

# Kriopreservasi Tanaman Obat Langka Purwoceng dengan Teknik Enkapsulasi-Vitrifikasi

Ika Roostika, Suci Rahayu, dan Novianti Sunarlim

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor

## ABSTRACT

Pruatjan (*Pimpinella pruatjan* Mol.) is an Indonesian endangered medicinal plant, so that it is highly protected. Cryopreservation can be applied to this plant for long-term preservation. The aim of this research was to obtain a method of encapsulation-vitrification by optimizing each step in cryopreservation protocol i.e. preculture, loading, dehydration with and without freezing in liquid nitrogen. The best treatment of each step would be applied in the following step. On preculture experiment, *in vitro* shoots were planted on the Driver and Kuniyaki (DKW) basal media containing 0.3 M sucrose and incubated for 1, 2, 3, 4, and 5 days. After those incubation period, shoot tips were encapsulated with 2.5% Na-alginate and soaking for 15 minutes in 100 ppm  $\text{CaCl}_2$  solution before planting. On loading experiment, precultured explants were loaded in DKW basal solution containing 2 M glycerol and 0.4 M sucrose for 0, 30, 60, and 90 minutes. On dehydration experiment, preculture and loaded explants were dehydrated with PVS2 solution PVS2 (DKW + 30% glycerol + 15% DMSO + 15% ethyleneglicol + 0.4 M sucrose) for 0, 30, 60, 90, and 120 minutes. The parts of them were freezed in liquid nitrogen ( $-196^\circ\text{C}$ ). The result showed that cryopreservation through encapsulation-vitrification technique could be applied on pruatjan. The best preculture treatment was 5 days incubation period. The best loading treatment was 30 minutes. The best dehydration treatment was 90 minutes. The successful level of this research was still low (10%) so that it needs optimization method.

Key words: *Pimpinella pruatjan* Mol., cryopreservation, encapsulation-vitrification.

## ABSTRAK

Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Mol.) adalah tanaman obat langka asli Indonesia yang hampir punah sehingga harus dilindungi. Kriopreservasi dapat diterapkan pada tanaman ini untuk penyimpanan jangka panjang. Tujuan penelitian adalah untuk memperoleh teknik enkapsulasi-vitrifikasi dengan melakukan optimasi dari tiap-tiap tahapan kriopreservasi yang meliputi perlakuan prakultur, *loading*, dehidrasi sebelum dan setelah pembekuan dalam nitrogen cair. Perlakuan yang terbaik kemudian diterapkan pada tahapan percobaan berikutnya. Pada perlakuan prakultur, tunas *in vitro* ditanam pada media Driver dan Kuniyaki (DKW) dengan penambahan sukrosa 0,3 M de-

ngan masa inkubasi 1, 2, 3, 4, dan 5 hari. Setelah itu, pucuk yang berukuran 0,5 cm dienkapsulasi dengan Na-alginat 2,5% (yang mengandung media regenerasi) dalam larutan  $\text{CaCl}_2$  100 ppm selama 15 menit sebelum penanaman kembali. Pada percobaan *loading*, terlebih dahulu eksplan diprakultur kemudian direndam dalam larutan DKW + gliserol 2 M + sukrosa 0,4 M dengan durasi rendam selama 0, 30, 60, dan 90 menit. Pada percobaan dehidrasi, eksplan diprakultur dan *loading* terlebih dahulu, kemudian direndam dalam larutan krioprotektan PVS2 (DKW + gliserol 30% + DMSO 15% + etilen glikol 15% + sukrosa 0,4 M) selama 0, 30, 60, 90, dan 120 menit. Eksplan tersebut sebagian dibekukan dalam nitrogen cair ( $-196^\circ\text{C}$ ) dan sebagian lainnya tidak dibekukan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kriopreservasi secara enkapsulasi-vitrifikasi berpeluang diterapkan pada tanaman purwoceng. Perlakuan prakultur terbaik adalah 5 hari. Perlakuan *loading* terbaik adalah 30 menit dan perlakuan dehidrasi terbaik 90 menit. Tingkat keberhasilan ini masih rendah (10%) sehingga diperlukan optimasi metode.

Kata kunci: *Pimpinella pruatjan* Mol., kriopreservasi, enkapsulasi-vitrifikasi.

## PENDAHULUAN

Purwoceng adalah tanaman obat langka asli Indonesia dengan status hampir punah (Rifai *et al.* 1992). Khasiatnya adalah sebagai afrodisiak, diuretik, dan tonik. Purwoceng hidup secara endemik dan sulit dibudidayakan di luar habitatnya. Saat ini tanaman tersebut hanya tersisa di tanah petani yang sangat sempit, yaitu di Desa Sekunang, Dataran Tinggi Dieng (Rahardjo 2003, Syahid *et al.* 2004). Dewasa ini, tanaman purwoceng sudah termasuk ke dalam Appendix I CITES, yang berarti sangat dilindungi.

Upaya konservasi *in situ* (pada habitatnya) hampir tidak mungkin dilakukan karena habitat asli tanaman ini sudah punah dengan rusaknya hutan konservasi. Dengan demikian, konservasi *ex situ* (di luar habitatnya) lebih sesuai untuk diterapkan. Konservasi *ex situ* di lapang menghadapi kendala ka-

rena tanaman purwoceng sulit dibudidayakan di luar habitatnya karena memerlukan persyaratan agronomi yang spesifik. Konservasi di lapang pun menghadapi risiko hilangnya populasi tanaman karena cekaman biotik dan abiotik. Pemeliharaan tanaman di lapang juga akan membutuhkan lahan, tenaga, waktu, dan biaya yang besar.

Teknologi kultur *in vitro* merupakan teknologi alternatif yang dapat diterapkan untuk menghindari kepunahan tanaman purwoceng. Menurut Leunufna (2004), konservasi *in vitro* sebagai koleksi aktif dapat diterapkan dengan menggunakan teknik pertumbuhan minimal untuk penyimpanan jangka menengah. Untuk penyimpanan jangka panjang dapat diterapkan teknik kriopreservasi (Roostika dan Mariska 2004).

Menurut Grout (1995), teknik kriopreservasi merupakan teknik penyimpanan bahan tanaman dalam suhu yang sangat rendah, yaitu -160 hingga -180°C (nitrogen fase uap) bahkan sampai -196°C (nitrogen fase cair). Penyimpanan dengan pembekuan dalam nitrogen cair merupakan metode yang potensial untuk penyimpanan jangka panjang plasma nutfah tumbuhan (Towill dan Jarret 1992). Dengan kriopreservasi, pembelahan sel dan proses metabolisme dalam sel, jaringan atau organ yang disimpan dapat dihentikan sehingga bahan tanaman dapat disimpan tanpa terjadi modifikasi atau perubahan dalam waktu yang tidak terbatas (Ashmore 1997).

Beberapa tahapan dalam penyimpanan secara kriopreservasi adalah perlakuan pratumbuh, prakultur, pemuatan, dehidrasi jaringan, pembekuan, pelelehan, dan pemulihan (Roostika dan Mariska 2004). Jenis tanaman yang telah berhasil disimpan secara kriopreservasi adalah kentang (Hirai dan Sakai 1999a), ubi jalar (Towill dan Jaret 1992), jeruk (Sakai *et al.* 1990), kiwi (Bachiri *et al.* 2001), dan pisang (Panis *et al.* 2000).

Teknik kriopreservasi pada tanaman purwoceng belum pernah dilaporkan. Pada penelitian terdahulu dicoba teknik vitrifikasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemulihan eksplan mengalami hambatan sehingga eksplan tidak mampu membentuk planlet (tanaman yang lengkap). Oleh karena itu, pada penelitian ini diterapkan teknik enkapsulasi-vitrifikasi. Tujuan penelitian adalah untuk mem-

peroleh teknik enkapsulasi-vitrifikasi dengan melakukan optimasi dari tiap-tiap tahapan kriopreservasi yang meliputi perlakuan prakultur, *loading*, dehidrasi sebelum dan setelah pembekuan dalam nitrogen cair.

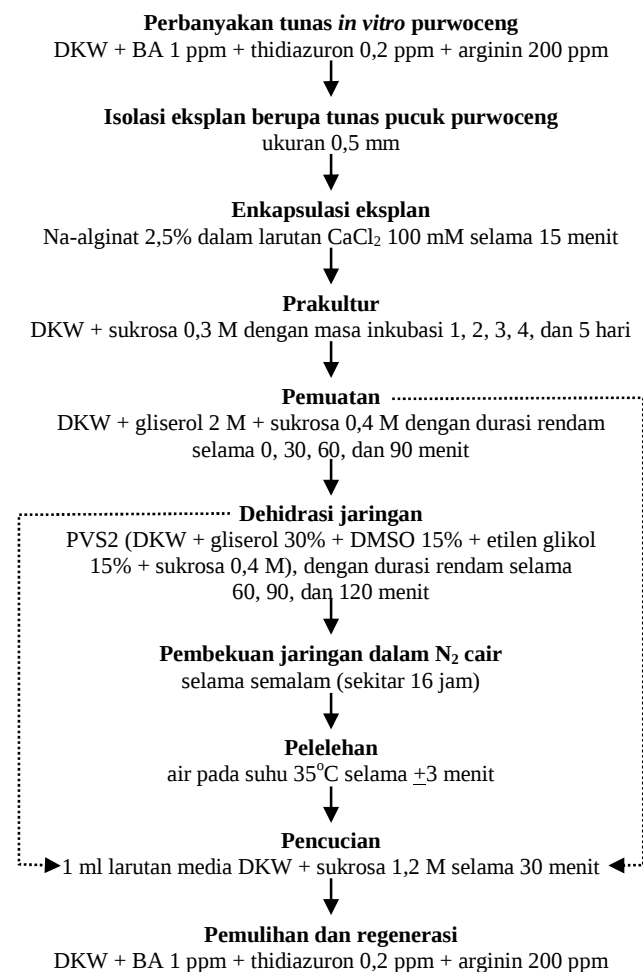
## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB-Biogen), Bogor, pada bulan Januari hingga Desember 2007. Bahan tanaman sebagai sumber eksplan adalah tunas *in vitro* purwoceng yang dipelihara dalam media regenerasi DKW (Driver dan Kuniyaki 1984) + BA 1 ppm + thidiazuron 0,2 ppm + arginin 200 ppm yang disubkultur secara rutin, maksimal setiap dua bulan.

Eksplan yang digunakan berupa tunas pucuk berukuran 5 mm. Tahapan percobaan meliputi perlakuan (1) prakultur, (2) pemuatan, dan (3) dehidrasi dan pembekuan jaringan (Gambar 1). Untuk semua tahapan, respon yang diamati adalah daya tumbuh dan jumlah total daun. Daya tumbuh ditandai oleh pertumbuhan tunas, pembentukan daun, akar atau struktur kalus. Daya tumbuh dihitung dengan membagi jumlah eksplan yang mampu tumbuh terhadap jumlah total eksplan yang bertahan hidup, dikalikan 100%. Data ditampilkan dalam bentuk rata-rata dan standar deviasi.

### Perlakuan Prakultur

Pertama kali tunas *in vitro* diprakultur dalam media DKW + sukrosa 0,3 selama masa inkubasi 1, 2, 3, 4, dan 5 hari pada kondisi gelap dengan suhu 9°C di dalam *growth chamber*. Setelah itu, tunas pucuk berukuran 5 mm dienkapsulasi dengan Na-alginat 2,5% yang mengandung media regenerasi yang direndam dalam CaCl<sub>2</sub> 100 ppm selama 15 menit. Pembilasan menggunakan akuades steril, kemudian eksplan diletakkan dalam media semisolid yang berisi formulasi media regenerasi. Setiap perlakuan terdiri atas lima eksplan. Perlakuan yang terbaik akan diterapkan pada tahap percobaan berikutnya.



Gambar 1. Diagram alir percobaan kriopreservasi tunas purwoceng dengan teknik enkapsulasi-vitrifikasi.

### Perlakuan Pemuatan

Eksplan yang sudah diprakultur direndam dalam larutan pemuatan atau *loading solution* (LS) selama 0, 30, 60, dan 90 menit. Larutan LS merupakan media DKW + gliserol 2 M + sukrosa 0,4 M. Setelah itu, eksplan dicuci dengan larutan media DKW + sukrosa 1,2 M selama 30 menit sebelum dipindahkan ke media pemulihan. Sebelum dan sesudah perlakuan pemuatan, kultur diinkubasikan pada suhu 20°C dan fotoperiodisitas 16 jam terang dengan intensitas cahaya 800-1000 lux. Perlakuan kontrol adalah eksplan yang diprakultur tanpa direndam dalam larutan LS. Setiap perlakuan diulang tiga kali dan setiap ulangan terdiri atas lima eksplan. Perlakuan yang terbaik akan diterapkan pada tahapan penelitian berikutnya.

### Perlakuan Dehidrasi dan Pembekuan Jaringan

Setelah perlakuan prakultur dan pemuatan, eksplan didehidrasi dalam larutan krioprotektan PVS2 menurut Sakai (1993) selama 60, 90, dan 120 menit. Setelah itu eksplan direndam dalam N<sub>2</sub> cair, minimal selama semalam (sekitar 16 jam). Sebelum ditanam ke media pemulihan/regenerasi, eksplan yang beku dilelehkan secara cepat dalam wadah yang berisi air hangat dengan suhu 35°C selama sekitar 3 menit dan kemudian eksplan dicuci dengan larutan DKW + sukrosa 1,2 M selama 30 menit. Setelah tahapan kriopreservasi lengkap dilakukan, eksplan diinkubasikan pada suhu 20°C dalam keadaan gelap selama dua minggu. Setelah itu, kultur diinkubasikan pada kondisi fotoperiodisitas 16 jam terang dengan intensitas cahaya 800-1000 lux. Sebagai perlakuan kontrol adalah kultur yang hanya direndam dalam larutan krioprotektan untuk dehidrasi, tetapi tidak direndam dalam nitrogen cair. Setiap perlakuan diulang minimal tiga kali dan setiap ulangan terdiri atas lima eksplan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

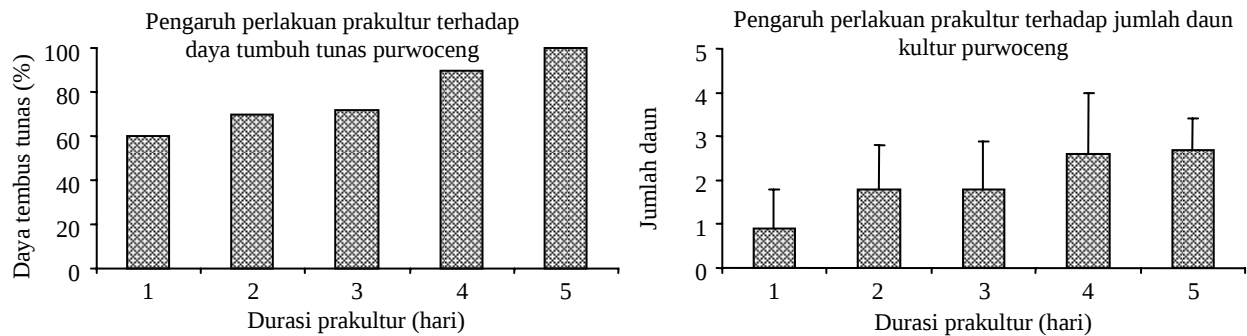
### Perlakuan Prakultur

Perlakuan prakultur adalah tahapan awal yang turut mendukung keberhasilan penyimpanan secara kriopreservasi. Tahapan ini ditujukan untuk memberikan kesempatan bagi sel agar dapat meningkatkan fleksibilitas membran sel. Fleksibilitas membran sel berperan penting dalam proses dehidrasi cairan dalam sel supaya tidak terjadi plasmolisis yang tidak dapat balik (*irreversible*). Menurut Gnanapragasan dan Vasil (1992), prakultur sel dapat menyebabkan penurunan volume vakuola, yaitu dengan cara redistribusi vakuola sentral yang besar menjadi sejumlah vesikel yang lebih kecil. Dengan demikian, pada saat pembekuan jaringan, kristalisasi cairan dalam sel dapat dihindari sehingga proses pembekuan tidak akan menyebabkan sel mengalami luka yang serius. Luka yang serius tidak diharapkan terjadi karena akan mempersulit sel dalam proses pemulihan atau bahkan dapat menyebabkan kematian sel.

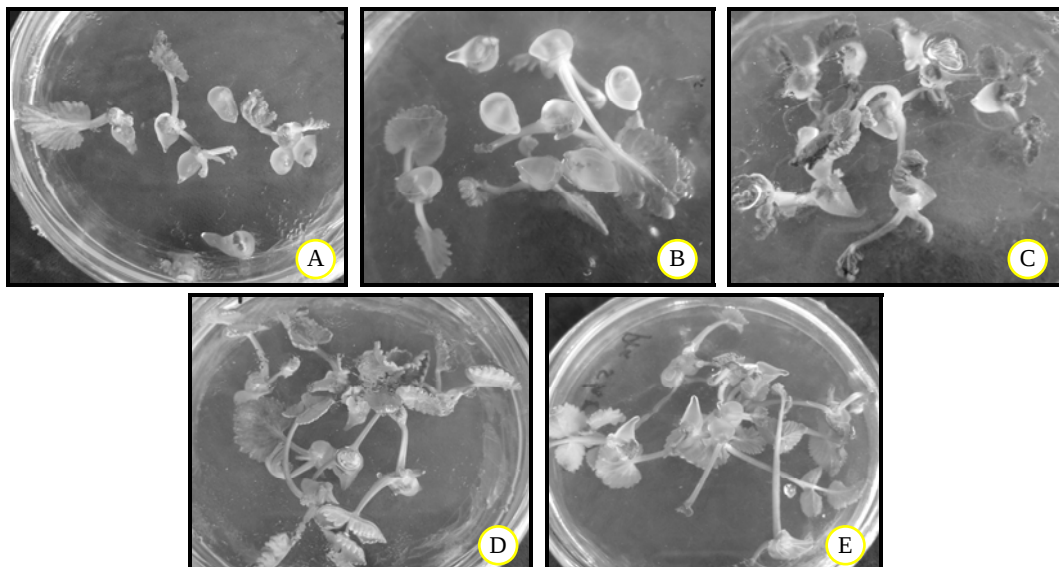
Dari percobaan prakultur dengan sukrosa 0,3 M diperoleh informasi bahwa semakin lama masa inkubasi semakin tinggi tingkat pertumbuhan tunas purwoceng yang terenkapsulasi (Gambar 2). Selain itu, semakin lama durasi prakultur semakin tebal jaringan dan semakin pesat pertumbuhannya (Gambar 3). Hal ini dimungkinkan karena tunas yang terenkapsulasi mengalami penghambatan dalam penyerapan hara dan respirasi, sehingga media dengan kandungan sumber karbon yang tinggi lebih mendukung pertumbuhan kultur. Menurut Da Silva (2004), sukrosa merupakan salah satu jenis gula yang siap dimetabolismekan selain glukosa dan fuktosa. Jenis gula demikian akan lebih mudah diuraikan dalam sel tanaman sehingga sangat mendukung pertumbuhan kultur.

### Perlakuan Pemuatan

Selain perlakuan prakultur, perlakuan pemuatan juga berperan dalam menentukan keberhasilan kriopreservasi. Pada kondisi tersebut, sel diperlakukan dengan larutan yang molaritasnya lebih tinggi daripada perlakuan prakultur untuk mengadaptasikan sel atau jaringan pada larutan dengan molaritas yang lebih tinggi pada tahapan berikutnya, yaitu larutan krioprotektan. Pada tahap ini, jaringan diperlakukan dengan gliserol dan sukrosa dengan molaritas yang lebih tinggi daripada perlakuan prakultur. Kedua komponen tersebut merupakan komponen yang terkandung dalam larutan krioprotektan yang akan digunakan pada tahap dehidrasi. Kondisi tersebut memberikan kesempatan bagi sel



Gambar 2. Pengaruh perlakuan prakultur pada media DKW + sukrosa 0,3 M terhadap persentase daya tumbuh tunas dan jumlah total daun dari eksplan purwoceng yang terenkapsulasi, 4 minggu setelah tanam.



Gambar 3. Penampilan kultur purwoceng setelah perlakuan prakultur pada media DKW + sukrosa 0,3 M pada masa inkubasi tertentu. A = 1 hari, B = 2 hari, C = 3 hari, D = 4 hari, E = 5 hari.

untuk meningkatkan fleksibilitas membran dan proses dehidrasi berjalan secara perlahan-lahan sehingga sel tidak akan pecah.

Perendaman jaringan dalam larutan LS efektif meningkatkan osmotoleransi jaringan pada beberapa macam tanaman seperti talas (Takagi *et al.* 1997), kentang (Hirai dan Sakai 1999a), mentha (Hirai dan Sakai 1999b), dan wasabi (Matsumoto *et al.* 1994). Dari percobaan pemuatan, diketahui bahwa semakin lama durasi rendam dalam larutan LS maka semakin turun tingkat pertumbuhan tunas purwoceng yang terenkapsulasi (Gambar 4). Perlakuan terbaik berasal dari durasi rendam 30 menit karena menghasilkan daya tumbuh yang tinggi (di atas 80%) dan dengan jumlah total daun yang lebih banyak. Dengan demikian, perlakuan pemuatan selama 30 menit dipilih untuk diterapkan pada tahap selanjutnya, yaitu dehidrasi jaringan.

### Perlakuan Dehidrasi dan Pembekuan Jaringan

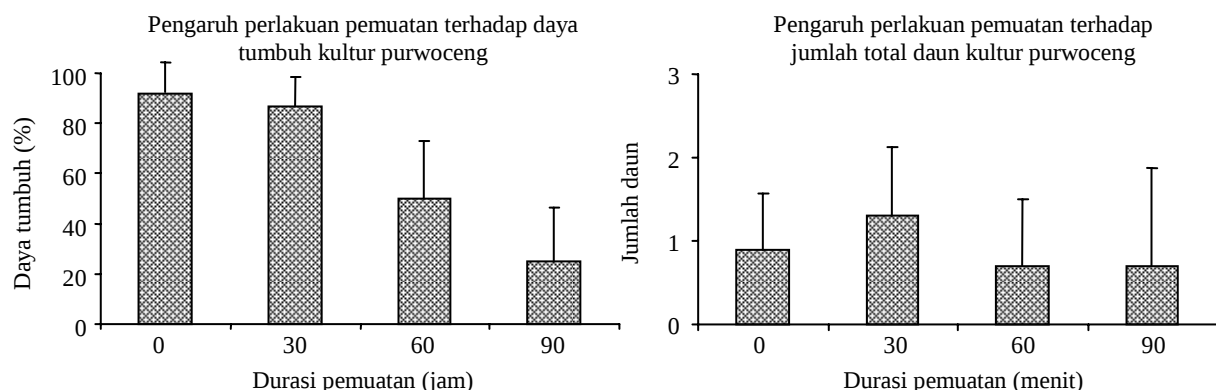
Untuk melindungi jaringan tanaman dari pengaruh negatif pada saat pembekuan diperlukan kondisi sel yang mengalami dehidrasi. Penggunaan krioprotektan dapat memelihara keutuhan membran dengan cara meningkatkan potensial osmotik media, sehingga cairan di dalam sel mengalir keluar dan terjadi dehidrasi. Kondisi dehidrasi yang optimal dapat dicapai dengan menggunakan larutan krioprotektan pada jenis, konsentrasi, dan lama perendaman yang sesuai.

Pada tahap dehidrasi, jaringan tunas yang terenkapsulasi tampak mengalami stres osmotik kare-

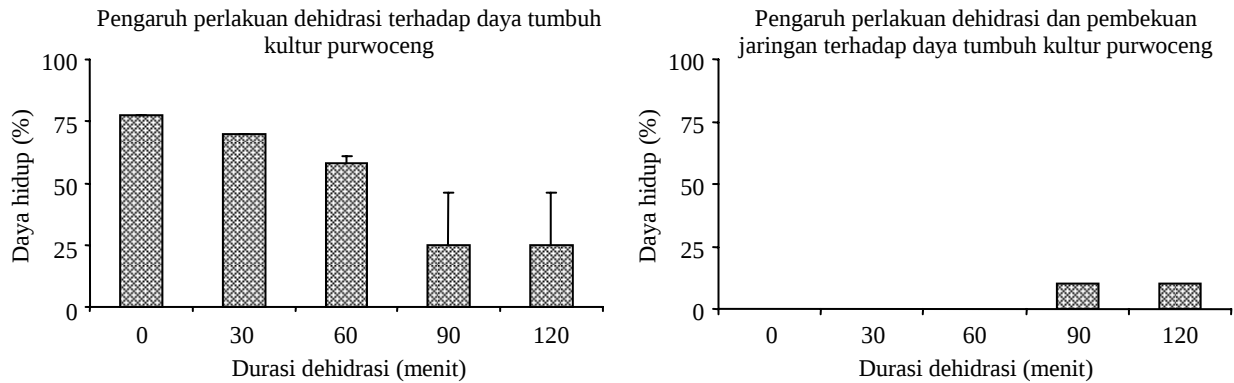
na tingkat pertumbuhannya menurun. Semakin lama durasi dehidrasi dalam larutan krioprotektan PVS2 semakin turun tingkat pertumbuhan kultur. Sebagaimana diketahui bahwa plasmolisis dapat terjadi pada lingkungan dengan molaritas yang tinggi, dan durasi yang lebih lama akan memperparah tingkat plasmolisis sel. Menurut Towill (1991) dalam Reinhoud *et al.* (2000), sel yang terdehidrasi terlalu kuat dapat menyebabkan plasmolisis yang kuat pula sehingga berakibat terhadap perubahan pH, interaksi makromolekuler, dan peningkatan konsentrasi zat elektrolit.

Dalam percobaan ini, durasi rendam 30 menit memberikan daya hidup yang paling tinggi pada tahap dehidrasi jaringan sebelum pembekuan dalam nitrogen cair. Namun setelah tindakan pembekuan jaringan ke dalam nitrogen cair ternyata eksplan tidak mampu bertahan hidup. Penurunan daya hidup kultur juga terjadi pada perlakuan dehidrasi lainnya. Hasil percobaan ini menunjukkan bahwa durasi rendam yang lama (90 dan 120 menit) memberikan kesempatan hidup yang masih rendah, yaitu 10%. Perlakuan lainnya tidak mampu mempertahankan daya hidup kultur (Gambar 5). Penampilan eksplan yang pulih setelah perlakuan dehidrasi dalam larutan PVS2 ditampilkan pada Gambar 6.

Kegagalan hidup eksplan dari perlakuan dehidrasi 0, 30, dan 60 menit setelah pembekuan jaringan diduga karena jaringan kurang mengalami dehidrasi sehingga sel-sel dalam jaringan masih banyak mengandung air yang menjadi pemicu terjadinya formasi es baik intra maupun ekstraseluler. Formasi es intraseluler mutlak bersifat lethal sedangkan for-



Gambar 4. Pengaruh perlakuan pemuatan terhadap persentase daya tumbuh dan jumlah total daun tunas purwoceng yang terenkapsulasi, 4 minggu setelah tanam.



Gambar 5. Pengaruh perlakuan dehidrasi jaringan sebelum dan sesudah pembekuan dalam nitrogen cair ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) terhadap persentase daya tumbuh tunas purwoceng yang terenkapsulasi, 4 minggu setelah tanam.



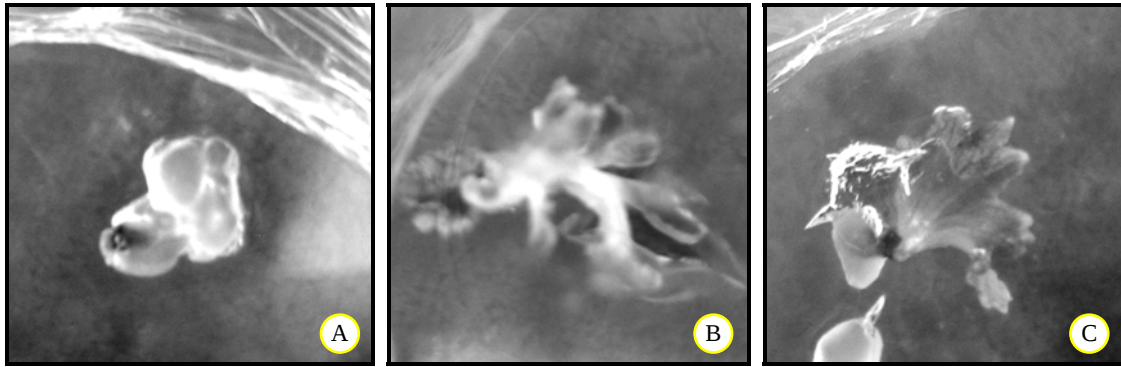
Gambar 6. Penampilan kultur purwoceng setelah perlakuan dehidrasi dengan larutan PVS2 pada beberapa durasi rendam. A = 60 menit, B = 90 menit, C = 120 menit.

masi es ekstraseluler juga dapat merusak sel karena daya mekanis dari kristal es yang tumbuh, gaya adesi kristal es terhadap membran, interaksi elektrik yang disebabkan oleh perbedaan solubilitas ion pada fase es dan cair, formasi gelembung udara intraseluler, luka khemis yang berhubungan dengan peroksidase lipid dan perubahan pH pada lokasi tertentu (Grout 1995).

Turunnya kemampuan hidup dari perlakuan dehidrasi 90 dan 120 menit setelah pembekuan jaringan diduga karena pengaruh pada saat pelelehan. Pelelehan dilakukan secara cepat dari suhu yang ekstra rendah ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) ke suhu yang tinggi tetapi tidak mematikan jaringan secara fisiologis ( $35^{\circ}\text{C}$ ). Pada pelelehan yang cepat, suhu  $0^{\circ}\text{C}$  (yang merupakan titik beku air) diupayakan tidak akan bertahan lama sehingga kristalisasi air atau terbentuknya formasi es dapat dihindarkan dengan cepatnya peningkatan suhu pada saat pelelehan. Namun kontraksi

osmotik pada saat pelelehan dapat menyebabkan vesikulasi endositotik yang *irreversible* yang dapat mengakibatkan sel menjadi lisis, karena bahan membran yang baru tidak mampu memfasilitasi deplasmolisis (Steponkus 1984 dalam Reinhoud *et al.* 2000).

Jaringan yang tidak pulih setelah pembekuan dalam nitrogen cair ditandai oleh pudarnya warna hijau dan coklat pada eksplan. Jaringan yang pulih dan tumbuh diawali dengan munculnya warna hijau dari bagian meristem yang menandakan pertumbuhan meristem pucuk. Penampilan eksplan setelah pembekuan jaringan ditampilkan pada Gambar 7. Kecepatan tumbuh eksplan dari perlakuan dehidrasi 90 menit lebih tinggi daripada perlakuan dehidrasi 120 menit. Diduga perlakuan dehidrasi yang lebih lama akan menyebabkan pemulihan yang lebih lama pula karena tingkat stres dehidrasinya lebih tinggi.



Gambar 7. Penampilan kultur purwoceng yang tidak pulih dan yang berhasil tumbuh setelah tahapan lengkap kriopreservasi. A = mati, B = 90 menit, C = 120 menit.

## KESIMPULAN DAN SARAN

Kriopreservasi secara enkapsulasi-vitrifikasi berpeluang diterapkan pada tanaman purwoceng. Perlakuan prakultur terbaik adalah selama 5 hari dan perlakuan pemuatan terbaik selama 30 menit. Perlakuan dehidrasi terbaik adalah 90 menit. Tingkat keberhasilan teknik ini masih rendah (10%) sehingga perlu dikembangkan lebih lanjut untuk meningkatkan keberhasilannya. Disarankan untuk menerapkan perlakuan pratumbuh sebelum tahapan prakultur. Selain itu, penggunaan jenis eksplan lainnya, seperti kalus embriogenik juga disarankan untuk dicoba.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ashmore, S.E. 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. IPGRI, Queensland, Australia. 67 p.
- Bachiri, Y., G.Q. Song, P. Plessis, A. Shoar-Ghaffari, T. Rekab, and C. Morisset. 2001. Routine cryopreservation of kiwifruit (*Actinidia* spp.) germplasm by encapsulation-dehydration: Importance of plant growth regulators. *CryoLetters* 22:61-74.
- Da Silva, J.A.T. 2004. The effect of carbon source on *in vitro* organogenesis *Chrysanthemum* thin cell layers. *Bragantia*, Campinas 63(2):165-177.
- Driver, J.A. and A.H. Kuniyuki. 1984. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. *Hort. Science* 19(4):507-509.
- Gnanapragasam, S. and I.K. Vasil. 1992. Cryopreservation of immature embryos, embryonic callus and cell suspension cultures of Gramineous species. *Plant Science* 83:205-215.
- 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*. Springer Lab Manual. Berlin-Heidelberg. p. 1-17.
- Hirai, D. and A. Sakai. 1999a. Cryopreservation of *in vitro* grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. *Potato Research* 42:153-160.
- Hirai, D. and A. Sakai. 1999b. Cryopreservation of *in vitro* grown axillary shoot tip meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation-vitrification. *Plant Cell Report* 19:150-155.
- Leunufna, S. 2004. Improvement of the *in vitro* maintenance and cryopreservation of yams (*Dioscorea* spp.). Martin-Luther-Universitat Halle-Wittenberg, Berlin. 120 p.
- Matsumoto, T., A. Sakai, and K. Yamada. 1994. Cryopreservation of *in vitro* grown apical meristems of wasabi (*Wasabi japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. *Plant Cell Report* 13:442-446.
- Panis, B., H. Schoofs, S. Remy, L. Sagi, and R. Swennen. 2000. Cryopreservation of banana embryogenic cell suspensions: An aid for genetic transformation. In Engelmann, F. and H. Takagi (Eds.). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*. IPGRI. Rome-Italy. p. 103-109.
- Rahardjo, M. 2003. Purwoceng tanaman obat aprodisiak yang langka. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri* 9(2):4-7.
- Reinoud, P.J., F.V. Iren, and J.W. Kijne. 2000. Cryopreservation of undifferentiated plant cells. In Engelmann, F. and H. Takagi (Eds.). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*. IPGRI. Rome-Italy. p. 91-102.

- Rifai, M.A., Rugayah, and E.A. Widjaja. 1992. Thirty years of the eroded species medicinal crops. *Floribunda* 28.
- Roostika, I. dan I. Mariska. 2004. Pemanfaatan teknik kriopreservasi dalam penyimpanan plasma nutfah tanaman. *Buletin Plasma Nutfah* 9(2):10-18.
- Sakai, A., S. Kobayashi, and I. Oiyama. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var *Brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Report* 9:30-33.
- Sakai, A. 1993. Cryogenic strategies for survival of plant culture cells and meristem cooled to -196°C. *In* Sakai, A. (Ed.). *Cryopreservation of Plant Genetic Resources*. Japan International Cooperation Agency. p. 5-26.
- Syahid, S.F., O. Rostiana, and M. Rohmah. 2004. Pengaruh NAA dan IBA terhadap perakaran purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk.) *in vitro*. Prosiding Seminar Indonesian Biopharmaca Exhibition and Conference. Yogyakarta.
- Takagi, H., N.T. Thinh, O.M. Isulam, T. Senboku, and A. Sakai. 1997. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) by vitrification. *Plant Cell Report* 16:594-599.
- Towill, L.E. and R.L. Jarret. 1992. Cryopreservation of sweet potato (*Ipomea batatas* (L.) Lam.) shoot tips by vitrification. *Plant Cell Report* 11:175-178.