

# Penyimpanan Benih Damar (*Agathis damara* Salisb.) dalam Nitrogen Cair

## Cryopreservation of dammar (*Agathis damara* Salisb.) seeds in liquid nitrogen

DHARMAWATI FERRY DJAM'AN<sup>1</sup>, DODY PRIADI<sup>2</sup>✉, ENNY SUDARMANOWATI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Balai Penelitian dan Pengembangan Teknologi Perbenihan, Departemen Kehutanan RI, Bogor 16001.

<sup>2</sup> Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong-Bogor 16911.

Diterima: 13 Desember 2005. Disetujui: 26 Februari 2006.

### ABSTRACT

Damar (*Agathis damara*) seeds categorized as an intermediate seeds since their viability tend to decrease when subjected to storage more than 2 weeks conventionally. Storage period of seeds could be prolonged when the seeds cryopreserved in liquid nitrogen since the metabolism of the cells could be minimized without loss of viability. The objective of the study was to identify suitable vitrification method for dammar storage seeds. Seed water content was decreased gradually from initial water content (28.48% as a control) using desiccators and vacuum method. Vitrification solution (PVS2) containing glycerol 30%, ethylene glycol 15% and dimethylsulfoxide (DMSO) 15% in 0.4M sucrose solution was used as a cryoprotectant of peeled or unpeeled dammar seeds during freezing process. The samples were soaked in PVS2 for 1 hour followed by exposure to liquid nitrogen in cryotube for 1 hour. The samples were then thawed in water bath at 28°C for 1 hour prior to germination in IPB-78 germinator with UDK and UKdDp germination methods. Results showed that the highest viability of cryopreserved dammar seeds (22.32% moisture content) was 100% obtained from those germinated with UKdDp method. A negative effect of cryoprotectant was occurred in both peeled and unpeeled seeds cryopreserved for 1 hour. However, it was effective for seeds cryopreserved for 4 weeks which indicate the possibility to preserve for a longer period in the future.

© 2006 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

**Key words:** dammar, *Agathis damara*, seeds, PVS2, cryopreservation.

### PENDAHULUAN

Damar (*Agathis damara* Salisb.) merupakan salah satu jenis tanaman hutan yang benihnya bersifat *intermediate* karena hanya dapat disimpan selama 12 minggu (Kusmintardjo dan Riskandarsyah, 1992). Ellis *et.al* (1990, 1991) menyebutkan adanya kategori benih *intermediate* di antara orthodox dan rekalsitran. Menurut Idris (1976), daya berkecambah benih damar masih dapat dipertahankan hingga 60% setelah periode simpan tiga bulan apabila disimpan dalam larutan NaCl 0,4 M. Benih rekalsitran seperti rambutan (*Nephellium lappaceum*) masih dapat berkecambah 88,33% setelah dibekukan pada suhu -10° C (Sudarmonowati *et. al.*, 1995). Biji orthodox yang berkadar air 2-4% dapat disimpan pada kisaran suhu -15°C sampai -20°C (Schmidt, 2000), namun biji rekalsitran dari daerah tropis sensitif terhadap suhu rendah, bahkan cepat menurun viabilitasnya apabila disimpan pada suhu 10-15°C (Phartyal *et.al.*, 2002).

Biji tanaman hutan daerah tropis umumnya bersifat rekalsitran atau intermediate, sehingga apabila disimpan secara konvensional, viabilitasnya akan cepat menurun. Penyimpanan benih dalam nitrogen cair (kriopreservasi) merupakan suatu solusi untuk menyimpan benih rekalsitran

dan intermediate. Benih dapat disimpan dalam bentuk biji utuh atau embrionya saja tergantung dari ukurannya. Beberapa jenis benih tanaman penghasil kayu seperti *Swietenia macrophylla* (mahoni) dan *Tectona grandis* (jati) telah berhasil dikriopreservasi dalam bentuk benih utuh dengan viabilitas masing-masing 63% dan 90% (Marzalina dan Nashatul, 2000), sedangkan dalam bidang tanaman industri, Eira *et.al.* (1999) telah berhasil menyimpan benih kopi (*Coffea arabica* dan *C. racemosa*).

Benih yang akan disimpan di dalam nitrogen cair harus mencapai kadar air optimal sehingga selama dalam penyimpanan tidak mengalami kerusakan akibat suhu ultra dingin (*chilling injury*). Oleh karena itu banyak penelitian biji difokuskan untuk mencari kadar air yang optimal sebelum disimpan pada suhu rendah maupun pada nitrogen cair (-196°C). Kriopreservasi termasuk kategori konservasi *ex situ*. Teknik penyimpanan ini dapat menghemat biaya tenaga kerja, bahan-bahan, dan fasilitas tanam karena waktu penyimpanan menjadi lebih lama (Grout, 1995). Penyimpanan benih jangka panjang merupakan strategi konservasi yang penting untuk jenis-jenis yang langka dan terancam punah (Cochrane *et.al.*, 2002).

Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh prosedur kriopreservasi dengan metode vitrifikasi untuk benih damar sebagai model benih tanaman hutan tropis semi rekalsitran dengan membandingkan daya kecambah benih berkulit dan benih tanpa kulit pada berbagai kadar air awal setelah pembekuan pada suhu -196°C.

#### ✉ Alamat korespondensi:

Jl. Raya Bogor Km. 46, Cibinong-Bogor 16911.  
Tel.: +62-21-8754587 Fax.: +62-21-8754588  
e-mail: d\_priadi@telkom.net

## BAHAN DAN METODE

### Lokasi penelitian

Pengamatan fenologi dan pengumpulan buah/bahan generatif damar dilaksanakan di daerah Baturaden, Jawa Tengah dan Gunung Walat, Jawa Barat. Pelaksanaan penelitian vitrifikasi dan pengujian perkecambahan masing-masing dilaksanakan di Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong-Bogor dan Laboratorium Balai Penelitian dan Pengembangan Teknologi Perbenihan, Departemen Kehutanan RI, Bogor.

### Bahan dan alat

Bahan tanaman yang digunakan berupa benih utuh dan benih dikupas yang berasal dari benih tanaman damar.

Peralatan yang digunakan antara lain, tabung nitrogen cair, rak untuk menyimpan bahan tanaman di dalam tabung nitrogen, beaker glass, gelas ukur, Petri dish, timbangan analitik dan tabung plastik (cryotube) untuk menyimpan bahan tanaman di dalam nitrogen cair.

### Cara kerja

**Penurunan kadar air.** Untuk mencapai kadar air (KA) benih damar yang diinginkan, digunakan teknik desikasi dengan silika gel dan pompa vakum. Penurunan KA dilakukan dengan berbagai interval waktu yaitu setiap 3 jam, kemudian sampel diukur kadar airnya secara gravimetri dengan metode oven yaitu dengan pengeringan pada suhu 103°C selama 17 jam. Kadar air ditentukan berdasarkan berat basah. Rincian perlakuan penurunan kadar air disajikan pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Tabel perlakuan pada vitrifikasi benih damar.

Perlakuan desikasi	Perlakuan vitrifikasi			
	V1	V2	V3	V4
Benih segar (K0)	K0 V1	K0 V2	K0 V3	K0 V4
3 jam (KA1)	K1 V1	K1 V2	K1 V3	K1 V4
6 jam (KA2)	K2 V1	K2 V2	K2 V3	K2 V4
9 jam (KA3)	K3 V1	K3 V2	K3 V3	K3 V4

Keterangan: V1 = tanpa larutan krioprotektan - tanpa pembekuan. V2 = dengan larutan krioprotektan - dengan pembekuan. V3 = tanpa larutan krioprotektan - dengan pembekuan. V4 = dengan larutan krioprotektan - dengan pembekuan

**Krioprotektan.** Metode kriopreservasi yang digunakan adalah vitrifikasi. Tahap pertama pada metode vitrifikasi adalah perendaman dengan larutan krioprotektan PVS2 (Sakai *et al.*, 1990) yang terdiri dari larutan 30% (v/v) gliserol, 15% (v/v) etilen glikol, 15% (v/v) dimetil sulfoxid (DMSO) yang dilarutkan dalam 0,4 M sukrosa. Setiap perlakuan terdiri atas tiga ulangan. Sebanyak 25 benih dimasukkan ke dalam botol pada setiap ulangan dan diberi label sesuai dengan perlakuannya. Perendaman dilakukan selama 60 menit pada suhu 28°C. Perlakuan terdiri atas perlakuan tanpa larutan vitrifikasi (V1 dan V3) yaitu benih direndam dalam 0,4 M sukrosa saja dan perlakuan dengan larutan vitrifikasi (V2 dan V4).

**Pembekuan.** Pembekuan dilakukan setelah kadar air benih damar diturunkan sesuai dengan kadar air yang diinginkan, yaitu dengan cara memasukkan botol-botol plastik tahan suhu rendah yang berisi sampel ke dalam tabung nitrogen cair. Botol-botol tersebut dimasukkan ke dalam "cryo can" berupa gayung aluminium yang disumbat terlebih dahulu dengan kertas tisu agar botol-botol tidak keluar dari gayung tersebut. Pembekuan dilakukan selama

1 jam. Tabung nitrogen cair harus tertutup dengan rapat selama proses ini.

**Pencairan (thawing).** Setelah pembekuan, semua bahan tanaman dicairkan dengan cara merendam dalam "water bath" pada suhu 28°C selama 20 menit. Setelah tutup botol dapat dibuka, maka benih damar dibilas dengan akuades sampai bersih untuk menghilangkan krioprotektan yang menempel pada biji.

**Prosedur regenerasi (perkecambahan).** Bahan tanaman diletakkan di atas kertas saring yang sudah dibasahi dengan akuades dan dilakukan pengujian perkecambahan dengan metode UDK (Uji Diatas Kertas) dan UKDdp (Uji Kertas Digulung dengan plastik) (Sadjad, 1993), kemudian dimasukkan ke dalam rumah kecambah (germinator) IPB-78 pada suhu 28°C.

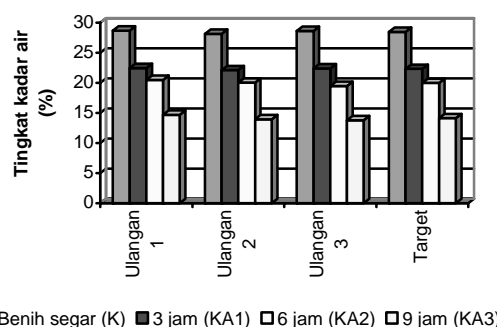
### Analisis data

Data dianalisis menggunakan perangkat lunak statistik SPSS 11.0.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pengaruh metode desikasi-vakum terhadap penurunan kadar air

Pengukuran kadar air awal terhadap benih damar dilakukan dengan menggunakan metode desikasi dan vakum dengan interval 3 jam untuk mengetahui kadar air yang dihasilkan (kadar air target). Hasil penurunan kadar air dengan alat tersebut diperlihatkan pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Penurunan kadar air dengan metode desikasi dengan alat vakum.

Pengeringan atau proses penurunan kadar air dapat meningkatkan viabilitas benih, tetapi pengeringan yang mengakibatkan kadar air yang terlalu rendah akan mengurangi viabilitas benih (Chai *et al.*, 1998; Walters dan Engels, 1998). Proses penurunan kadar air benih dapat dilaksanakan dengan berbagai metode seperti dikeringanginkan, penjemuran maupun dengan silika gel. Ketiga metode tersebut memerlukan waktu cukup lama untuk menurunkan kadar air sampel, bahkan sampai beberapa hari. Hal ini dapat mengganggu viabilitas benih itu sendiri terutama bagi benih yang termasuk rekalsitran dan intermediate. Benih damar yang digunakan dalam penelitian ini diturunkan kadar airnya dengan teknik desikasi dengan silika gel dan menggunakan pompa vakum yang berkekuatan 250 mmHg. Dussert *et al.* (1999) telah menjelaskan sensitivitas desikasi biji secara matematis menggunakan biji kopi (*Coffea spp.*) sebagai model.

Pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa waktu yang diperlukan untuk menurunkan  $\pm 5\%$  kadar air benih damar mencapai 3 jam pada KA awal 28,48% dan KA target

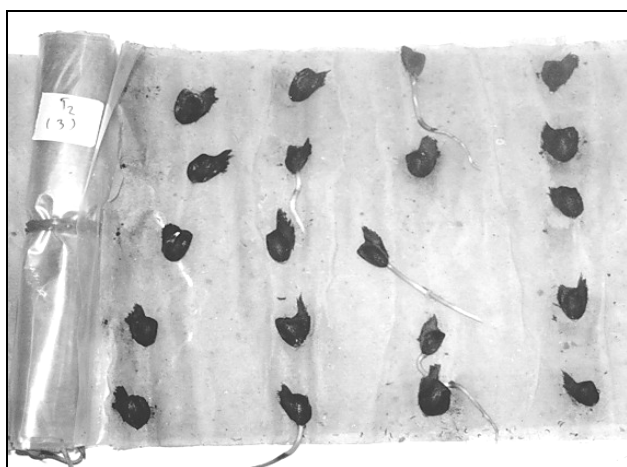
22,32%. Metode desikasi ini telah pula dipakai untuk jenis meranti (*Shorea leprosula*) untuk mencapai KAT (Kadar Air Target) sebesar 20% dengan KA awal 28,6% diperlukan waktu sampai  $\pm$  24 jam dengan menggunakan silika gel tanpa pompa vakum (Thomsen dan Sigit, 2004). Metode penurunan KA yang digunakan untuk benih damar ini lebih efektif dan efisien dalam penggunaan waktunya, walaupun pada saat ini belum dapat ditentukan waktu bakunya untuk setiap jenis.

#### Pengaruh kadar air terhadap perkecambahan

Setelah dilakukan proses penurunan kadar air, benih damar diuji perkecambahannya. Pada Tabel 2 dapat dilihat hasil uji perkecambahan benih damar dengan metode UKdDp (Gambar 2) setelah 7 hari disimpan dalam ruang germinator. Tabel 2 menunjukkan bahwa kandungan air awal benih mempengaruhi perkecambahannya. Benih segar (KA 28,48%) dapat berkecambah 100% dan terus menurun sampai 84% (KA 14,11%).

**Tabel 2.** Persentase perkecambahan benih damar dengan KA yang berbeda.

No.	KA awal (%)	Jumlah kecambah normal			Rerata kecambah (%)
		Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
1.	28,48	25	25	25	100
2.	22,32	24	24	23	94
3.	19,99	22	25	25	96
4.	14,11	22	19	22	84



**Gambar 2.** Metode uji kecambah UKdDp untuk benih damar.

#### Pengaruh vitrifikasi terhadap perkecambahan dengan metode berbeda

Benih-benih yang sudah diturunkan kadar airnya dengan metode desikasi (Tabel 1), kemudian direndam dalam larutan krioprotektan selama 1 jam dan divitrifikasi dalam nitrogen cair selama 1 jam. Setelah vitrifikasi, benih damar dikecambahkan dengan metode UDK dan UKdDp. Hasil perkecambahan tersebut dapat dilihat pada Tabel 4. Perlakuan KA1 pada uji UDK dan Kontrol pada uji UKdDp memperlihatkan pengaruh yang sama.

Setelah proses *thawing* (pencairan es), benih yang akan dikecambahkan ditabur pada kertas saring yang telah dilembabkan. Untuk proses perkecambahan ini digunakan metode UKdDp dan UDK serta menggunakan germinator IPB-78 sebagai ruang kecambahannya. Setelah 1 minggu, semua sampel dibuka dan kemudian dihitung jumlah

kecambah normalnya. Benih-benih dengan kondisi KA awal yang berbeda tersebut (28,48%, 22,32%, 19,99%, dan 14,11%) direndam dalam larutan krioprotektan dan divitrifikasi dalam larutan nitrogen selama 1 jam, kemudian dikecambahkan dengan uji UDK dan UKdDp hasilnya seperti terlihat pada Tabel 3. Tabel 3 menunjukkan bahwa pengujian kecambah dengan UKdDp pada benih KA1 viabilitasnya masih dapat dipertahankan mencapai 100% berkecambah.

**Tabel 3.** Persentase germinasi benih damar setelah dikopreservasi.

No.	Perlakuan (KA awal)	Kecambah normal (%)	
		UDK	UKdDp
1.	Kontrol	94	95
2.	KA1	95	100
3.	KA2	96	93
4.	KA3	84	88

Keterangan: KA1 = 22,32%, KA2 = 19,99%, KA3 = 14,11%; UDK = uji di atas kertas; UKdDp = uji kertas digulung dibungkus plastik.

#### Pengaruh vitrifikasi dan kondisi kulit benih terhadap perkecambahan

Kegiatan utama dari penelitian ini yaitu kriopreservasi benih damar dengan menyimpan benih dalam nitrogen cair yang bersuhu sangat rendah ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), tetapi diharapkan benih masih mempunyai viabilitas yang tinggi setelah pencairan kembali. Menurut Salomao (2002), benih tanaman daerah tropis pada umumnya toleran terhadap nitrogen cair sehingga tidak mempengaruhi daya perkecambahannya. Benih intermediate yang disimpan secara konvensional dengan kadar air 12-17% hanya dapat bertahan selama beberapa bulan, sedangkan apabila disimpan pada suhu yang lebih rendah akan menunjukkan peningkatan daya simpannya (Schmidt, 2000). Persentase rata-rata perkecambahan benih damar setelah divitrifikasi selama 1 jam dan 4 minggu disajikan pada Tabel 4.

**Tabel 4.** Persentase perkecambahan benih damar yang dikupas dan tidak dikupas setelah penyimpanan selama 1 jam dan 4 minggu dalam nitrogen cair.

Lama vitrifikasi	Perlakuan	Jumlah benih			
		Awal	Berkecambah normal	Busuk/jamur	Berkecambah normal (%)
1 jam	V1K1	20,00	3,00	17,00	15,00 cd
	V1K2	20,00	9,67	3,6667	48,33 b
	V2K1	20,00	8,00	12,0000	40,00 bc
	V2K2	18,33	0,00	18,3333	0,00 d
	V3K1	20,00	8,00	12,0000	40,00 bc
	V3K2	19,67	16,67	3,0000	84,67 a
	V4K1	19,67	0,00	19,6667	0,00 d
	V4K2	24,67	0,33	24,3333	1,33 d
4 minggu	V1K1	0,00	0,00	0,00	0,00 c
	V1K2	13,33	10,33	3,00	51,67 ab
	V2K1	20,00	6,67	13,67	33,33 bc
	V2K2	19,33	15,67	3,67	81,00 a
	V3K1	20,00	3,33	14,67	16,67 bc
	V3K2	20,00	11,33	8,67	56,67 ab
	V4K1	20,00	7,33	12,67	36,67 bc
	V4K2	13,00	6,67	8,67	34,33 bc

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan nyata (5%) menurut uji jarak berganda Duncan (DMRT). Lama peredaman dalam larutan krioprotektan: 1 jam. Lama dicelup dalam nitrogen cair: 1 jam. Lama *thawing* dalam suhu ruang: 20 menit. Kondisi benih: Kadar air = 26,97%. V1 = tanpa larutan krioprotektan-tanpa pembekuan. V2 = dengan larutan krioprotektan-tanpa pembekuan. V3 = tanpa larutan krioprotektan-dengan pembekuan. V4 = dengan larutan krioprotektan-dengan pembekuan. K1 = benih dikupas. K2 = benih berkulit.

Tabel 4 menunjukkan bahwa persentase rataan perkecambahan tertinggi (84,67%) diperoleh dari benih damar berkulit yang divitrifikasi selama 1 jam tanpa menggunakan krioprotektan PVS2. Penggunaan larutan krioprotektan pada benih yang dikupas maupun tidak dikupas ternyata mempunyai efek merugikan terhadap viabilitas benih damar yang divitrifikasi selama 1 jam, terbukti dengan rendahnya persentase perkecambahan. Hal sebaliknya terjadi pada vitrifikasi embrio leci (*Litchi chinensis*) yaitu perendaman dalam larutan krioprotektan yang terlalu singkat akan menghasilkan persentase perkecambahan yang rendah karena kandungan airnya masih terlalu tinggi (Sudarmonowati *et.al.*, 1995).

Secara umum persentase perkecambahan benih damar cenderung menurun setelah divitrifikasi selama 4 minggu, tetapi penggunaan PVS2 pada vitrifikasi selama 4 minggu tampaknya dapat meningkatkan viabilitas benih yang dikupas (36,67%) maupun tidak dikupas (34,33%) dibandingkan dengan vitrifikasi selama 1 jam. Keadaan sebaliknya terjadi pada benih *Centaurea hyssopifolia* dan *Limonium dichotomum*, yaitu lama penyimpanan dalam nitrogen cair tidak mempengaruhi viabilitasnya (Gonzalez-Benito *et.al.*, 1998). Viabilitas benih yang dikupas maupun tidak dikupas yang menggunakan krioprotektan tidak berbeda nyata secara statistik. Hal ini menunjukkan bahwa benih damar tidak perlu dikupas terlebih dahulu apabila akan dikriopreservasi. Penggunaan larutan krioprotektan diperlukan untuk meningkatkan viabilitas benih rekalsitran atau *intermediate*. Kriopreservasi benih ortodoks, krioprotektan tidak diperlukan karena HMFL (*high moisture freezing limit*) tercapai hanya dengan pengeringan tanpa mengakibatkan penurunan viabilitasnya (Potts dan Lumpkin, 1997).

Benih damar yang tidak divitrifikasi gagal berkecambah (0%) karena terserang jamur yang tumbuh pada benih, sedangkan pada sampel benih yang dikupas yang divitrifikasi dan diberi krioprotektan tidak ada yang berkecambah. Pertumbuhan jamur kemungkinan adalah akibat adanya sukrosa yang masih menempel pada benih sebelum proses perkecambahan, sehingga dapat memacu pertumbuhan jamur. Pengamatan secara umum menunjukkan bahwa daya berkecambah benih damar yang berkulit (K2) cenderung lebih tinggi dari pada yang dikupas (K1). Hal ini merupakan pengaruh positif dari nitrogen cair yaitu berfungsi sebagai peretak kulit benih sehingga air dapat masuk ke dalam benih dan memacu proses perkecambahan yang lebih baik. Pengaruh positif nitrogen cair ini telah dilaporkan juga pada benih *Bauhinia tomentosa* (Salomao, 2002). Menurut Hong dan Ellis (1996) penelitian kriopreservasi benih *intermediate* masih terus disempurnakan karena beberapa penelitian menunjukkan adanya kematian benih sesudah disimpan dalam nitrogen cair seperti pada kelapa sawit (*Elaeis guineensis*), sedangkan penelitian lainnya telah menunjukkan keberhasilan seperti pada teh (*Camellia sinensis*).

## KESIMPULAN

Kadar air sebelum kriopreservasi sangat menentukan keberhasilan vitrifikasi benih damar. Perkecambahan terbaik (100%) setelah kriopreservasi diperoleh dari benih damar yang dikriopreservasi berkadar air 22,32% dan

dikecambahkan dengan metode UKdDp. Penggunaan larutan krioprotektan PVS2 dalam konsentrasi yang lebih rendah atau waktu perendaman yang lebih cepat kemungkinan lebih baik untuk benih damar. Larutan krioprotektan PVS2 mempunyai pengaruh merugikan terhadap benih damar yang dikupas maupun tidak dikupas setelah dikriopreservasi selama 1 jam, kriopreservasi selama 4 minggu dapat meningkatkan viabilitasnya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Chai, J., R. Ma, L. Li, and Y. Du. 1998. Optimum moisture contents of seeds stored at ambient temperatures. *Seed Science Research Supplement* 1: 23-28.
- Cochrane, A., K Brown and A. Kelly. 2002. Low temperature and low moisture storage of seed of the endemic Australian genus *Eremophila* R Br (Myoporaceae). *Journal of the Royal Society of Western Australia* 85: 31-35.
- Dussert, S., N. Chabrilange, F. Engelmann, and S. Hamon. 1999. Quantitative estimation of seed desiccation sensitivity using a quantal response model: application to nine species of the genus *Coffea* L. *Seed Science Research* 9:135-144.
- Ellis, R.E., T.D. Hong, and E.H. Roberts. 1990. An intermediate category of seed storage behaviour? I. *Coffea*. *Journal of Experimental Botany* 41: 1167-1174.
- Ellis, R.E., T.D. Hong, E.H. Roberts, and U. Soetisna. 1991. Seed storage behaviour in *Elaeis guineensis*. *Seed Science Research* 1: 99-104.
- Eira, M.T.S., C. Walters, L.S. Caldas, L.C. Fazuoli, J.B. Sampaio, and M.C.L.L. Dias. 1999 Tolerance of *Coffea* spp. seeds to desiccation and low temperature. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 11 (2): 97-105.
- Gonzalez-Benito, M.E., F. Fernandez-Llorente, and F. Perez-Garcia. Interaction between cryopreservation, rewarming rate and seed humidification on the germination of two Spanish endemic species. *Annals of Botany* 82: 683-686.
- Grout, B.W.W. 1995. Introduction to the in vitro preservation of plant cells, tissues and organs. In Grout, B. (ed.). *Genetic Preservation of Plant Cells In Vitro Lab. Manual*. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Hong, T.D. and R.H. Ellis. 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. In Engels, J.M.M. and J. Toll (eds.). *IPGRI Technical Bulletin No. 1*. Rome: International Plant Genetic Resources Institute.
- Idris A., 1976. *Beberapa Faktor yang Mempengaruhi Viabilitas Benih Damar (Agathis loranthifolia Salisb.)*. Jakarta: Direktorat Reboisasi dan Rehabilitasi Direktorat Jenderal Kehutanan.
- Kusmintardjo dan A. Riskandaryah. 1992. Pengaruh kadar air awal, penambahan karbon dioksida dan lama periode simpan dalam dry cold storage terhadap daya berkecambah benih *Agathis damara* Salisb. *Buletin Perbenihan Kehutanan* 1 (1): 1-18.
- Marzalina, M. and Z.N.A. Nashatul. 2000. Cryopreservation of some Malaysian tropical urban forestry species. In Engelmann F. and H. Takagi (eds.). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*. Tsukuba, Japan, October 20-23, 2000.
- Pharyal, S.S., R.C. Thapliyal, N. Koedam, and S. Godefroid. 2002. *Ex situ* conservation of rare and valuable forest tree species through seed-gene bank. *Current Science* 83 (11): 1351-1357.
- Potts, S.E. and T.A. Lumpkin. 1997. Cryopreservation of *Wasabia* spp. seeds. *Cryo-Letters* 18: 185-190.
- Sadjad, S. 1993. *Dari Benih kepada Benih*. Jakarta: Grasindo.
- Sakal, A., S. Kobayashi, and I. Oiyama. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* 9: 30-33.
- Salomao, A.N., 2002. Tropical seeds species responses to liquid nitrogen exposure. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 14 (2): 133-138.
- Schmidt, L. 2000. *Guide to Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed*. Copenhagen-Denmark: Danida Forest Seed Centre.
- Seijo, G. and A.L. Ramos. 1999. Freezing tolerance acquisition during seed development of *Pisum sativum*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 11 (1):1-5.
- Sudarmonowati. E.S., I. Fitriyatni, dan S. Sadjad. 1995 *Viabilitas Benih Matoa (Pometia pinnata) dan Kerabatnya Setelah Penyimpanan Suhu Rendah Hingga -196°C*. Cibinong-Bogor: Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI).
- Thomsen, K. dan D. Sigit. 2004. *Manual Laboratorium untuk Studi Dasar-dasar Benih Pohon*. Jakarta: Indonesia Forest Seed Project.
- Walters, C. and J. Engels. 1998. The effect of storing seeds under extremely dry conditions. *Seed Science Research* 8 (1): 3-8.