

Pengaruh Jenis dan Lama Perendaman Krioprotektan Terhadap Viabilitas Benih Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) Secara Kriopreservasi

Effects of Type and Duration of Soaking Cryoprotectant on the Viability of Roselle Seed (*Hibiscus sabdariffa* L.) In Cryopreservation

Ahmad Afandy Harahap, Haryati*, Luthfi A. M. Siregar

Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, USU, Medan 20155

*Corresponding author: atie.koto@yahoo.co.id

ABSTRACT

Cryopreservation is a technique for long-term storage of plant plasma. In this technique cells and meristem or other parts of plants were frozen and stored in liquid nitrogen at a temperature -196°C . The objective of the research was to know effects of type and duration of soaking cryoprotectant on the viability of roselle seed in cryopreservation. This research was conducted at the Laboratory of Seed Technology Faculty of Agriculture, University of North Sumatra, Medan with a height ± 25 meters above sea level, from September to October 2014, using a randomized block design with 2 factors. The first factor is the type of cryoprotectant with 4 types of PVS1 ; PVS2; PVS3; PVS4 and the second factor of soaking cryoprotectant with 3 levels of 60 minutes; 90 minutes; 120 minutes. Parameters observed were the rate of germination (day), normal seedling (%), abnormal seedling (%), seeds die (%), vigor index, fresh weight of seedling (g), dry weight of seedling (g). The results showed soaking treatment of various types of cryoprotectant significant effect on the observation parameters the rate of germination (day), normal seedling (%), vigor index, fresh weight of seedling (g) and dry weight of seedling (g). Treatment of soaking cryoprotectant significant effect on the observation parameters abnormal seedling (%) and vigor index. Interaction type and duration of soaking cryoprotectant significant effect on observation parameters on the rate of germination (day) and vigor index.

Keywords: cryoprotectant, soaking time, cryopreservation, roselle seed

ABSTRAK

Kriopreservasi merupakan teknik penyimpanan plasma tumbuhan jangka panjang. Dalam teknik ini sel-sel dan meristem ataupun bagian lain dari tanaman dibekukan dan disimpan dalam nitrogen cair pada suhu -196°C . Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh jenis dan lama perendaman krioprotektan terhadap viabilitas benih rosella secara kriopreservasi. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Benih Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara Medan dengan ketinggian ± 25 meter dpl, dari bulan September sampai Oktober 2014, menggunakan rancangan acak kelompok dengan 2 faktor perlakuan. Faktor pertama adalah jenis krioprotektan dengan 4 jenis yaitu PVS1; PVS2; PVS3; PVS4 dan faktor kedua lama perendaman dengan krioprotektan 3 taraf yaitu 60 menit; 90 menit; 120 menit. Parameter pengamatan adalah laju perkecambah (hari), kecambah normal (%), kecambah abnormal (%), benih mati (%), indeks vigor, bobot basah kecambah (g), bobot kering kecambah (g). Hasil penelitian menunjukkan perlakuan perendaman berbagai jenis krioprotektan berpengaruh nyata terhadap parameter pengamatan laju perkecambah (hari), kecambah normal (%), indeks vigor, bobot segar kecambah (g) dan bobot kering kecambah (g). Perlakuan lama perendaman krioprotektan berpengaruh nyata terhadap parameter pengamatan kecambah abnormal (%) dan indeks vigor. Interaksi jenis dan lama perendaman krioprotektan berpengaruh nyata terhadap parameter pengamatan laju perkecambah (hari) dan indeks vigor.

Kata kunci : krioprotektan, lama perendaman, kriopreservasi, benih rosella

PENDAHULUAN

Penggunaan obat tradisional sampai sekarang semakin luas di kalangan masyarakat karena merupakan bagian dari kebudayaan bangsa Indonesia. Obat tradisional yang sekarang banyak dikonsumsi di masyarakat adalah bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.). Penggunaan bunga rosella di masyarakat dengan cara diseduh dengan air panas. Di masyarakat bunga rosella digunakan sebagai diuretik (melancarkan air seni), memperlancar buang air besar (menstimulasi gerak peristaltik), menurunkan panas dan antibakteri (Rostinawati, 2009).

Maksud dari penyimpanan benih ialah agar benih dapat ditanam pada musim yang sama di lain tahun atau pada musim yang berlainan dalam tahun yang sama, atau untuk tujuan pelestarian benih dari suatu jenis tanaman. Untuk maksud - maksud ini diperlukan suatu periode simpan dari hanya beberapa hari, semusim, setahun bahkan sampai beberapa puluh tahun bila ditujukan untuk pelestarian jenis (Sutopo, 2012).

Suhu penyimpanan benih terdiri dari dua bagian yaitu suhu di atas titik beku dan suhu dibawah titik beku. Semakin rendah suhu penyimpanan, semakin lambat penurunan daya hidup benih. Suhu optimum untuk penyimpanan benih tertentu jangka panjang terletak antara -18° - 0° C, walaupun banyak yang berpendapat bahwa penyimpanan pada suhu tersebut adalah jangka menengah, sedangkan untuk jangka panjang adalah pada suhu -196° C (Fitriyatmi, 1996).

Benih akan mengalami kecepatan kemundurannya tergantung dari faktor-faktor kelembaban relatif udara dan suhu. Hal ini dapat dikaitkan dengan hasil penelitian yang selanjutnya patokannya sebagai berikut: (a) bagi tiap terjadinya penurunan 1% pada kadar air benih, umur benih akan bertahan sampai 2 kali; (b) bagi tiap terjadinya penurunan 5° C suhu dalam penyimpanannya, umur benih akan bertahan sampai 2 kali (Kartasapoetra, 2003).

Pembekuan merupakan metode penyimpanan yang sangat penting dalam dunia kedokteran dan industri. Material biologi seperti sperma, sel telur, makanan dan

lainnya yang tersusun atas sel-sel hidup, akan mengalami perubahan dan kerusakan seiring dengan berjalannya waktu penyimpanan. Akan sangat bermanfaat sekali apabila kita bisa menyimpannya dalam waktu yang lama sehingga dapat digunakan setiap saat diperlukan. Dalam beberapa kondisi, metode pembekuan telah menjadi metode yang efektif dalam menyimpan berbagai macam material biologi. Meski demikian, pembekuan sering mengakibatkan kerusakan yang bersifat irreversibel pada sel. Oleh karena itu, cara menjaga agar sel tetap hidup atau tidak rusak selama proses pembekuan merupakan tantangan yang harus dihadapi saat ini (Hamidi, 2010).

Kriopreservasi merupakan teknik yang potensial untuk penyimpanan plasma nuftah jangka panjang dan juga teknik penyimpanan untuk jangka waktu yang lama. Dalam teknik ini sel-sel dan meristem ataupun bagian lain dari tanaman dibekukan dan disimpan pada kondisi yang terkontrol dalam nitrogen cair pada suhu -196° C. Pada suhu nitrogen cair, sel-sel mempunyai sedikit atau bahkan sama sekali tidak mempunyai aktivitas metabolisme dengan viabilitas sel yang tetap terpelihara, sehingga bahan tanaman dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama (Roostika, dkk., 2004).

Penggunaan krioprotektan diharapkan dapat melindungi benih dari suhu rendah. Konsentrasi krioprotektan pada masing-masing benih berbeda-beda. Penggunaan konsentrasi krioprotektan yang tepat dapat melindungi benih dan menghasilkan daya kecambah benih yang lebih baik (Fitriyatmi, 1996).

Belum adanya informasi yang rinci tentang jenis dan lama perendaman yang optimal dari krioprotektan sebelum disimpan dalam nitrogen cair terhadap viabilitas benih rosella, mendorong penulis ingin mengetahui jenis dan lama perendaman krioprotektan yang optimal terhadap viabilitas benih rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) secara kriopreservasi.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Benih Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara, Medan dengan ketinggian ± 25 meter di atas permukaan laut, dimulai 27 September 2014 sampai dengan 15 Oktober 2014.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah benih rosella sebagai bahan pengamatan perkecambahan, nitrogen cair, gliserol, DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*), propilen glikol, etilen glikol, sukrosa, pasir steril dan aquades. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung nitrogen, bak kecambah, meteran, cawan petri, cawan almunium, botol plastik ukuran (diameter 3 cm, tinggi 2 cm), solder, spidol permanen, wadah plastik, *canester*, timbangan analitik, *beaker glass*, botol reagen, corong, gelas ukur, labu ukur, batang pengaduk, mortar dan penumbuk, pinset, oven, *handsprayer*, gunting, label, ember, pisau, plakat nama, alat tulis dan kalkulator.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 2 faktor perlakuan dan 3 ulangan yaitu :

Faktor I Jenis krioprotektan (J) yang terdiri dari 4 jenis, yaitu :

J₁ : PVS1 (gliserol 22% + propilen glikol 13% + etilen glikol 13% +DMSO 6% dalam media dasar dengan sukrosa 3%)

J₂ : PVS2 (gliserol 30% + etilen glikol 15% + DMSO 15% dalam media dasar dengan sukrosa 0,4 M)

J₃ : PVS3 (gliserol 50% dalam media dasar dengan sukrosa 50%)

J₄ : PVS4 (gliserol 35% + etilen glikol 20% dalam media dasar dengan sukrosa 0,6 M)

Faktor II Lama perendaman krioprotektan (K) yang terdiri dari 3 taraf, yaitu; K₁ : 60 menit, K₂ : 90 menit, K₃ : 120 menit .

Data hasil penelitian pada perlakuan yang berpengaruh nyata dilanjutkan dengan uji beda rata-rata yaitu uji Jarak Berganda Duncan dengan taraf 5 %.

Pelaksanaan penelitian yang dilakukan ialah persiapan benih, persiapan media perkecambahan, pengujian daya kecambah benih, aplikasi perlakuan, imbibisi benih, pengecambahan benih, pemeliharaan tanaman.

Parameter yang diamati adalah laju perkecambahan (hari), kecambah normal (%), kecambah abnormal (%), benih mati (%), indeks vigor, bobot segar kecambah (g), bobot kering kecambah (g).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil sidik ragam, diketahui bahwa perlakuan perendaman berbagai jenis krioprotektan berpengaruh nyata terhadap parameter pengamatan laju perkecambahan (hari), kecambah normal (%), indeks vigor, bobot segar kecambah (g) dan bobot kering kecambah (g). Perlakuan lama perendaman krioprotektan berpengaruh nyata terhadap parameter pengamatan kecambah abnormal (%) dan indeks vigor. Interaksi jenis dengan lama perendaman krioprotektan berpengaruh nyata terhadap parameter pengamatan laju perkecambahan (hari) dan indeks vigor.

Laju Perkecambahan (hari)

Tabel 1. Laju perkecambahan pada perlakuan jenis dan lama perendaman krioprotektan

Lama Perendaman	Jenis Krioprotektan				Rataan
	J ₁ (PVS1)	J ₂ (PVS2)	J ₃ (PVS3)	J ₄ (PVS4)	
 hari				
K ₁ (60 menit)	1.48 c	1.55 bc	1.91 ab	1.41 c	1.59
K ₂ (90 menit)	1.79 bc	2.26 a	1.69 bc	1.59 bc	1.83
K ₃ (120 menit)	1.50 bc	1.73 bc	1.78 bc	1.75 bc	1.69
Rataan	1.59	1.84	1.79	1.58	1.70

Keterangan : Angka-angka yang diikuti notasi yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf $\alpha = 5\%$.

Tabel 1 menunjukkan bahwa laju perkecambahan tercepat terdapat pada kombinasi perlakuan perendaman PVS4 selama 60 menit sebesar 1,41 hari yang berbeda nyata dengan perlakuan perendaman PVS2 selama 90 menit dan perendaman PVS3 selama 60 menit, namun berbeda tidak nyata dengan kombinasi perlakuan lainnya. Rataan

laju perkecambahan terlama pada kombinasi perlakuan perendaman PVS2 selama 90 menit sebesar 2,26 hari. Parameter laju perkecambahan benih sangat berpengaruh terhadap parameter indeks vigor benih, semakin cepat benih berkecambah maka semakin baik pula indeks vigornya.

Kecambah Normal, Abnormal dan Benih Mati (%)

Tabel 2. Kecambah normal, abnormal dan benih mati pada perlakuan jenis dan lama perendaman krioprotektan

Lama Perendaman	Jenis Krioprotektan				Rataan
	J ₁ (PVS1)	J ₂ (PVS2)	J ₃ (PVS3)	J ₄ (PVS4)	
Kecambah Normal					
	%				
K ₁ (60 menit)	14.00	18.00	25.33	24.67	20.50
K ₂ (90 menit)	24.67	16.00	26.00	34.00	25.17
K ₃ (120 menit)	22.67	17.33	28.67	32.67	25.33
Rataan	20.44 bc	17.11 c	26.67 ab	30.44 a	23.67
Kecambah Abnormal					
	%				
K ₁ (60 menit)	54.00	55.33	44.00	48.67	50.50 a
K ₂ (90 menit)	44.00	37.33	31.33	34.67	36.83 b
K ₃ (120 menit)	46.67	38.67	40.67	33.33	39.83 b
Rataan	48.22	43.78	38.67	38.89	42.39
Benih Mati					
	%				
K ₁ (60 menit)	32.00	26.67	30.67	26.67	29.00
K ₂ (90 menit)	31.33	46.67	42.67	31.33	38.00
K ₃ (120 menit)	30.67	42.67	30.67	34.00	34.50
Rataan	31.33	38.67	34.67	30.67	33.83

Keterangan : Angka-angka yang diikuti notasi yang sama pada kolom dan baris di masing masing tabel menunjukkan tidak berbeda nyata menurut Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf $\alpha = 5\%$.

Tabel 3 menunjukkan bahwa kecambah normal tertinggi pada berbagai jenis perendaman krioprotektan terdapat pada perlakuan PVS4 sebesar 30,44 % dan terendah pada perlakuan PVS2 sebesar 17,11 %. Pada perlakuan perendaman krioprotektan PVS2 selama 120 menit kecambah normal sebesar 17,33 % (Tabel 3.). Suhendra, *dkk.* (2014) memperoleh persentase kecambah normal benih rosella sebesar 79,33 % pada penggunaan krioprotektan PVS2 dengan lama perendaman selama 120 menit. Penggunaan

krioprotektan dalam proses kriopreservasi merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan kriopreservasi. Secara umum, tipe dan keadaan fisiologis bahan juga menentukan keberhasilan kriopreservasi.

Kecambah abnormal yang tertinggi terdapat pada lama perendaman 60 menit sebesar 50,50 % dan terendah pada 90 menit sebesar 36,83 % (Tabel 3). Perendaman selama 60 menit kurang optimal dalam penyerapan krioprotektan intraseluler. Suhendra, *dkk.* (2014) melakukan

perendaman krioprotektan PVS2 selama 120 menit pada benih rosella menghasilkan kecambah abnormal sebesar 19,33 %.

Justice dan Bass (1994) menyatakan bahwa bila benih dikeringkan hingga kadar air 5 % atau lebih rendah, maka benih akan lebih mudah mengalami berbagai kerusakan, Toole dan Toole (1946) melaporkan adanya peningkatan jumlah kecambah kedelai abnormal yang ditanam dari benih berkadar air sekitar 5 % yang telah disimpan selama tiga bulan. Abnormalitasnya terutama berupa retak-retak yang dalam di sekitar kotiledon, sehingga terganggu penggunaan cadangan makanan benihnya. Roberts (1959) mendapatkan bahwa benih *timothy* lebih mampu mempertahankan viabilitas sewaktu disimpan bila kadar airnya diturunkan sampai sekitar 7 %, tetapi apabila disimpan berkadar air 5 % maka viabilitasnya menurun.

Roostika dan Mariska (2003) menyatakan bahwa selama pembekuan dan pelelehan, sel dapat mengalami kerusakan sebagai akibat dari eksponur bahan tanaman pada suhu rendah, formasi kristal es, sel terdehidrasi, dan formasi radikal bebas. Eksponur pada suhu rendah dapat menyebabkan inaktivasi protein yang sensitif terhadap suhu dingin. Sebagian besar formasi es ekstraselular. Namun demikian, formasi es ekstraselular 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 intraselular,

luka khemis yang berhubungan dengan peroksidase lipid dan perubahan pH pada lokasi tertentu. Untuk melindungi tanaman dari pengaruh negatif pada saat pembekuan diperlukan kondisi sel yang mengalami dehidrasi. Kondisi dehidrasi yang optimal dapat dicapai dengan menggunakan larutan krioprotektan pada jenis, konsentrasi, dan lama perendaman yang sesuai.

Windiasatika, (2013) menambahkan bahwa sel yang terdehidrasi terlalu kuat dapat mengalami plasmolisis yang kuat pula sehingga berakibat terhadap perubahan pH, interaksi mikromolekuler, dan peningkatan konsentrasi zat elektrolit. Pada saat pelelehan, kontraksi osmotik dapat menyebabkan endositotik vesikulasi irreversibel yang mengakibatkan sel lisis karena bahan membran yang baru tidak mampu memfasilitasi deplasmolisis. Formasi radikal bebas juga dapat menyebabkan kerusakan sel. Radikal bebas yang dapat terbentuk misalnya radikal hidroksil (OH), superoksida (O₂), dan hidrogen peroksida (H₂O₂). Radikal bebas dapat merusak fraksi lipid pada membran dan menghasilkan lipid peroksida dan selanjutnya terurai menjadi senyawa produk oksidasi sekunder yang toksik.

Tabel 3 menunjukkan benih mati tertinggi perendaman berbagai jenis krioprotektan terdapat pada perlakuan J₂ sebesar 38,67 % dan terendah pada perlakuan J₄ sebesar 30,67 %. Rataan lama perendaman krioprotektan tertinggi terdapat pada perlakuan K₂ sebesar 38,00 % dan terendah pada perlakuan K₁ sebesar 29,00 %.

Indeks Vigor

Tabel 3. Indeks Vigor pada perlakuan jenis dan lama perendaman krioprotektan

Lama Perendaman	Jenis Krioprotektan				Rataan
	J ₁ (PVS1)	J ₂ (PVS2)	J ₃ (PVS3)	J ₄ (PVS4)	
K ₁ (60 menit)	26.75 ab	27.14 ab	21.24 bc	31.35 a	26.62
K ₂ (90 menit)	22.73 bc	13.62 d	21.99 bc	25.08 abc	20.86
K ₃ (120 menit)	26.91 ab	19.22 cd	19.77 cd	22.96 bc	22.21
Rataan	25.46	19.99	21.00	26.46	23.23

Keterangan : Angka-angka yang diikuti notasi yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf $\alpha = 5\%$.

Tabel 3 menunjukkan bahwa indeks vigor tertinggi terdapat pada kombinasi perlakuan perendaman PVS4 selama 60 menit sebesar 31,35 dan terendah terdapat pada kombinasi perlakuan PVS2 selama 90 menit sebesar 13,62.

Pada kombinasi perlakuan perendaman PVS4 selama 60 menit sebesar 31,35 menunjukkan bahwa perlakuan ini lebih baik dibandingkan kombinasi perlakuan lainnya serta sesuai dengan parameter laju perkecambahan dengan hasil laju perkecambahan yang tercepat sebesar 1,41 hari (Tabel 1). Fitriyatmi (1996) menyatakan bahwa konsentrasi krioprotektan yang

dibutuhkan benih berbeda-beda. Dengan demikian, penggunaan konsentrasi krioprotektan yang tepat dapat melindungi benih dan menghasilkan daya berkecambah benih yang lebih baik. Vigor benih sewaktu disimpan merupakan faktor penting yang mempengaruhi umur simpannya. Vigor benih merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi viabilitas benih di tempat penyimpanan. Justice dan Bass (1994) menyatakan menurunnya vigor dan kematian benih dapat dilihat dari dua aspek yakni: (1) dari hilangnya viabilitas atau matinya sekelompok benih, atau (2) dari kematian suatu individu benih.

Bobot Segar Kecambah dan Bobot Kering Kecambah (g)

Tabel 4. Bobot segar kecambah dan bobot kering kecambah pada perlakuan jenis dan lama perendaman krioprotektan

Lama Perendaman	Jenis Krioprotektan				Rataan
	J ₁ (PVS1)	J ₂ (PVS2)	J ₃ (PVS3)	J ₄ (PVS4)	
Bobot Segar Kecambah					
	g.....				
K ₁ (60 menit)	3.39	3.48	5.34	5.28	4.37
K ₂ (90 menit)	5.58	2.84	5.26	8.29	5.49
K ₃ (120 menit)	4.80	3.99	5.96	7.34	5.52
Rataan	4.59 b	3.44 b	5.52 ab	6.97 a	5.13
Bobot Kering Kecambah					
	g.....				
K ₁ (60 menit)	0.57	0.60	0.87	0.96	0.75
K ₂ (90 menit)	1.17	0.57	0.93	1.18	0.96
K ₃ (120 menit)	0.94	0.64	0.98	1.17	0.93
Rataan	0.89 ab	0.60 b	0.93 ab	1.10 a	0.88

Keterangan : Angka-angka yang diikuti notasi yang sama pada kolom dan baris di masing masing tabel menunjukkan tidak berbeda nyata menurut Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf $\alpha = 5\%$.

Tabel 4 menunjukkan bobot segar kecambah tertinggi perendaman berbagai jenis krioprotektan terdapat pada perlakuan PVS4 sebesar 6,97 g dan terendah pada perlakuan PVS2 sebesar 3,44 g. Bobot kering kecambah tertinggi perendaman berbagai jenis krioprotektan terdapat pada perlakuan PVS4 sebesar 1,10 g dan terendah pada perlakuan PVS2 sebesar 0,60 g.

Perlakuan perendaman berbagai jenis krioprotektan memberikan pengaruh yang nyata terhadap bobot segar kecambah dan

bobot kering kecambah. Parameter bobot segar kecambah dan bobot kering kecambah dipengaruhi oleh persentase kecambah normal hal ini disebabkan karena pada pengamatan kedua parameter tersebut kecambah yang digunakan untuk diukur bobotnya hanya kecambah normal saja, oleh sebab itu parameter persentase kecambah normal sangat mempengaruhi hasil dari kedua parameter tersebut.

SIMPULAN

Jenis krioprotektan yang terbaik diperoleh dari PVS4 dengan jumlah kecambah normal tertinggi sebesar 30,44 % dan indeks vigor 26,46. Lama perendaman yang terbaik diperoleh indeks vigor tertinggi didapat pada 60 menit sebesar 26,22. Kombinasi perlakuan terbaik didapat pada perendaman krioprotektan PVS4 selama 90 menit dengan jumlah kecambah normal sebesar 34,00 % dan indeks vigor pada perendaman PVS4 selama 60 menit sebesar 31,35. Viabilitas benih rosella untuk penyimpanan plasma nutfah secara kriopreservasi belum optimal dengan beberapa jenis krioprotektan dan lama perendaman yang bervariasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Fitriyatmi, I. 1996. Pengaruh Suhu Rendah Terhadap Viabilitas Benih Jagung (*Zea mays* L.) Kedelai (*Glycine max* (L) Merr.) Rambutan (*Nephelium lappaceum*) dan Matoa (*Pometia pinnata*) Setelah Pembekuan Dalam Nitrogen Cair. Skripsi. Program Studi Budidaya Pertanian. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor.
- Hamidi, N. 2010. Studi Inhibisi Formasi Kristal Es dengan Krioprotektan Sukrosa dan Glicerol. Jurnal Rekayasa Mesin, 1(1) : 21-26.
- Handayani, S. 2004. Penggunaan Dimetilsulfoksida (DMSO) dan Gliserol 5, 10 dan 15% terhadap Kualitas Sperma pada Kriopreservasi Semen Ikan Batak (*Tor soro*). Skripsi. Program Studi Teknologi dan Manajemen Akuakultur. Departemen Budidaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.
- Justice, O. L., dan L. N. Bass. 1994. Prinsip dan Praktek Penyimpanan Benih. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Kartasapoetra, A.G., 2003. Teknologi Benih Pengolahan Benih dan Tuntunan Praktikum. Rineka Cipta. Jakarta.
- Roostika, I. T dan I. Mariska. 2003. Pemanfaatan Teknik Kriopreservasi dalam Penyimpanan Plasma Nutfah Tanaman. Bul. Plasma Nutfah, 9(2):10-18.
- Rostinawati, T. 2009. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) terhadap *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus* dengan Metode Difusi Agar. Universitas Padjadjaran. Jatinangor.
- Suhendra, D., Haryati, dan L. A. M. Siregar. 2014. Pengaruh Metode Stratifikasi Suhu Rendah, Krioprotektan dan Kriopreservasi Terhadap Viabilitas Benih Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.). J. Online Agroekoteknologi, 2(4):1511-1517.
- Sutopo, L. 2012. Teknologi Benih. PT Raja Grafindo. Jakarta.
- Roberts, H. M. 1959. *The Effect of Storage Conditions on the Viability of grass Seeds*. Internatl. Seed Testing Assoc. Proc. 24: 184-213.
- Toole, E. H. dan Toole, V. K. 1946. *Relation of Temperature and Seed Moisture to Viability of Stored Soybean Seed*. V. S. Dept. Agric. Cir. 753.
- Windiaastika, G. 2013. Konservasi Plasma Nutfah Tanaman Dengan Teknik Kriopreservasi. Balai Besar Perbenihan dan Proteksi Tanaman Perkebunan Surabaya. Surabaya.