

PENGARUH APLIKASI ABA DAN OSMOCONDITIONING DALAM PENGERINGAN BENIH KOPI ARABIKA

Effect of ABA and Osmoconditioning Application on Arabica Coffee Seed Desiccation

Trisda Kurniawan¹, Aziz Purwantoro² dan Setyastuti Purwanti²

*Program Studi Agronomi
Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada*

ABSTRACT

The objective of this research was to study the role of ABA and osmoconditioning in three moisture content levels, and interaction between them on Arabica coffee seed viability. Research was done for three months from May to July 2004. Research was conducted by using Factorial Completely Randomized Design with three treatments *i. e.* 2 levels of ABA concentration: 0 and 10 ppm, 3 levels of desiccation/seed water content: 14, 12 and 10%, and 4 levels of osmoconditioning duration: control, 3, 5 and 7 day, with 3 replicates. Data was analyzed by analysis of variance. The effect that was significant at the level of 5%, continued with DMRT 5%. The results showed that ABA had important roles in increasing of Arabica coffee seed tolerance to desiccation by increasing proline and α -tocopherol content, and maintaining starch content, that prevent the accumulation of free fatty acids, that in the end maintained seed emergence ability stayed high. Osmoconditioning did not show important role in seed viability repairmen if ABA had been applied before desiccation. Without ABA application, osmoconditioning had important role by increasing α -tocopherol content that made seed emergence ability better. Base on seed emergence ability, osmoconditioning could substitute the role of ABA if seed water content only decreased to 12%.

Keywords: *ABA – osmoconditioning – desiccation – coffea arabica*

PENGANTAR

Kopi memiliki nilai ekonomi yang tinggi bagi banyak negara di dunia, sehingga konservasi terhadap plasma nutfahnya memiliki arti penting. Metode terkini yang tersedia untuk memastikan penyimpanan jangka panjang yang aman dan efektif bagi plasma nutfah dari tanaman yang memiliki benih non ortodok adalah *cryopreservation* (pembekuan dalam nitrogen cair -196°C). Karena air adalah komponen utama dari sel-sel hidup dan harus tersedia untuk proses-proses kimia yang

1) Dusun Timur Jalan Meulu Nomor D. 29 Darussalam Banda Aceh, NAD

2) Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

mendukung kehidupan, maka metabolisme sama sekali terhenti ketika semua air yang terdapat di dalam sel berubah menjadi es (Simione, 1998).

Berdasarkan daya simpannya, yaitu ditinjau dari kadar air terendah untuk penyimpanan, benih kopi arabika termasuk golongan intermediet yang hanya dapat diturunkan kadar airnya antara 13-15%¹ (Lima *et al.*, 2001). Kadar air ini belum cukup rendah untuk *cryopreservation* (Dussert *et al.*, 2000), karena terbentuknya kristal es yang dapat merusak sel-sel benih saat dibekukan. Upaya untuk mempertahankan dan meningkatkan viabilitas benih kopi arabika selama dan setelah dibekukan atau diturunkan lagi kadar airnya, perlu dilakukan.

Upaya tersebut dapat dilakukan dengan aplikasi ABA dan *osmoconditioning*. Mekanisme aksi ABA adalah menginduksi berbagai senyawa yang dapat melindungi benih dari kerusakan akibat pengeringan melalui osmoregulasi/osmoprotektan (di antaranya prolin dan pati), antioksidasi (di antaranya α -tokoferol) dan *water replacement hypothesis* (di antaranya pati), sedangkan *osmoconditioning* dibutuhkan untuk mengaktifkan dan mengefektifkan proses-proses pemulihan diri sebelum benih berkecambah. Upaya-upaya ini dapat berperan sendiri-sendiri maupun bersama-sama berinteraksi dalam mempertahankan dan meningkatkan viabilitas benih kopi arabika selama dan setelah pengeringan.

CARA PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai Juli 2004 di Universitas Gadjah Mada. Pengolahan benih, perlakuan yang diteliti, dan pengamatan terhadap vigor daya tumbuh benih dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Benih dan Rumah Kaca Fakultas Pertanian, sedangkan pengamatan terhadap vigor biokimia dilaksanakan di Laboratorium Kimia dan Biokimia Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian.

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial dengan tiga faktor, yaitu: 2 aras konsentrasi ABA (H): 0 ppm (H_0) dan 10 ppm (H_{10}), 3 aras pengeringan/kadar air benih (P): 14% (P_{14}), 12% (P_{12}) dan 10% (P_{10}) dan 4 aras durasi *osmoconditioning* (O): kontrol (O_0), 3 hari (O_3), 5 hari (O_5) dan 7 hari (O_7), dengan 3 ulangan. Data dianalisis dengan analisis ragam yang dilanjutkan dengan DMRT 5%.

Persiapan benih dan media perkecambahan. Benih kopi arabika Kartika-1 yang digunakan berasal dari PT. Pagilaran, yang telah masak fisiologis. Benih diekstraksi dengan fermentasi alami, dibersihkan dan disortasi berdasarkan kesempurnaan bentuk fisik, keseragaman ukuran dan jumlah embrio.

Media perkecambahan yang digunakan adalah polibag plastik berdiameter 25 cm berisi tanah regosol yang telah disaring. Media perkecambahan ditempatkan dalam rumah kaca yang sedikit terlindungi dengan suhu rata-rata harian 33°C.

Aplikasi asam absisi. Aplikasi asam absisi dilakukan dengan perendaman dalam wadah berisi larutan asam absisi dengan konsentrasi 0 dan 10 ppm, dengan perbandingan benih dan larutan 1 : 1 (vol / vol). Larutan asam absisi 10 ppm dibuat dengan melarutkan 10 mg asam absisi dalam 0,6 ml etanol 70%, kemudian ditambahkan akuades sedikit demi sedikit sampai mencapai volume satu liter. Perendaman dilakukan selama 24 jam, dengan pemberian aerator untuk menjamin ketersediaan oksigen.

Pengeringan. Benih dikeringkan dengan pengovenan pada suhu 35°C (± 3) sampai kadar airnya 14%, 12% dan 10%. Penentuan kadar air benih dilakukan melalui perubahan berat segar sampel yang terdiri atas 3 ulangan, setiap ulangan terdiri atas 50 butir benih. Untuk kadar air 14% dicapai setelah pengeringan selama 32 jam, sedangkan untuk 12% selama 41 jam dan 10% selama 58 jam (kadar air awal benih 42,41%). Setelah mencapai kadar air yang diinginkan, benih dibiarkan pada temperatur ruangan selama 24 jam sebelum dilanjutkan dengan *osmoconditioning*.

Osmoconditioning. *Osmoconditioning* dilakukan dengan perendaman dalam larutan PEG 6000 -0,4 Mpa selama 3, 5 dan 7 hari. Larutan PEG 6000 -0,4 Mpa dibuat dengan melarutkan 169,43 g PEG 6000 dalam satu liter air, sesuai rumus yang ditentukan oleh Michel dan Kaufmann, 1973. Perbandingan antara benih dan larutan adalah 1 : 2 (vol / vol). Untuk menjamin ketersediaan oksigen digunakan aerator selama berlangsungnya *osmoconditioning*.

Pengamatan dilakukan terhadap parameter kimia dan fisiologis. Parameter kimia yang digunakan adalah kadar prolin (metode Bates), kadar pati (*direct acid hydrolysis method*), asam lemak bebas (cara Mehlenbacher), asam askorbat (Metode oksidasi-reduksi dengan 0,001 N 2,6 D), α -tokoferol (Wong *et al.*, 1988), dan daya hantar listrik, sedangkan parameter fisiologis yang digunakan adalah daya tumbuh benih.

¹ Seluruh pernyataan kadar air pada tulisan ini didasarkan pada berat basah

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar Prolin

Dari Tabel 1 terlihat bahwa terjadi interaksi yang nyata saat kadar air benih diturunkan dari 12% ke 10% dan konsentrasi ABA dinaikkan dari 0 ppm ke 10 ppm, yang menyebabkan kadar prolin tertinggi dan berbeda nyata dengan kombinasi perlakuan lainnya. Kadar prolin terendah dijumpai pada kadar air 14% tanpa ABA yang tidak berbeda nyata dengan kadar air 12% tanpa ABA. Kadar prolin nyata lebih tinggi bila *osmoconditioning* tidak dilakukan. Penambahan durasi *osmoconditioning* tidak mempengaruhi perubahan kadar prolin secara nyata (Tabel 2).

Tabel 1. Interaksi antara konsentrasi ABA dan pengeringan pada kadar prolin benih ($\mu\text{mol/g}$).

Aplikasi ABA (ppm)	Pengeringan (% kadar air)		
	P ₁₄ P ₁₂ P ₁₀		
	P ₁₄	P ₁₂	P ₁₀
H ₀	8,632 ^d	11,955 ^{cd}	13,241 ^c
H ₁₀	13,460 ^c	25,152 ^b	29,165 ^a

Keterangan: Angka yang diikuti oleh superskrip yang sama pada baris dan kolom yang sama tidak berbeda nyata pada DMRT 5%

Tabel 2. Pengaruh durasi *osmoconditioning* terhadap kadar prolin benih ($\mu\text{mol/g}$).

	Durasi <i>Osmoconditioning</i> (hari)			
	O ₀	O ₃	O ₅	O ₇
	20,507 ^a	16,902 ^b	16,442 ^b	13,747 ^b

Keterangan: Angka yang diikuti oleh superskrip yang sama tidak berbeda nyata pada DMRT 5%

Kadar Pati

Dari Tabel 3 terlihat bahwa terjadi interaksi yang nyata saat konsentrasi ABA diturunkan dari 10 ppm ke 0 ppm dan kadar air benih diturunkan dari 12% ke 10%, yang menyebabkan kadar pati terendah yang berbeda nyata dengan kombinasi perlakuan lainnya. Kadar pati tertinggi dijumpai pada kadar air 14% tanpa ABA yang tidak berbeda nyata dengan pengeringan yang didahului aplikasi ABA.

Tabel 3. Interaksi antara konsentrasi ABA dan pengeringan pada kadar pati benih (%).

Aplikasi ABA (ppm)	Pengeringan (% kadar air)		
	P ₁₄	P ₁₂	P ₁₀
H ₀	10,63 ^a	7,73 ^b	5,58 ^c
H ₁₀	10,21 ^{ab}	9,10 ^{ab}	10,33 ^a

Keterangan: Angka yang diikuti oleh superskrip yang sama pada baris dan kolom yang sama tidak berbeda nyata pada DMRT 5%

Tabel 4. Interaksi antara konsentrasi ABA, pengeringan dan durasi *osmoconditioning* pada kadar asam lemak bebas benih (%).

Perlakuan	H ₀			H ₁₀		
	P ₁₄	P ₁₂	P ₁₀	P ₁₄	P ₁₂	P ₁₀
O ₀	5,416 ^a	5,401 ^a	5,413 ^a	1,207 ^e	2,752 ^{bc}	4,906 ^a
O ₃	5,042 ^a	4,998 ^a	5,404 ^a	1,206 ^e	2,750 ^{bc}	3,453 ^b
O ₅	4,897 ^a	4,973 ^a	4,973 ^a	1,205 ^e	1,981 ^{cd}	2,817 ^{bc}
O ₇	4,794 ^a	4,875 ^a	4,891 ^a	1,205 ^e	1,980 ^{cd}	1,831 ^{de}

Keterangan:

- Angka yang diikuti oleh superskrip yang sama pada baris dan kolom yang sama tidak berbeda nyata pada DMRT 5%
- H₀: ABA 0 ppm, H₁₀: ABA 10 ppm, P₁₄: pengeringan sampai kadar air benih 14%, P₁₂: pengeringan sampai kadar air benih 12%, P₁₀: pengeringan sampai kadar air benih 10%, O₀: tidak di-*osmoconditioning*, O₃: *Osmoconditioning* selama 3 hari, O₅: *Osmoconditioning* selama 5 hari, dan O₇: *Osmoconditioning* selama 7 hari

Kadar Asam Lemak Bebas

Dari Tabel 4 terlihat bahwa terjadi interaksi yang nyata saat benih yang telah diaplikasikan ABA diturunkan kadar airnya dari 12% ke 10% dan tidak dilanjutkan dengan *osmoconditioning*, yang menyebabkan kadar asam lemak bebas yang tinggi yang tidak berbeda nyata dengan benih yang dikeringkan tanpa aplikasi ABA baik dilanjutkan dengan *osmoconditioning* maupun tidak, namun berbeda nyata dengan kombinasi perlakuan lainnya. Kadar asam lemak bebas terendah dijumpai pada kadar air 14% dengan aplikasi ABA baik dilanjutkan dengan *osmoconditioning* maupun tidak yang tidak berbeda nyata dengan kadar air 10% dengan ABA yang di-*osmoconditioning* selama 7 hari dan secara umum juga tidak berbeda nyata dengan kadar air 12% dengan ABA yang dilanjutkan dengan *osmoconditioning* minimal selama 5 hari, namun berbeda nyata dengan kadar air 12% dengan ABA yang di-*osmoconditioning* di bawah 5 hari dan kadar air 10% dengan ABA

Kadar α -tokoferol

Dari Tabel 5 terlihat bahwa terjadi interaksi yang nyata saat benih yang telah diaplikasikan ABA diturunkan kadar airnya dari 14% ke 12% dan durasi *osmoconditioning* ditambahkan dari 3 hari ke 5 hari, yang menyebabkan kadar α -tokoferol yang tinggi yang tidak berbeda nyata dengan benih berkadar air 12% dengan aplikasi ABA dan *osmoconditioning* selama 7 hari dan berkadar 10% dengan aplikasi ABA baik dilanjutkan dengan *osmoconditioning* maupun tidak. Kadar α -tokoferol terendah dijumpai pada kadar air 10% tanpa aplikasi ABA dan *osmoconditioning* selama 3 hari yang secara umum tidak berbeda nyata dengan kombinasi perlakuan lainnya kecuali dilanjutkan dengan *osmoconditioning* selama 5 hari pada kadar air 14% tanpa ABA dan kadar air 14% dan 12% dengan ABA.

Tabel 5. Interaksi antara konsentrasi ABA, pengeringan dan durasi *osmoconditioning* pada kadar α -tokoferol benih ($\mu\text{g/mol}$).

Perlakuan	H ₀			H ₁₀		
	P ₁₄	P ₁₂	P ₁₀	P ₁₄	P ₁₂	P ₁₀
O ₀	401,39 ^{efghi}	392,07 ^{ghij}	381,17 ^{ij}	417,09 ^{defg}	396,80 ^{efghij}	450,52 ^{abc}
O ₃	386,51 ^{hij}	391,81 ^{ghij}	369,54 ^j	408,93 ^{efghi}	402,73 ^{efghi}	452,19 ^{ab}
O ₅	414,63 ^{defgh}	385,26 ^{hij}	391,47 ^{ghij}	423,05 ^{cdef}	439,81 ^{abcd}	458,79 ^a
O ₇	428,12 ^{bcde}	394,72 ^{efghij}	400,21 ^{efghi}	426,41 ^{bcde}	457,07 ^a	461,74 ^a

Keterangan:

- Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada baris dan kolom yang sama tidak berbeda nyata pada DMRT 5%
- H₀: ABA 0 ppm, H₁₀: ABA 10 ppm, P₁₄: pengeringan sampai kadar air benih 14%, P₁₂: pengeringan sampai kadar air benih 12%, P₁₀: pengeringan sampai kadar air benih 10%, O₀: tidak di-*osmoconditioning*, O₃: *osmoconditioning* selama 3 hari, O₅: *osmoconditioning* selama 5 hari, dan O₇: *osmoconditioning* selama 7 hari

Daya Tumbuh

Dari Tabel 6 terlihat bahwa terjadi interaksi yang nyata saat benih yang tidak diaplikasikan ABA diturunkan durasi *osmoconditioning*nya dari 5 hari ke 3 hari dan kadar airnya diturunkan dari 12% ke 10%, yang menyebabkan daya tumbuh benih terendah yang tidak berbeda nyata dengan benih berkadar air 10% tanpa ABA dan tidak dilanjutkan dengan *osmoconditioning*. Daya tumbuh benih tertinggi dijumpai pada benih yang dikeringkan setelah aplikasi ABA dan di-*osmoconditioning* selama 7 hari, yang tidak berbeda nyata dengan semua kombinasi perlakuan kecuali yang dikeringkan sampai kadar airnya 12 dan 10%

tanpa aplikasi ABA dan durasi *osmoconditioning* kurang dari 5 hari.

Tabel 6. Interaksi antara konsentrasi ABA, pengeringan dan durasi *osmoconditioning* pada daya tumbuh benih (%).

Perlakuan	H ₀			H ₁₀		
	P ₁₄	P ₁₂	P ₁₀	P ₁₄	P ₁₂	P ₁₀
O ₀	75,000 ^{abcde}	61,500 ^e	12,500 ^{fg}	78,000 ^{abcde}	77,000 ^{abcde}	81,500 ^{abcde}
O ₃	85,500 ^{abcd}	64,000 ^{de}	8,000 ^g	78,500 ^{abcde}	76,500 ^{abcde}	86,000 ^{abcd}
O ₅	75,000 ^f	81,500 ^{abcde}	71,500 ^{bcde}	81,000 ^{abcde}	78,500 ^{abcde}	89,000 ^{abc}
O ₇	86,500 ^{abcd}	89,500 ^{ab}	66,500 ^{cde}	83,000 ^{abcde}	84,500 ^{abcde}	92,500 ^a

Keterangan:

- Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada baris dan kolom yang sama tidak berbeda nyata pada DMRT 5%
- H₀: ABA 0 ppm, H₁₀: ABA 10 ppm, P₁₄: pengeringan sampai kadar air benih 14%, P₁₂: pengeringan sampai kadar air benih 12%, P₁₀: pengeringan sampai kadar air benih 10%, O₀: tidak di-*osmoconditioning*, O₃: *Osmoconditioning* selama 3 hari, O₅: *Osmoconditioning* selama 5 hari, dan O₇: *Osmoconditioning* selama 7 hari

Prolin adalah senyawa osmotik yang memainkan peranan penting dalam toleransi terhadap cekaman kekeringan melalui fungsinya sebagai osmoregulator/osmoprotektan (Walton *et al.*, 1998), sehingga peningkatan kadar prolin akibat penurunan kadar air adalah suatu bentuk adaptasi umum. Peningkatan kadar prolin juga terjadi pada bahan hidup melalui induksi oleh aplikasi ABA eksternal (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 2000), sehingga terjadi saling memperkuat pengaruh antara aplikasi ABA dan pengeringan yang menyebabkan peningkatan kadar prolin yang pesat. Namun peran prolin sebagai osmoprotektan dapat menghambat terjadinya perkecambahan melalui pengurangan ketersediaan air yang vital bagi perkecambahan. *Osmoconditioning* yang berperan dalam pemulihan diri benih praperkecambahan menurunkan kadar prolin ke kadar normal yang dibutuhkan oleh benih sejak hari ketiga.

Pati memiliki peranan penting dalam toleransi terhadap cekaman kekeringan melalui fungsinya sebagai osmoprotektan dan *Water replacement hypothesis*. ABA dapat mempertahankan kandungan pati tetap tinggi dalam pengeringan melalui induksi berbagai senyawa yang dapat menjaga stabilitas fosfolipid dwilapis, sehingga dapat mencegah kebocoran sel yang dapat menyebabkan keluarnya cairan sel dan bahan-bahan yang terlarut di dalamnya.

Asam lemak bebas merupakan salah satu penyebab kemunduran benih melalui deteriorasi membran (Bewley, 1979). ABA dapat menghambat akumulasi asam-asam lemak bebas melalui produksi enzim-

enzim pembersih radikal dan peroksida bebas dan antioksidan (Come dan Corbineau, 1996), dan dengan cara yang serupa *osmoconditioning* juga dapat mengendalikan akumulasi asam-asam lemak bebas. Bailly *et al.* (2000) telah menunjukkan bahwa pengembalian viabilitas benih selama *osmoconditioning* berhubungan dengan penurunan pada asam-asam lemak bebas, yaitu penurunan pada kadar malondialdehid dan senyawa yang terkonjugasi dengannya, yang mengindikasikan terhentinya proses-proses lipid peroksidasi dan peningkatan pada protein (yang berhubungan dengan kembalinya aktivitas enzim-enzim detoksifikasi: superoksida dismutase, katalase, glutathion reduktase, dengan mengontrol laju lipid peroksidasi melalui pembersihan H₂O₂ dan memproduksi antioksidan).

Alfa tokoferol merupakan salah satu antioksidan yang berperan penting dalam pembersihan radikal-radikal dan peroksida bebas yang beracun bagi benih (Come dan Corbineau, 1996). Baik ABA maupun *osmoconditioning* menginduksi peningkatan kadar α -tokoferol untuk melindungi benih saat terjadinya cekaman dan memulihkannya, sehingga peningkatan senyawa-senyawa beracun dapat diminimalkan oleh ABA dan sisanya dapat dibersihkan melalui *osmoconditioning*. Terdapat hubungan saling memperkuat pengaruh antara aplikasi ABA dan durasi *osmoconditioning* yang menyebabkan terjadinya peningkatan kadar α -tokoferol yang pesat dengan semakin rendahnya kadar air benih.

Daya tumbuh benih merupakan hasil dari akumulasi berbagai proses dan keadaan yang terjadi sebelum benih tumbuh. Aplikasi ABA memiliki peran yang sangat penting dalam mempertahankan daya tumbuh benih tetap tinggi melalui osmoregulasi, *water replacement hypothesis* dan berbagai mekanisme protektif untuk menghadapi penyebab kerusakan oksidatif, sehingga dengan adanya aplikasi ABA benih dapat dikeringkan bahkan sampai 10%. Sungguhpun demikian masih terdapat kecenderungan *osmoconditioning* memperkuat pengaruh tersebut. *Osmoconditioning* juga dapat menurunkan asam-asam lemak bebas melalui aktivasi enzim-enzim detoksifikasi dan mengontrol laju lipid peroksidasi melalui pembersihan H₂O₂ dan memproduksi antioksidan (Bailly *et al.*, 2000 dan Sung dan Chiu, 2001), sehingga cukup mampu menggantikan peran ABA bila penurunan kadar air benih dilakukan hanya sampai 12% dan dilakukan dengan durasi minimal 5 hari.

KESIMPULAN

1. ABA memiliki peranan yang penting dalam peningkatan toleransi benih kopi arabika terhadap pengeringan di bawah 14%. ABA dapat meningkatkan kandungan prolin, mempertahankan kandungan pati, dan meningkatkan kandungan α -tokoferol benih, sehingga mencegah akumulasi asam-asam lemak bebas, yang pada akhirnya mampu mempertahankan daya tumbuh benih tetap tinggi.
2. *Osmoconditioning* tidak menunjukkan peran penting dalam perbaikan viabilitas benih apabila sebelum penurunan kadar air telah diaplikasikan ABA. Tanpa aplikasi ABA sebelum penurunan kadar air, *osmoconditioning* berperan penting dengan meningkatkan kandungan α -tokoferol sehingga daya tumbuh benih menjadi lebih baik. Ditinjau dari segi daya tumbuh benih, *osmoconditioning* dengan durasi minimal 5 hari dapat menggantikan fungsi ABA bila kadar air benih hanya diturunkan sampai 12%.

DAFTAR PUSTAKA

- Bailly, C., A. Benamar, F. corbineau dan C. Come. 2000. Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed as affected by priming. *Seed Science Research*. 10 (1): 35-42.
- Bewley, J. D. 1979. Physiological aspects of desiccation tolerance. *Annual Review Plant Physiology*. 30: 195-238.
- Come, D. dan F. Corbineau. 1996. Metabolic damage related to desiccation sensitivity. Dalam A. S. Ouedraogo, K. Poulsen dan F. Stubsgaard (Eds.). *Proceedings Of A Workshop On Improved Methods For Handling And Storage Of Intermediate/Recalcitrant Tropical Forest Tree Seeds*. IPGRI, Rome and DANIDA Forest Seed Centre, Humleboek, Denmark. Hal: 107-120.
- Dussert, S., N. Chabrillange, F. Engelmann, F. Anthony dan S. Hamon. 2000. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: toward a simplified protocol for routine use in coffee genebanks. Dalam F. Engelman dan H. Takagi (Eds.). *Cryopreservation Of Tropical Plants Germplasm. Current Research Progress And Application*. Japan International Research Center For Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 161-166.
- Lima, W. A. A., D. C. F. S. Dias, E. M. Alfarenga, M. S. Reis dan P. R. Cecon. 2001. Preconditioning of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: effects on germination, vigour, and storability. *Seed Science And Technology*. 29 (3): 549-555.
- Simione, F. P. 1998. *Cryopreservation Manual*. Nalge Nunc International Corp. <http://www.Nalgenunc.com/cryo>. Hal: 1.

- Sung, J. M. dan K. Y. Chiu. 2001. Solid matrix priming can partially reverse the deterioration of sweet corn seed induced by 2,2'-azobis (2-amidinopropane) hydrochloride generated free radicals. *Seed Science And Technology*. 29 (2): 287-298.
- Walton, E. F., E. Podivinsky, R. M. Wu, P. H. S. Reynolds dan L. W. Young. 1998. Regulation of proline biosynthesis on kiwi fruit buds and without hydrogen cyanamide treatment. *Physiol Plant*. 102: 171-178.
- Wong, M. L., R. E. Timms dan E. M. Goh. 1988. Colorimetric determination of total tocopherols in palm oil, olein and stearin. *JAOCS*. 65 (2): 258-261.
- Yamaguchi-Shinozaki, K, M. Kasugawa, Q. Liu, Y. Sakuma, H. Abe, S. Miura, dan K. Shinozaki. 2000. Molecular mechanism of freezing and drought tolerance in plants. *Dalam F. Engelman dan H. Takagi (Eds.). Cryopreservation of Tropical Plants Germplasm. Current Research Progress and Application*. Japan International Research Center For Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. Hal: 67-76.