangat dibutuhkan untuk keberlanjutan budidaya dan peningkatan produksi kopi di Indonesia.

Ketersediaan akan bibit unggul kopi merupakan salah satu kendala utama dalam budidaya kopi yang baik. Saat ini masih banyak petani menggunakan bibit asalan yang tumbuh di sekitar kebun. Namun salah satu alternatif untuk mengatasi ketersediaan bibit unggul kopi secara masal salah satunya dengan teknik kultur jaringan tanaman kopi melalui embrio somatik (Ducos et al., 2007). Dalam prakteknya, ada beberapa tantangan dalam setiap tahapan produksi embrio somatik kopi. Beberapa diantaranya adalah kendala mendapatkan eksplan steril melalui optimalisasi teknik sterilisasi (Asmono et al., 2022), dan kendala dalam tahapan induksi kalus dari eksplan daun pasca proses sterilisasi. Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam tahapan tersebut adalah formulasi media dasar yang digunakan.

Beberapa peneliti sebelumnya telah menggunakan beberapa jenis dan konsentrasi media dasar untuk mikropropagasi kopi. Percobaan yang telah dilakukan Abd El Gawad, Mahdy and Boshra (2012) adalah mengujikan beberapa konsentrasi media MS (Murashige and Skoog) dari konsentrasi penuh, $\frac{3}{4}$ konsentrasi dan $\frac{1}{2}$ konsentrasi

untuk induksi tunas dari pucuk kopi arabika. Workia Ahmed and Disasa (2013) menggunakan beberapa konsentrasi media MS untuk perkembangan planlet kopi. Selain itu, Dewi Ibrahim *et al.* (2012), menggunakan media $\frac{1}{2}$ MS dengan modifikasi vitamin dari media B5 dan ditambah dengan ZPT 2,4-D dan Kinetin untuk memacu pembentukan kalus Kopi Arabika. Berdasarkan penelitian terdahulu, maka penelitian ini bertujuan untuk mengujikan beberapa konsentrasi media MS (MS Full, $\frac{1}{4}$, dan $\frac{1}{2}$ Konsentrasi) terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus dari daun kopi Robusta dan Arabika.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, Politeknik Negeri Jember selama 2 bulan. Alat dan bahan utama yang digunakan antara lain autoklaf, Laminar Air Flow Cabinet (LAFC), timbangan digital, dissecting set, daun kopi muda kopi Robusta dan Arabika, alkohol, desinfektan, aquadest, ZPT 2,4-D dan Kinetin.

Metode penelitian yang digunakan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial. Faktor pertama adalah jenis kopi (Robusta dan Arabika) dan faktor kedua adalah konsentrasi media MS (MS Full, $\frac{1}{4}$ dan $\frac{1}{2}$ Konsentrasi). Setiap perlakuan ditambahkan 1 ppm 2,4-D dan 1 ppm Kinetin. Sehingga dalam penelitian ini terdapat 6 perlakuan dan diulang sebanyak 6 ulangan. Kombinasi perlakuannya adalah sebagai berikut:

- Perlakuan 1: RP1 (Robusta + MS Full)
- Perlakuan 2: RP2 (Robusta + $\frac{1}{2}$ MS)
- Perlakuan 3: RP3 (Robusta + $\frac{1}{4}$ MS)
- Perlakuan 4: AP1 (Arabika + MS Full)
- Perlakuan 5: AP2 (Arabika + $\frac{1}{2}$ MS)
- Perlakuan 6: AP3 (Arabika + $\frac{1}{4}$ MS)

Secara teknis, daun muda Kopi Robusta dan Arabika dilakukan sterilisasi untuk mendapatkan eksplan steril kemudian di dalam LAFC, eksplan daun dipotong ukuran 1-1,5 cm² dan dikulturkan secara aseptis pada media perlakuan (Asmono et al., 2022). Setiap botol kultur berisi 1 potong eksplan dan diinkubasi pada kondisi gelap pada suhu ruang 20-25°C.

Parameter yang diamati antara lain: Persentase tumbuh kalus, yang diamati setiap hari dengan mencatat kalus yang tumbuh dari eksplan daun kopi yang ditanamkan hingga umur 60 HST; Saat muncul kalus diamati setiap hari hingga umur 60 HST. Ciri-ciri kemunculan kalus adalah adanya gumpalan sel berwarna putih atau bening pada area potongan eksplan. Berat segar kalus diambil datanya di umur 60 HST atau pada akhir penelitian.

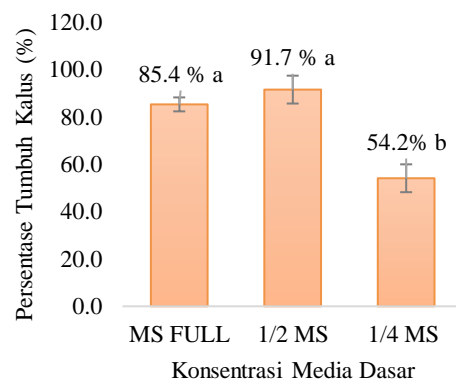
Selain itu ada parameter terhadap warna kalus dengan metode warna skoring 1. Putih, 2: Putih kekuningan; 3: Putih kecoklatan; 4: Coklat. Parameter jenis kalus menggunakan skoring 1: Kompak; 2: Kompak bernodul; 3: Remah. Pengambilan data skoring dilakukan di umur 60 HST. Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan ANOVA dan dilakukan uji lanjut Duncan pada taraf 5% jika terdapat perbedaan nyata atau sangat nyata pada hasil analisis. Pengolahan data menggunakan aplikasi SPSS 2.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase Tumbuh Kalus

Hasil analisis ANOVA menunjukkan bahwa perbedaan signifikan hanya ditunjukkan oleh faktor konsentrasi media MS (Murashige and Skoog), sedangkan untuk faktor jenis kopi, maupun kombinasi antar keduanya tidak menunjukkan hasil yang signifikan. Hasil uji lanjut Duncan pada taraf 5% beberapa konsentrasi media

MS terhadap persentase pembentukan kalus tertera pada grafik 1 berikut.



Gambar 1. Persentase pembentukan kalus pada beberapa konsentrasi media MS

Hasil analisis menunjukkan bahwa konsentrasi media memberikan pengaruh terhadap pembentukan kalus pada eksplan daun yang dikulturkan. Media dasar MS Full (85,4%) dan ½ MS (91,7%) menunjukkan hasil yang berbeda tidak nyata pada kalus yang terbentuk. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian (Groll et al., 2002) bahwa penggunaan MS full dan ½ MS tidak menunjukkan perbedaan dalam perkembangan embrio somatik Cassava.

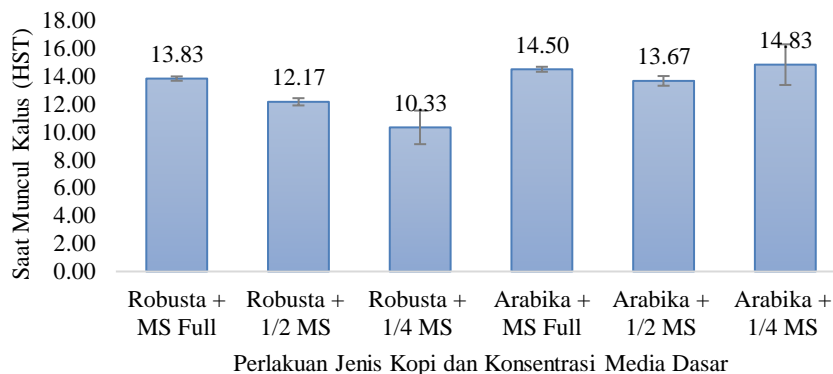
Salah satu komponen utama dalam induksi kalus adalah penggunaan ZPT dan penggunaan level konsentrasi dari media dasar yang digunakan. Penggunaan media media ½ MS juga telah dibuktikan oleh peneliti sebelumnya yang juga menggunakan konsentrasi media ½ MS untuk induksi kalus (Avila-Victor et al., 2023; dewi Ibrahim et al., 2012; Hapsoro et al., 2020). Penggunaan ½ MS selain lebih efektif penggunaan jumlah mineral yang diperlukan, ternyata dapat berdampak positif terhadap pembentukan kalus melalui penurunan tingkat stress pada eksplan khususnya pada penurunan tingkat browning. Kondisi browning menyebabkan pembentukan kalus terhambat. Hal tersebut sesuai pernyataan Han, Gleave and Wang (2010) bahwa

browning pada kalus secara signifikan berkurang menggunakan media 1/2 MS dan hasilnya kalus mampu beregenerasi secara optimal.

Saat Muncul Kalus

Kemunculan kalus menunjukkan kecepatan respon sel eksplan pada

formulasi media dasar yang digunakan. Dalam penelitian ini seluruh faktor yang diujikan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan rata-rata kemunculan kalus pada 10 s/d 14 HST, seperti tertera pada Gambar 2.



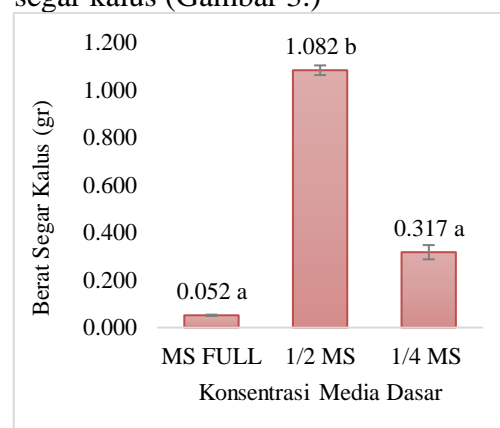
Gambar 2. Saat kemunculan kalus pada perlakuan jenis kopi dan konsentrasi media dasar

Kemunculan kalus terlihat pada rata-rata hari ke 10 setelah kultur pada eksplan kopi Robusta yang dikulturkan pada media 1/4 MS dan pada kopi Arabika kemunculan kalus rata-rata pada hari ke 14. Beberapa konsentrasi media MS juga memberikan respon yang berbeda tidak nyata pada kecepatan pembentukan kalus.

Dalam penelitian ini diduga konsentrasi media MS yang diujikan tidak berperan penting dalam dediferensiasi sel daun menjadi kalus. Diduga, faktor utama pembentukan kalus pada eksplan adalah jenis dan konsentrasi ZPT yang digunakan. Hal tersebut juga sesuai dengan penelitian Verma *et al.* (2016) yang menyatakan bahwa media dasar saja tanpa ZPT tidak menunjukkan adanya pembentukan kalus, namun eksplan tetap viabel selama 2 bulan. Diketahui bahwa kesemua media perlakuan menggunakan ZPT yang sama yaitu 1ppm 2,4 D dan 1ppm Kinetin, seperti dalam penelitian dewi Ibrahim *et al.* (2012) bahwa 2,4 D dan Kinetin mampu memacu pembentukan kalus pada kopi Arabika.

Berat Segar Kalus

Hasil analisis data menggunakan ANOVA menunjukkan bahwa perlakuan jenis kopi dan kombinasi antara konsentrasi media MS tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Namun, beberapa konsentrasi media MS memberikan pengaruh yang sangat signifikan pada berat segar kalus (Gambar 3.)



Gambar 3. Berat segar kalus pada beberapa konsentrasi media MS pada umur 60 HST

Berdasarkan data tersebut, pertumbuhan kalus paling pesat pada

eksplan yang dikulturkan pada formulasi ½ MS yaitu 1,082 gr. Sedangkan pada media ¼ MS rata-rata berat kalus 0,317 gr dan tidak berbeda nyata dengan berat kalus dari formulasi Full MS yaitu rata-rata 0.052 gr. Pengurangan konsentrasi ½ MS lebih optimal memacu pertumbuhan kalus daripada media MS Full dan ¼ MS. Media ½ MS sebagai media dasar telah digunakan pada beberapa penelitian untuk memacu pembentukan kalus kopi (Avila-Victor et al., 2023; dewi Ibrahim et al., 2012; Ibrahim et al., 2013). Selain itu, berdasarkan penelitian van Boxtel and Berthouly, (1996) juga telah membuktikan

bahwa pengurangan konsentrasi unsur hara makro dan mikro pada media dasar MS antara 50%-70% tidak menyebabkan penurunan jumlah suspensi sel embrionik kopi.

Jenis dan Warna Kalus

Hasil pengamatan terhadap jenis dan warna kalus dianalisis secara kuantitatif deskriptif, menggunakan metode skoring dan pengamatan secara visual terhadap bentuk dan warna kalus yang tumbuh pada umur kalus 60 HST. Data hasil pengamatan tertera pada Tabel 1. berikut.

Tabel 1. Jenis dan warna kalus kopi pada umur 60 HST

No	Perlakuan	Rerata Skor	Jenis Kalus	Rerata Skor	Warna Kalus
1	Robusta + MS Full	1.00	Kompak	4.00	Coklat
2	Robusta + 1/2 MS	2.67	Remah	1.75	Putih Kekuningan
3	Robusta + 1/4 MS	1.25	Kompak	3.75	Coklat Kehitaman
4	Arabika + MS Full	1.00	Kompak	3.00	Putih Kecoklatan
5	Arabika + 1/2 MS	2.63	Remah	2.33	Putih Kekuningan
6	Arabika + 1/4 MS	1.50	Kompak bernodul	4.00	Coklat kehitaman

Pengamatan terhadap jenis kalus bertujuan untuk melihat potensi perkembangan sel kalus dalam membentuk embrio somatik. Kalus yang tampak remah dan kompak bernodul berpotensi untuk berkembang menjadi embrio somatik. Kalus bertekstur kompak dan bukan kalus embrionik kurang optimal dalam memacu pembentukan embrio dan tunas. Menurut Buiteveld et al., (1994), kalus bertekstur kompak memiliki sel yang sudah banyak berkembang membentuk jaringan vaskular dan zona meristematik seperti pada area batang tanaman. Sedangkan kalus yang friable merupakan agregat sel embrionik yang terpisah oleh rongga antar sel (*intercellular spaces*).

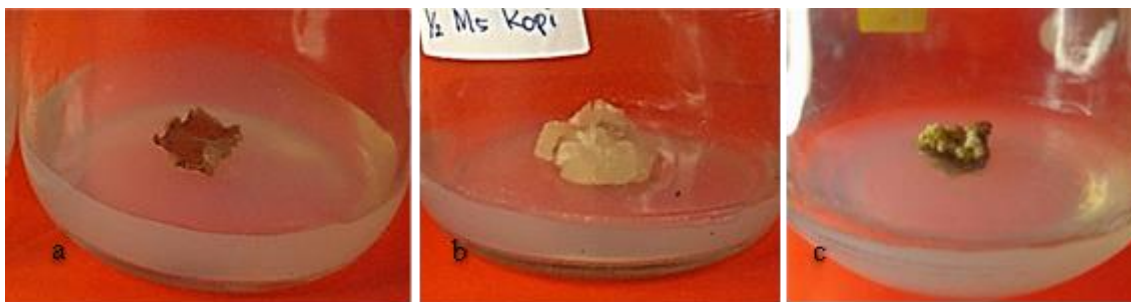
Pembentukan kalus yang remah pada media ½ MS (Gambar 4b), salah satunya akibat adanya pengurangan kadar nitrogen dalam media pada kondisi optimal untuk pertumbuhan sel. Menurut Utsumi et al.,

(2017), dengan pengurangan konsentrasi Nitrogen mampu meningkatkan pembentukan kalus friabel pada induksi kalus Cassava. Pada konsentrasi nitrogen tinggi sel kalus akan cepat berkembang membentuk struktur yang kompak. Selain itu menurut Elkonin and Pakhomova (2000), pembentukan tekstur kalus baik friabel maupun kompak sangat dipengaruhi oleh jenis media dasar dan konsentrasi nitrogen dan forsor dalam komposisi media tersebut. Selain itu, Rizwan et al. (2020), juga menyatakan bahwa pengurangan konsentrasi media MS cocok untuk pembentukan kalus friabel dan menghambat pembentukan kalus kompak.

Warna kalus pada umur 60 HST juga dilakukan untuk menentukan potensi pertumbuhan dan perkembangan sel kalus. Kalus yang berwarna putih kekuningan dan putih kecoklatan pada media ½ MS diduga

masih dalam kondisi viabel untuk dikembangkan menjadi embrio somatik. Dalam penelitian ini semua kalus yang muncul pertama kali dari semua konsentrasi media berwarna putih, namun pada pada media Full MS dan $\frac{1}{4}$ MS kalus menjadi coklat pada umur 60 HST dan kemungkinan tidak mengalami perkembangan karena sudah mengalami browning dan sulit untuk dikembangkan menjadi embrio somatik. Menurut He *et al.* (2009) kalus coklat mengarah pada penurunan kemampuan regeneratif dan menghambat pertumbuhan bahkan dapat menyebabkan kematian.

Pada beberapa konsentrasi media yang diujikan, kalus yang friabel pada media $\frac{1}{2}$ MS menunjukkan kombinasi warna putih dan kekuningan, sedangkan pada tekstur kompak di media Full MS dan $\frac{1}{4}$ MS warna kalus mengarah pada kecoklatan dan beberapa bagian mulai menghitam. Beberapa penyebab teknis adanya pencoklatan dapat diakibatkan oleh proses sterilisasi eksplan, pada beberapa kondisi daun eksplan ada yang mengalami memar akibat proses pemotongan, maupun akibat kontak teknis dengan bahan-bahan desinfektan. Pada bagian memar tersebut eksplan berubah menjadi coklat setelah diinkubasi.



Gambar 4. Struktur kalus a) kompak pada media MS Full; b) Remah pada media $\frac{1}{2}$ MS; c) Kompak bernodul pada media $\frac{1}{4}$ MS

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa perbedaan konsentrasi media MS berpengaruh sangat nyata pada parameter persentase eksplan membentuk kalus dan berat segar kalus, namun berbeda tidak nyata pada hari kemunculan kalus karena rata-rata kemunculan kalus pada 10 s/d14 HST. Sedangkan jenis kopi Arabika dan Robusta tidak memberikan perbedaan yang nyata pada semua parameter. Media $\frac{1}{2}$ MS memiliki persentase pembentukan kalus paling besar yaitu sebesar 91,7%, dengan berat rata-rata 1,082 gr. Selain itu, kalus yang terbentuk pada media $\frac{1}{2}$ MS bertekstur remah dan bernodul serta berwarna putih kekuningan dan putih kecoklatan. Maka, dalam penelitian ini konsentrasi media yang berpotensi sebagai

media dasar dalam pembentukan kalus kopi robusta dan arabika yaitu media $\frac{1}{2}$ MS.

DAFTAR PUSTAKA

- Abd El Gawad, N., Mahdy, H. A., & Boshra, E. S. (2012). In vitro micropropagation protocol and acclimatization of coffee trees (*Coffea arabica* L.). *Journal of Plant Production*, 3(1), 109–116.
- Asmono, S. L., Wardana, R., & Rahmawati. (2022). Optimization of the sterilization method for leaf explant Robusta BP 308 coffee in vitro. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 980(1), 012001.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/980/1/012001>

- Avila-Victor, C. M., Ordaz-Chaparro, V. M., Arjona-Suárez, E. de J., Iracheta-Donjuan, L., Gómez-Merino, F. C., & Robledo-Paz, A. (2023). In Vitro Mass Propagation of Coffee Plants (*Coffea arabica* L. var. Colombia) through Indirect Somatic Embryogenesis. *Plants (Basel, Switzerland)*, *12*(6). <https://doi.org/10.3390/plants12061237>
- Badan Pusat Statistik Indonesia. (2024). *Statistical Yearbook of Indonesia 2024*.
- Buiteveld, J., Fransz, P. F., & Creemers-Molenaar, J. (1994). Induction and characterization of embryonic callus types for the initiation of suspension cultures of leek (*Allium ampeloprasum* L.). *Plant Science*, *100*(2), 195–202.
- Dewi Ibrahim, M. S., Sudarsono, S., Rubiyo, R., & Syafaruddin, S. (2012). Pengaruh Komposisi Media terhadap Pembentukan Kalus Embriogenesis Somatik Kopi Arabika (*Coffea arabica*). *Journal of Industrial and Beverage Crops*, *3*(1), 13–22.
- Ducos, J.-P., Lambot, C., & Pétiard, V. (2007). Bioreactors for coffee mass propagation by somatic embryogenesis. *International Journal of Plant Developmental Biology*, *1*(1), 1–12.
- Elkonin, L. A., & Pakhomova, N. V. (2000). Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *61*, 115–123.
- Groll, J., Mycock, D. J., & Gray, V. M. (2002). Effect of medium salt concentration on differentiation and maturation of somatic embryos of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Annals of Botany*, *89*(5), 645–648.
- Han, M., Gleave, A. P., & Wang, T. (2010). Efficient transformation of *Actinidia arguta* by reducing the strength of basal salts in the medium to alleviate callus browning. *Plant Biotechnology Reports*, *4*, 129–138.
- Hapsoro, D. W. I., Hamiranti, R., & Yusnita, Y. (2020). In vitro somatic embryogenesis of superior clones of robusta coffee from Lampung, Indonesia: Effect of genotypes and callus induction media. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, *21*(8), 3811.
- He, Y., Guo, X., Lu, R., Niu, B., Pasapula, V., Hou, P., Cai, F., Xu, Y., & Chen, F. (2009). Changes in morphology and biochemical indices in browning callus derived from *Jatropha curcas* hypocotyls. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *98*(1), 11–17. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9533-y>
- Ibrahim, M. S. D., Hartati, R. S., Rubiyo, R., Purwito, A., & Sudarsono, S. (2013). Induksi kalus embriogenik dan daya regenerasi kopi arabika menggunakan 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid dan 6-Benzyladenine. *Jurnal Tanaman Industri Dan Penyegar*, *4*(2), 91–98.
- Rizwan, H. M., Irshad, M., He, B., Liu, S., Lu, X., Sun, Y., & Qiu, D. (2020). Role of reduced nitrogen for induction of embryogenic callus induction and regeneration of plantlets in *Abelmoschus esculentus* L. *South African Journal of Botany*, *130*, 300–307. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.01.016>
- Utsumi, Y., Utsumi, C., Tanaka, M., Ha, V. T., Matsui, A., Takahashi, S., & Seki, M. (2017). Formation of friable embryogenic callus in cassava is enhanced under conditions of reduced nitrate, potassium and

- phosphate. *PLoS One*, 12(8), e0180736.
- van Boxtel, J., & Berthouly, M. (1996). High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44(1), 7–17. <https://doi.org/10.1007/BF00045907>
- Verma, S. K., Das, A. K., Cingoz, G. S., Uslu, E., & Gurel, E. (2016). Influence of nutrient media on callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration in selected Turkish crocus species. *Biotechnology Reports*, 10, 66–74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.03.006>
- Workia Ahmed, T. F., & Disasa, T. (2013). Somatic embryogenesis of a coffee (*Coffea arabica* L.) hybrid using leaf explants. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 88(4), 469–475. <https://doi.org/10.1080/14620316.2013.11512993>