KRIOPRESERVASI MATA TUNAS UBI KAYU LOKAL INDONESIA: FAKTOR PENENTU KEBERHASILAN

CRYOPRESERVATION OF LOCAL INDONESIAN CASSAVA BUDS: FACTORS AFFECTING SUCCESSFUL RATE

Enny Sudarmonowati¹⁾, Nurhamidar Rahman^{1)*}, N. Sri Hartati¹⁾

Diterima : 29 Desember 2020

Disetujui : 30 Maret 2021

Afiliasi Penulis:

¹⁾ Puslit bioteknologi LIPI

Email korespondensi:

*nurhamidarr@yahoo.com

ABSTRAK

Kriopreservasi (penyimpanan dalam suhu -198°C) merupakan pilihan untuk menyimpan dalam jangka panjang bahan tanaman ubi kayu yang selama ini menggunakan "shoot tips" atau "axillary buds" dari planlet in vitro. Ada beragam faktor yang memengaruhi keberhasilan kriopreservasi. Oleh karena itu, tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan regenerasi empat genotip ubi kayu lokal Indonesia (Manggu, Mentega 2, Kristal Merah, dan Nangka) menggunakan media ceptode kriopreservasi. Keempat genotip ubi kayu itu diberi perlakuan variasi persentase larutan krioprotektan berbeda (87% gliserol, 5% DMSO atau 10% DMSO sendiri atau dikombinasikan), metode pencairan (thawing), lama penyimpanan dalam nitrogen cair (45 menit atau 3 minggu). Stek mini ubi kayu yang sudah diberi perlakuan tersebut selanjutnya ditumbuhkan pada media regenerasi secara in vitro dengan media MS, di tisu yang dibasahi air atau larutan hara makro MS. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa, daya hidup tertinggi (40%) adalah mata tunas merekah tanpa bagian batang genotip Manggu dan Nangka yang direndam dalam larutan kombinasi 87% gliserol dan 5% DMSO yang dicairkan cepat dalam water bath, dibiakkan pada tisu lembab setelah disimpan dalam nitrogen cair 3 minggu. Penggunaan mata tunas dari batang ubi kayu merupakan yang pertama dan berhasil diregenerasikan menjadi tanaman setelah penyimpanan di tangki nitrogen. Hasil penelitian ini mempermudah dan mempersingkat prosedur kriopreservasi bagian tanaman ubi kayu sehingga dapat mendukung pelestarian plasma nutfah dalam jangka panjang.

Kata kunci: DMSO, gliserol, kriopreservasi, mata tunas, ubi kayu lokal Indonesia

ABSTRACT

Cryopreservation (storage at -198°C) is an option for long-term storage of cassava plant material which has been using "shoot tips" or "axillary buds" from in vitro plantlets. Various factors influence the success of cryopreservation. Therefore, the aim of this study was to determine the regeneration ability of four local Indonesian cassava genotypes (Manggu, Mentega 2, Kristal Merah, Jackfruit) using the cryopreservation method. The four cassava genotypes were treated with different percentage variations of cryoprotectant solution (87% glycerol, 5% DMSO or 10% DMSO alone or in combination), thawing method, storage time in liquid nitrogen (45 minutes or 3 weeks). The mini cassava cuttings that have been treated are then grown on the regeneration medium in vitro with MS media, in tisu soaked with water or MS macro nutrient solution. The results of the observation showed that the highest survival rate (40%) was the buds bursting without the stem parts of the Manggu and jackfruit genotypes immersed in a combination solution of 87% glycerol and 5% DMSO which was quickly thawed in a water bath, cultured on moist tisu after being stored in nitrogen. liquid 3 weeks. The use of buds from cassava stems was the first and was successfully regenerated into plants after storage in the nitrogen tank. The results of this study simplify and shorten the procedure for cryopreservation of parts of the cassava plant so that it can support the preservation of germplasm in the long term.

Keywords: DMSO, glycerol, cryopreservation, buds, Indonesian cassava local genotypes

Cara sitasi:

E. Sudarmonowati, N. Rahman, N.S. Hartati. 2021. Kriopreservasi mata tunas ubi kayu lokal Indonesia: Faktor penentu keberhasilan. *Journal of Tropical Biology* 9 (1): 56-68.

PENDAHULUAN

Ubi kayu (*Manihot esculenta* Grantz.) merupakan salah satu sumber pangan penting di Indonesia yaitu termasuk tiga besar sebagai sumber karbohidrat. Ubi kayu unggul mempunyai kandungan nutrisi tinggi dan berpotensi besar untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku makanan sehat dan bergizi. Selain itu, Ubi kayu juga mempunyai kadar HCN tinggi yang dapat dimanfaatkan untuk industri non pangan bernilai tinggi. Ubi kayu digunakan sebagai pangan untuk dikonsumsi langsung maupun industri seperti tepung mocaf, tepung tapioka, pelet (pakan ikan), gaplek, gula pasir, gasohol, protein sel tunggal, dan asam sitrat [1].

Dewasa ini, pemenuhan kebutuhan bibit ubi kayu semakin meningkat karena program diversifikasi pangan dan cadangan pangan strategis sehingga diperlukan upaya penyimpanan bahan tanaman ubi kayu dalam waktu lama, tidak berubah secara genetik dan tidak memerlukan banyak ruang. Penyimpanan plasma nutfah di lapang dalam bentuk koleksi tanaman maupun di laboratorium dalam bentuk bagian dari tanaman atau organ reproduktif seperti biji dan embrio diperlukan untuk mengatasi kebutuhan lahan luas serta kepunahan karena serangan hama dan penyakit atau bencana alam lainnya.

Indonesia mempunyai 15 varietas unggul baru (VUB) ubi kayu, selain genotip lokal yang mempunyai keunggulan seperti Manggu, Mentega 2, dan Kristal Merah. Potensi hasil Manggu mencapai 70-80 ton/ha [2]. Genotip Mentega 2 mempunyai warna kulit luar umbi krem dan warna daging kekuningan yang mengindikasikan mengandung beta karoten lebih tinggi dari pada ubi putih. Kristal Merah merupakan genotip andalan yang dapat tumbuh di lahan masam. Manggu, Mentega 2, dan Kristal Merah termasuk genotip yang mempunyai pati resisten tinggi. Pati resisten berasosiasi dengan kandungan amilosa sehingga amilosa tinggi umumnya mempunyai pati resisten tinggi. Pati resisten baik untuk kesehatan karena berfungsi serat pangan yang diperlukan oleh tubuh.

Sampai saat ini, budi daya ubi kayu masih menggunakan stek batang bagian bawah, sehingga jumlah ketersediaan bibit menjadi terbatas karena bagian tengah dan bagian atas tidak dapat dimanfaatkan. Selain itu, penyimpanan dalam bentuk stek batang tidak dapat bertahan lama, sehingga penyimpanan harus dilakukan dalam bentuk lonjoran batang panjang dari pangkal hingga dekat pucuk. Hal ini memerlukan tempat penyimpanan yang luas

dan terbatas lama penyimpanannya. Budidaya menggunakan mata tunas dari stek ubi kayu belum pernah dilakukan hingga saat ini karena bahan tanaman terkecil yang pernah dilakukan adalah stek mini [3, 4]. Oleh karena itu, diperlukan sistem budidaya yang lebih efisien menggunakan mata tunas ubi kayu dengan metode pendekatan kultur jaringan tanaman. Sistem kultur jaringan tanaman, dapat memperbanyak jumlah bakaln atau bibit umbi kayu dalam waktu yang singkat.

Pada penelitian ini, teknik kriopreservasi atau penyimpanan dalam nitrogen cair digunakan. Teknik kriopreservasi yaitu penyimpanan sampel pada suhu -196°C menggunakan larutan krioprotektan, sehingga tidak memungkinkan proses biokimia terjadi dan tidak menimbulkan mutasi saat diregenerasikan setelah penyimpanan. Teknik kriopreservasi memerlukan keahlian dalam pengerjaannya. Menurut [4], salah satu faktor penentu keberhasilan teknik ini yaitu, ukuran bagian tanaman harus kecil untuk menghindari kematian organ tanaman karena pembentukan kristal es dari kandungan air yang ada dalam sel.

Penggunaan stek mini ubi kayu (5-10 cm) sudah terbukti dapat diregenerasikan menjadi tanaman dewasa dan menghasilkan umbi. Namun, ukuran tersebut masih terlalu besar bila disimpan dengan metoda kriopreservasi karena masih terdapat kandungan air di dalam organ yang menyebabkan terjadinya kristalisasi es semakin tinggi [4].

Beberapa hasil penelitian terkait penyimpanan ubi kayu telah dilaporkan, umumnya menggunakan tunas apikal atau tunas samping (*leaf bud*) *planlet in vitro* yang ukurannya sudah kecil [5,6]. Selain itu, kriopreservasi ubi kayu di Indonesia yang dilakukan pada tunas pucuk dari *planlet in vitro* dengan menggunakan teknik vitrifikasi juga pernah diteliti oleh [7]. Kriopreservasi ubi kayu dengan organ mata tunas hingga saat ini belum pernah dilaporkan. Penggunaan mata tunas akan melengkapi keterbatasan jumlah tunas apikal atau aksilar *plantlet in vitro*. Keberhasilan penyimpanan dalam jangka panjang akan mengurangi biaya sub kultur dan media *in vitro* karena dapat ditanam langsung di tanah.

Metode kriopreservasi memerlukan larutan krioprotektan yang berfungsi untuk mencegah pembentukan kristal es akan tetapi larutan tersebut juga bersifat toksik pada saat ekuilibrisasi dan setelah *thawing* [8]. Larutan krioprotektan di antaranya yaitu gliserol, DMSO, dan lain sebagainya, tergantung prosedur yang digunakan. DMSO umumnya

digunakan dengan campuran larutan lain seperti gliserol atau PVP. Masing-masing jenis larutan mempunyai fungsi dan keunggulan berbeda. Pada kriopreservasi bagian jaringan atau organ hewan, DMSO dan gliserol sangat umum dipakai dibandingkan pada jaringan tanaman. Krioprotektan yang digunakan harus mudah larut dalam air dan harus mempunyai bobot molekul yang kecil agar lebih cepat menyusup ke dalam sel dan mengurangi toksisitas akibat osmolaritas yang tinggi [9]. Sedangkan gliserol memiliki peran untuk mencegah pengumpulan molekul H₂O dan kristalisasi es pada daerah titik beku larutan.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh prosedur penyimpanan jangka panjang ubi kayu yang praktis menggunakan stek super mini dan mata tunas dari batang tanaman ubi kayu Manggu, Mentega 2, dan Kristal Merah dengan teknik kriopreservasi pembekuan cepat. Penelitian dilakukan dalam rangka mendukung penyediaan bibit unggul lokal Indonesia.

METODE PENELITIAN

Bagian tanaman dan genotip. Bagian tanaman ubi kayu lokal (Manggu, Mentega 2, Kristal Merah) yang akan dipreservasi adalah stek super mini (1 dan 2 ruas buku) yang mempunyai satu mata tunas berjarak 0,5; 1; dan 2 cm (Gambar 1), mata tunas belum dan yang sudah merekah (Gambar 2). Sampel ubi kayu genotip Manggu dan Mentega 2 berjumlah satu buku dipotong dengan jarak dari mata tunas yaitu 0,5; 1; 2 cm. Sampel ubi kayu berjumlah dua buku dipotong dengan jarak dari mata tunas yaitu 1 cm. Sumber stek dan mata tunas berasal dari tanaman ubi kayu koleksi Kebun Plasma Nutfah Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI di Cibinong Science Centre – Botanic Gardens (CSC-BG), Cibinong, Jawa Barat. Masing-

masing perlakuan berjumlah 10-30 sampel. Stek super mini dan mata tunas ubi kayu bersumber dari tanaman induk genotip Manggu dan Kristal Merah berumur umur 10 bulan dan diambil dari posisi tunas 10 cm dari permukaan tanah yang mata tunasnya sudah merekah dan belum merekah.

Larutan krioprotektan. Larutan krioprotektan yang digunakan mempunyai komposisi (1) 87% gliserol, 5% DMSO, 10% DMSO; (2) 87% gliserol dan 10 % DMSO; (3) 87% gliserol dan 5% DMSO. Larutan krioprotektan komposisi 1 digunakan untuk stek super mini yang oleh beberapa peneliti digunakan untuk tunas pucuk *in vitro* sedangkan komposisi 2 dan 3 digunakan untuk mata tunas.

Prosedur kriopreservasi. *Kriopreservasi stek super mini berbagai ukuran.* Sampel yang telah ditiriskan 1 jam (kering angin) di atas tisu setelah perendaman dalam larutan krioprotektan selama 1 jam, kemudian direndam dalam larutan fungisida Agrep (20 g/L) dan Dithane M-45 (40 g/L) dalam 1 L aquades selama 1 jam. Selanjutnya pencucian dilakukan dengan akuades. Sampel dibungkus dengan aluminium foil dan dimasukkan ke tabung berisi nitrogen cair selama 1 jam dan 1 hari dengan uap nitrogen cair minimal suhu -40°C. Jumlah sampel sebanyak 30 stek super mini.

Kriopreservasi mata tunas tanpa bagian batang utama. Mata tunas direndam dalam larutan krioprotektan yang mengandung kombinasi 87% gliserol dan 10% DMSO atau dalam larutan 5% DMSO hingga seluruh bagian tanaman terendam selama 1 jam. Mata tunas dibungkus dengan aluminium foil dan ditetesi larutan krioprotektan. Selanjutnya, sampel dicelupkan dalam tangki nitrogen cair, masing-masing ada yang direndam selama 45 menit dan ada yang direndam selama 3 minggu.

Gambar 1. Contoh ukuran stek super mini ubi kayu (a) 1 buku 0,5 cm; (b) 1 buku 1 cm; (c) 1 buku persegiempat; (d) 2 buku 1 cm

Gambar 2. Mata tunas Manggu (a) dan Kristal Merah (b) dengan bagian kayu batang yang sudah merekah (atas) dan yang belum merekah (tengah); mata tunas tanpa bagian kayu (bawah) yang belum merekah (kiri) dan merekah (kanan)

Prosedur pencairan (*Thawing*). *Thawing* dilakukan dengan dua cara (1) secara perlahan, yaitu pencairan dilakukan di suhu ruang dengan membuka aluminium *foil* dan dibiarkan selama 1 jam lalu diserap airnya dengan kertas serapan; (2) secara cepat, yaitu melalui perendaman dalam *water bath* pada suhu 60°C selama 1 jam, lalu ditanam di media regenerasi. *Thawing* stek super mini dilakukan secara perlahan sedangkan *thawing* mata tunas dilakukan secara cepat untuk menghindari kematian pada jaringan sel tanaman.

Media dan bahan untuk regenerasi. *Media regenerasi untuk stek super mini.* Stek supermini ditanam langsung pada campuran media tanah, pasir, arang, dan tanah (1:1:1:1) dalam baki plastik ukuran 53x38x16 cm. Penambahan campuran fungisida (20 g/L Agrep dan 40 g/L Dithane M-45) dilakukan untuk menghindari pertumbuhan jamur saat penanaman setelah penyimpanan dalam nitrogen cair.

Media regenerasi untuk mata tunas. Mata tunas diletakkan pada tisu yang dibasahi dengan air atau dengan larutan hara makro Murashige dan Skoog atau MS. Media regenerasi *in vitro* untuk mata tunas adalah media MS yang mengandung 0,01 mg/l NAA dan 0,5 mg/l BAP dan 20% sukrosa. Sebelum perlakuan kriopreservasi, pra penelitian dilakukan untuk

memperoleh ukuran terkecil yang dapat diregenerasi dan media terbaik yang dapat menghasilkan daya hidup tertinggi: (1) Stek super mini diperkecil dari yang semula berukuran hingga 2 buku menjadi hanya 1 buku dengan ukuran 1 cm; (2) Mata tunas dengan bagian buku ditanam di tanah; (3) Mata tunas tanpa bagian buku dibiakkan di tisu lembab.

Pemeliharaan bahan tanaman saat regenerasi. Stek super mini atau mata tunas disiram setiap hari menggunakan *sprayer*. Baki diletakkan di tempat teduh, tidak terkena matahari langsung. Mata tunas yang telah disimpan dalam nitrogen cair yang dibiakkan secara *in vitro* pada media MS tetap dibiakkan pada media yang sama tanpa subkultur. Suhu ruang kultur adalah 28°C dengan kelembaban udara 70%. Penyinaran dilakukan selama 8-16 jam terang, dan 16-8 jam gelap.

Pengamatan dan analisis data. Pengamatan dilakukan pada umur tanam 3, 6, 12, 24 hingga 48 Hari Setelah Tanam (HST). Parameter pengamatan meliputi persentase daya hidup dan tinggi tunas semua perlakuan dan kontrol. Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan menggunakan SPSS versi 21.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh bagian tanaman, ukuran stek batang super mini dan mata tunas pada daya hidup. *Pada media tumbuh tisu basah.* Berdasarkan pengamatan, hasil menunjukkan bahwa stek super mini ukuran 0,5 cm dapat hidup 100% pada semua genotip sehingga secara ideal, ukuran ini yang akan bertahan hidup setelah penyimpanan di nitrogen cair (Tabel 1, Gambar 3). Mata tunas tanpa bagian stek batang dari semua genotip yang dicoba dapat hidup pada tisu lembab, baik yang dibasahi dengan air atau larutan hara makro, sehingga menjadi bagian tanaman terkecil yang ideal untuk penyimpanan jangka panjang (Tabel 2 dan 3, Gambar 4). Oleh karena stek super mini masih berukuran besar, untuk memperkecil kerusakan sel akibat pembentukan kristal es, penyimpanan hanya dilakukan dengan uap nitrogen cair dalam tangki nitrogen.

Mata tunas yang merekah maupun tidak merekah pada kedua genotip ubi kayu (Manggu dan Kristal Merah) pada semua perlakuan dan kontrol memiliki daya hidup rendah <40% setelah 48 HST dan tidak berbeda nyata setelah didesikasi dalam 87% gliserol dan DMSO 10% sebagai krioprotektan selama 45 menit dan 3 minggu (Tabel 4).

Pada Tabel 5 menunjukkan daya hidup genotip ubi kayu Manggu lebih tinggi dibanding genotip lainnya, sebesar 52%. Tetapi daya hidup genotip Manggu masih lebih rendah dibandingkan tanaman kontrol dengan perlakuan tidak direndam krioprotektan meskipun tidak berbeda nyata setelah didesikasi dalam 87% gliserol dan DMSO 5%.

Pada media tumbuh tanah. Stek mini yang berhasil hidup setelah desikasi dalam 87% gliserol sebagai krioprotektan selama 1 jam hanya stek mini Manggu berukuran 1 cm dengan 2 buku yang disimpan selama 1 jam dalam uap nitrogen cair di tangki walaupun hanya 3% (Tabel 6, Gambar 5). Tidak ada stek mini yang hidup pada perlakuan larutan krioprotektan lain. Hal ini menunjukkan jenis dan komposisi larutan krioprotektan dan genotip tanaman memengaruhi daya hidup.

Demikian juga dengan tidak adanya daya hidup yang ditemukan pada stek mini Mentega 2 setelah perlakuan nitrogen cair.

Perbedaan genotip memberikan perbedaan respon hal ini juga seperti disimpulkan oleh [10] yang dalam penelitiannya membandingkan sembilan kultivar *Ribes nigrum* L. Penggunaan mata tunas dipilih karena kemampuan mata tunas dalam regenerasi dan ukuran lebih kecil dari stek. [11] menyatakan bahwa pertumbuhan mata tunas dipengaruhi letak atau posisinya di batang. Pada klon tertentu jumlah yang merekah, tinggi, dan total berat kering lebih tinggi dari mata tunas dari bagian atas induk berumur enam bulan. Sedangkan dari induk berumur empat bulan tidak menimbulkan pengaruh nyata. Pada klon lain, mata tunas dari bagian bawah batang induk lebih baik dibandingkan dari bagian atas.

Tabel 1. Regenerasi stek mini ubi kayu Manggu, Mentega 2, Kristal Merah berbagai ukuran pada media tanah dan pasir untuk memperoleh ukuran terkecil dan tertinggi daya hidupnya pada 14 HST

Genotip	Ukuran Stek	Daya Hidup (%)
Manggu	1 buku 0,5 cm	100
	1 buku 1 cm	100
	2 buku 1 cm	100
Mentega-2	1 buku 0,5 cm	100
	1 buku 1 cm	100
	2 buku 1 cm	100
Manggu	0,5 cm	100
	1,0 cm	100
	2,0 cm	100
Kristal Merah	0,5 cm	100
	1,0 cm	100
	2,0 cm	100

Gambar 3. Regenerasi tunas dengan stek jarak 0,5; 1,0; dan 2,0 cm dari mata tunas Kristal Merah (a) dan kontrol (b), Manggu (c) dan kontrol (d) pada 13 HST, untuk menentukan stek mini terkecil dengan daya hidup tinggi

Tabel 2. Daya hidup mata tunas dengan atau tanpa batang ubi kayu Manggu dan Kristal Merah pada media tisu yang dibasahi dengan air dan hara makro untuk memperoleh ukuran terkecil yang dapat diregenerasi pada 13 HST

Genotip	Bagian tanaman	Media tisu dengan air		Media tisu dengan hara makro	
		Daya hidup (%)	Tinggi tanaman (cm)	Daya hidup (%)	Tinggi tanaman (cm)
Manggu	Mata tunas dengan bagian batang	33,3	1,5	0	0
	Mata tunas tanpa bagian batang	33,3	1	0	0
Kristal Merah	Mata tunas dengan bagian batang	50	4	0	0
	Mata tunas tanpa bagian batang	50	3	0	0

Tabel 3. Daya hidup mata tunas tanpa bagian batang ubi kayu genotip Manggu dan Kristal Merah pada tisu dengan air atau hara makro untuk memperoleh ukuran terkecil yang dapat diregenerasi pada 13 HST

Genotip	Bagian tanaman	Daya hidup (%) media tisu dengan air	Daya hidup (%) media tisu hara makro
Manggu	Mata tunas merekah	80	80
	Mata tunas tidak merekah	80	20
Kristal Merah	Mata tunas merekah	100	80
	Mata tunas tidak merekah	80	40

Tabel 4. Daya hidup mata tunas tanpa bagian batang ubi kayu genotip Manggu dan Kristal Merah pada tisu dengan penambahan gliserol 87% dan DMSO10% untuk memperoleh ukuran terkecil yang dapat diregenerasi pada 48 HST pada berbagai perlakuan kriopreservasi

Jenis Ubi kayu	Perlakuan	Persentase daya hidup mata tunas merekah setelah hari ke-48	Persentase daya hidup mata tunas tidak merekah setelah hari ke-48
Manggu	Krioprotektan	disimpan 45'	20 ± 20a
		disimpan 3 minggu di LN2	20 ± 20a
	Tanpa Krioprotektan	disimpan 45'	36 ± 16a
		disimpan 3 minggu di LN2	20 ± 20a
	Kontrol	direndam	20 ± 20a
		tidak direndam	20 ± 16a
Kristal Merah	Krioprotektan	disimpan 45'	36 ± 16a
		disimpan 3 minggu di LN2	20 ± 20a
	Tanpa Krioprotektan	disimpan 45'	36 ± 16a
		disimpan 3 minggu di LN2	36 ± 16a
	Kontrol	direndam	20 ± 20a
		tidak direndam	36 ± 16a

Keterangan: LN2= *Liquid Nitrogen*

Tabel 5. Daya hidup mata tunas tanpa bagian batang Ubi Kayu genotip Manggu dan Kristal Merah pada tisu dengan penambahan gliserol 87% dan DMSO 5% untuk memperoleh ukuran terkecil yang dapat diregenerasi pada 48 HST pada berbagai perlakuan Kriopreservasi

Jenis Ubi Kayu	Perlakuan	Persentase daya hidup mata tunas
Manggu	Krioprotektan	disimpan 45'
		disimpan 3 minggu di LN2
	Tanpa Krioprotektan	disimpan 45'
		disimpan 3 minggu di LN2
	Kontrol	direndam
		tidak direndam
Kristal Merah	Krioprotektan	disimpan 45'
		disimpan 3 minggu di LN2
	Tanpa Krioprotektan	disimpan 45'
		disimpan 3 minggu di LN2
	Kontrol	direndam
		tidak direndam
Nangka	Krioprotektan	disimpan 45'
		disimpan 3 minggu di LN2
	Tanpa Krioprotektan	disimpan 45'
		disimpan 3 minggu di LN2
	Kontrol	direndam
		tidak direndam

Keterangan: LN2=*Liquid Nitrogen*

Gambar 4. Regenerasi mata tunas Kristal Merah dan Manggu hasil perlakuan yang tumbuh di tisu dibasahi air pada 13 HST (a = kontrol tidak direndam, b = kontrol direndam, c = perlakuan direndam, d = perlakuan tidak direndam)

Tabel 6. Persentase hidup stek super mini ubi kayu Manggu dan Mentega 2 yang direndam dalam 87% gliserol setelah penyimpanan di tangki nitrogen 1 jam atau 1 hari

Genotip	Ukuran stek	Daya hidup setelah penyimpanan di tangki nitrogen (%)	
		1 jam	1 hari
Manggu	1 buku 0,5 cm	0	0
	1 buku 1 cm	0	0
	2 buku 1 cm	3	0
Mentega 2	1 buku 0,5 cm	0	0
	1 buku 1 cm	0	0
	2 buku 1 cm	0	100

Gambar 5. Stek mini 2 buku ubi kayu genotip Manggu, disimpan dalam nitrogen cair (LN2) selama 1 jam yang hidup. kontrol (A) dibandingkan yang disimpan di Liquid Nitrogen (LN2) (B dan C); stek yang hidup setelah disimpan di LN2

Menurut [12], penggunaan mata tunas selain bahan tanaman lainnya yang umum dipakai juga dilakukan di nanas. Alasan keterbatasan jumlah bibit bila hanya menggunakan *crown* tidak dapat memenuhi perkebunan. Jumlah tunas yang terbentuk dan tinggi tunas terbaik adalah perlakuan kontrol, sedangkan jumlah daun dan panjang akar terbaik diperoleh dengan menggunakan sari bawang merah.

Pada kultur *in vitro*, penggunaan mata tunas dari ketiak daun *planlet* umur enam bulan

menunjukkan daya bertunas tertinggi. [13] menyatakan ubi kayu mempunyai aktivitas metabolik, laju pertumbuhan daun dan batang lebih tinggi pada umur 3 – 6 bulan setelah tanam. Kualitas tunas merekah tertinggi dari mata tunas diambil dari bagian lunak di bagian atas (*herbaceous apical stem*) karena lebih sedikit level lignifikasi jaringan. Hasil ini juga sama dengan [14], yang melaporkan bahwa stek bagian atas (apikal) dengan level lignifikasi lebih rendah mempunyai kondisi fisiologis

yang sesuai seperti adanya auksin dan senyawa penting lainnya untuk berakar di *plantlet Lavandula angustifolia* L.

Penyimpanan dalam nitrogen cair selama 45 menit atau 1 jam sudah dapat menjadi indikator kemampuan sampel mata tunas disimpan dalam jangka panjang (dorman). Penyimpanan dalam uap nitrogen dengan kisaran suhu sekitar -140°C juga dilakukan pada tunas dormant dari kebun buah *Ribes nigrum* L [15]. Hasil ini memberikan harapan bahwa stek super mini dapat disimpan dalam jangka panjang. Namun memerlukan prosedur pemberian anti jamur dan penyakit lainnya karena semakin besar sampel, kemungkinan mengandung bakteri atau jamur lebih banyak. Oleh karena itu, sebelum disimpan di tangki nitrogen, sampel direndam dalam larutan fungisida Agrept 2 % dan Dithane 20 % selama 1 jam perendaman.

Bila dibandingkan mata tunas tanpa bagian batang, persentase hidup Manggu dan Nangka mencapai lebih tinggi yaitu 40% setelah penyimpanan dalam nitrogen cair selama 3 minggu dalam keadaan terendam (Gambar 6 dan 7). Hal ini juga lebih praktis karena tidak memerlukan perendaman dalam fungisida karena relatif lebih bersih. Status pertumbuhan mata tunas menentukan daya regenerasi di media tumbuh. Daya regenerasi mata tunas yang belum merekah lebih rendah dari pada mata tunas yang sudah merekah. Hal ini dimungkinkan karena dormansi (Tabel 3). Pemecahan dormansi dapat dilakukan dengan pemberian *stress*, namun pada ubi kayu, setelah penyimpanan dalam nitrogen cair baik pada perlakuan larutan krioprotektan kombinasi dengan 5% maupun 10% DMSO, mata tunas yang belum atau tidak merekah mempunyai daya hidup lebih rendah bahkan tidak tumbuh hingga umur 48 HST (Gambar 8 dan 9). Hal ini berbeda dengan jenis tanaman lain seperti kelompok blueberry (*Vaccinium*) pada penelitian yang dilakukan [16] yang menggunakan mata tunas dormant dari cabang.

Gambar 6. Regenerasi mata tunas ubi kayu genotip Nangka (B), Manggu (C) yang hidup dibandingkan kontrol (A) pada media *tisue* dibasahi air setelah disimpan dalam nitrogen cair selama 45 menit

Gambar 7. Regenerasi mata tunas ubi kayu genotip Nangka (2) dan Manggu (3) yang hidup dibandingkan kontrol (1) pada media *tisue* dibasahi air setelah disimpan dalam nitrogen cair 3 minggu

Penggunaan mata tunas yang disimpan dalam jangka panjang sudah banyak dilakukan di tanaman hortikultura berkayu seperti apel dan lainnya. Umumnya metode *long-term preservation* (kriopreservasi) digunakan untuk penyimpanan *bud* (tunas yang belum merekah) tanaman buah-buahan bernilai ekonomi tinggi. Sedangkan pada kelompok blueberry (*Vaccinium*) digunakan ranting dengan tunas dormant dipotong 70 mm dengan minimal 2 buku, desikasi, *slowly cooled*, lalu disimpan dalam uap nitrogen cair. Daya hidup tertinggi adalah yang diambil di pertengahan Desember hingga pertengahan Januari. Hal ini juga mengindikasikan bahwa periode pengambilan bahan tanaman juga berpengaruh. Daya hidup berkorelasi negatif dengan perlakuan suhu sebelum perlakuan namun tidak berkorelasi dengan dormansi tunas, kadar air, diameter ranting, jumlah tunas, dan panjang ranting dan lamanya desikasi. Daya hidup dapat mencapai 52% and 80% bila dormant tunas dipanen setelah 10 hari dengan rata-rata suhu ruang kurang dari 11,2 °C.

Pengambilan tunas dormant pada suhu ini sangat penting sebelum diperlakukan penyimpanan di uap nitrogen cair [16]. Hal ini sesuai dengan hasil yaitu stek mini ubi kayu dengan 1-2 mata tunas akan mempunyai daya hidup lebih tinggi bila hanya menggunakan uap nitrogen cair, tidak direndam. Hal ini dikarenakan kandungan air yang banyak akan menjadi kristal es bila direndam di nitrogen cair. Pada tanaman buah berkayu lainnya, perlakuan *slow cooling* (pendinginan bertahap) sebelum dicelup di nitrogen cair lalu disimpan hanya dalam uap nitrogen cair juga merupakan yang terbaik seperti pada mata tunas dormant *Ribes nigrum* L. dengan daya hidup mencapai 83% [15].

Penggunaan metode *slow cooling* sudah lama digunakan dan memberikan daya hidup tunas pucuk ubi kayu secara *in vitro* lebih tinggi dibandingkan langsung perendaman dalam nitrogen cair [17]. Teknik ini dapat dicoba untuk penyimpanan mata tunas namun memerlukan tahapan lebih panjang,

Gambar 8. Persentase hidup mata tunas ubi kayu Manggu dan Kristal Merah (KM) dengan perlakuan krioprotektan 87% gliserol dan 10% DMSO dan disimpan dalam nitrogen cair pada 3, 6, 12, 24, dan 48 HST

Gambar 9. Persentase hidup mata tunas ubi kayu Manggu, Kristal Merah, Nangka dengan dan tanpa perlakuan krioprotektan 87% gliserol dan 5% DMSO dan disimpan dalam nitrogen cair pada 3, 6, 12, 24, dan 48 HST

sedangkan tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah menentukan prosedur praktis untuk menyimpan mata tunas ubi kayu. Agar prosedur lebih praktis juga pernah dicoba oleh [10] pada mata tunas dorman *Ribes nigrum* L. dengan melakukan pencelupan langsung pada nitrogen cair tanpa *slow freezing* namun melakukan penyimpanan langsung dicelup di nitrogen cair setelah desikasi selama tujuh hari di suhu -20°C . Hanya yang penyimpanan di 20°C yang dapat hidup di lapang saat dilakukan okulasi langsung. Walaupun tidak ada yang hidup setelah pencelupan dalam nitrogen cair, namun apabila mata tunas langsung dipisahkan dari bagian berkayu saat setelah *thawing* di air pada suhu ruang dan dibiakkan secara *in vitro*.

Membiakkan mata tunas ubi kayu secara *in vitro* setelah penyimpanan di nitrogen cair telah dilakukan namun belum berhasil karena kontaminasi yang diakibatkan bagian berkayu mengandung banyak kontaminan (bakteri dan jamur). Perlu dilakukan optimasi sterilisasi bila

mata tunas batang ubi kayu akan dibiakkan secara *in vitro*.

Pengaruh komposisi larutan krioprotektan dan lamanya perendaman. Perendaman dalam 1 jam diduga terlalu lama bila konsentrasi kombinasi larutan krioprotektannya terlalu tinggi. Larutan krioprotektan berfungsi untuk melindungi kerusakan sel akibat pembentukan kristal es. Semakin besar ukuran bagian tanaman, semakin memerlukan perlindungan yang lebih kuat dari krioprotektan. Gliserol pada konsentrasi 87% kemungkinan kurang sesuai atau tidak cukup kuat melindungi stek mini ubi kayu. Oleh karena itu, untuk penyimpanan mata tunas ubi kayu digunakan kombinasi dengan DMSO pada konsentrasi 5% dibandingkan dengan 10%. Untuk penyimpanan jangka panjang mata tunas tanpa bagian batang, konsentrasi 5% DMSO dikombinasikan dengan 87% gliserol yang terbaik karena 10% DMSO berefek lebih toksik sehingga persentase hidup tertinggi hanya 20%

yang diperoleh dari mata tunas varietas Kristal Merah (Gambar 8 dan 9).

Krioprotektan yang umum digunakan pada pembekuan semen hewan ternak seperti ayam adalah gliserol. Namun, gliserol dapat berdampak negatif setelah jangka waktu tertentu seperti yang dilaporkan [18] yaitu penggunaan gliserol sebagai krioprotektan pada proses pembekuan memberikan hasil yang sangat buruk pada tingkat fertilitas ayam kampung. Oleh karena itu, perlu digunakan larutan lain seperti DMSO. Senyawa DMSO adalah campuran organosulfur dengan rumus kimia $(CH_3)_2SO$ dan mempunyai bobot molekul rendah yaitu 78,13 g/mol sehingga lebih cepat masuk ke dalam sel pada proses pembekuan. Senyawa DMSO juga memiliki titik beku yang tinggi yang dapat mencegah pembentukan kristal es. Konsentrasi DMSO optimal sangat bervariasi, pada hewan untuk semen itik yang terbaik adalah 10% [19], sedangkan pada berbagai jenis ayam yang terbaik adalah 5% [20].

Perendaman langsung (atau pembekuan cepat) dalam nitrogen cair tanpa perlakuan pendinginan sebelumnya memerlukan desikasi atau penyimpanan pada suhu dingin atau pendinginan/pembekuan secara bertahap (*slow freezing*) memerlukan krioprotektan. Dari komposisi larutan krioprotektan yang dicoba, 5% DMSO merupakan yang terbaik karena menghasilkan daya hidup tertinggi hingga mencapai 40% pada Nangka dan Manggu. Konsentrasi ini diduga masih toksik untuk mata tunas karena mata tunas kontrol yang tidak disimpan dalam nitrogen cair juga mempunyai daya hidup 60% (Gambar 10 dan 11).

Perlakuan perendaman dalam larutan krioprotektan kombinasi 87% gliserol dan 5% DMSO membuktikan bahwa tanpa perlakuan ini selama 1 jam, tidak ada mata tunas yang hidup atau daya hidup hanya 20% pada dua

genotip yang dicoba yaitu Manggu, Nangka, dan Kristal Merah (Gambar 11). Bila larutan krioprotektan tidak sesuai, tidak dapat melindungi atau bahkan menjadi meracuni sehingga tidak ada yang hidup.

[21] menyimpulkan bahwa komposisi media dan larutan krioprotektan sebelum disimpan dalam nitrogen cair atau sebelum perendaman sangat menentukan keberhasilan regenerasi setelah penyimpanan. Walaupun belum dilakukan penyimpanan dalam nitrogen cair, tunas ubi kayu yang dikultur pada media untuk menahan pelayuan yaitu mengandung $AgNO_3$ dan glutamin dapat mengurangi atau memperlambat penguningan daun. Pada ubi jalar, walaupun belum berhasil disimpan dalam nitrogen cair, namun penggunaan etilen glikol lebih baik daripada DMSO memberikan pertumbuhan lebih baik setelah perendaman.

Pengaruh lama penyimpanan dalam nitrogen cair. Lamanya penyimpanan dalam nitrogen cair tidak berpengaruh terhadap persentase daya hidup mata tunas ubi kayu karena daya hidup mata tunas tanpa bagian batang yang disimpan selama 45 menit sama dengan yang disimpan selama 3 minggu. Pada genotip Manggu dan Nangka, mata tunas yang disimpan selama 3 minggu bahkan mempunyai daya hidup lebih tinggi yaitu 40% dibandingkan bila disimpan selama 45 menit (Gambar 11). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian di beberapa tanaman atau hewan bahwa apabila bertahan dalam 30-45 menit, akan bertahan hingga waktu tak terbatas karena indikator cukup 30 menit bila benar-benar terendam dan sudah terlindungi dengan pra perlakuan atau dalam larutan krioprotektan yang sesuai. Teknik kriopreservasi menunjukkan tidak ditemukannya abnormalitas secara morfologi kalus embriogenik *Dioscorea bulbifera* L. dengan metode *encapsulation-vitrification* setelah dikulturkan pada media regenerasi [22].

Gambar 10. Persentase hidup mata tunas ubi kayu Manggu dan Kristal Merah yang merekah dan tidak merekah pada 48 HST pada perlakuan krioprotektan 87% gliserol dan 10% DMSO setelah disimpan dalam nitrogen cair 45 menit dan 3 minggu

Gambar 11. Persentase hidup mata tunas yang merekah pada ubi kayu Manggu, Kristal Merah (KM), dan Nangka pada 48 HST pada perlakuan krioprotektan 87% gliserol dan 5% DMSO setelah disimpan dalam nitrogen cair 45 menit dan 3 minggu

Pengaruh metode kriopreservasi dan thawing (pencairan). *Thawing* (pencairan) lambat dengan didiamkan di suhu ruang selama 1 jam kurang sesuai untuk stek mini ubi kayu sehingga digunakan pencairan secara cepat dengan dimasukkan dalam *water bath* suhu 60°C untuk mata tunas ubi kayu Nangka, Manggu, dan Kristal Merah. Tunas dorman *Ribes nigrum* L memerlukan pencairan lambat setelah penyimpanan dalam nitrogen cair [15].

Metode kriopreservasi sangat memengaruhi keberhasilan. Metode yang digunakan adalah pembekuan cepat dengan alasan untuk kepraktisan aplikasi. Sebagian besar menggunakan bahan tanaman *in vitro* dan berhasil diregenerasikan setelah penyimpanan dalam nitrogen namun memerlukan prosedur yang sesuai. Teknologi vitrifikasi dan enkapsulasi dehidrasi telah berhasil pada beberapa tanaman *in vitro* seperti ubi kayu [7], tanaman berkayu mangium dan sengon [23, 24, 25], dan pada kalus embriogenik kakao dengan metode enkapsulasi dehidrasi [26]. Kombinasi metode enkapsulasi dehidrasi-vitrifikasi bahkan juga dilakukan pada tunas pucuk *in vitro* ubi kayu [27].

Pengaruh media regenerasi. Media atau metode regenerasi sangat berpengaruh pada kemampuan hidup jaringan atau bagian tanaman setelah mengalami perendaman dalam nitrogen cair dengan suhu -198°C. Pemberian larutan hara makro tidak memberikan pengaruh positif sehingga pelembaban dengan air lebih banyak memberikan daya hidup lebih tinggi pada mata tunas ubi kayu yang tidak disimpan dalam nitrogen cair. Oleh karena itu, mekanisme regenerasi untuk mata tunas setelah disimpan dalam nitrogen cair adalah membiakkan dalam tisu yang dibasahi air. Penggunaan larutan hara makro MS medium

diduga terlalu tinggi mengandung nutrisi tertentu yang tidak diperlukan mata tunas sehingga berakibat meracuni.

Penanaman di media MS dan agar menyebabkan kontaminasi, hal ini diduga karena proses sterilisasi mata tunas ubi kayu belum optimum yang masih terdapat bagian kayu batang. Hal ini mengakibatkan semua sampel setelah penyimpanan dalam nitrogen cair terkontaminasi jamur dan bakteri. Regenerasi dalam media agar secara *in vitro* dilakukan untuk meningkatkan daya hidup blackcurrant yang apabila langsung ke media tanah, daya hidupnya akan lebih rendah atau bahkan mati [10]. Hal ini karena media *in vitro* dapat mencukupi kebutuhan hara sampel setelah perlakuan pembekuan.

KESIMPULAN

Keberhasilan kriopreservasi mata tunas ubi kayu tergantung genotip, ukuran dan bagian mata tunas, komposisi larutan krioprotektan, lamanya perendaman, media, dan prosedur regenerasi setelah perendaman dalam nitrogen cair sehingga apabila faktor tersebut tidak optimal akan menyebabkan persentase daya hidup rendah. Ukuran mata tunas dan kondisi mata tunas menentukan prosedur kriopreservasi yang paling sesuai. Semakin besar ukuran, metode penyimpanan hanya dalam uap nitrogen cair sedangkan mata tunas saja tanpa bagian stek batang, dapat direndam di nitrogen cair hingga tiga minggu yang mengindikasikan dapat disimpan selama tidak waktu terbatas. Hasil yang diperoleh merupakan terobosan penyimpanan jangka panjang bahan tanaman ubi kayu atau tanaman berkayu tropis yang berbiak vegetatif lainnya yang tidak perlu secara *in vitro* dan lebih praktis. Agar daya

hidup mata tunas yang merekah setelah kriopreservasi semakin meningkat yaitu mencapai lebih dari 40%, diperlukan penelitian lebih lanjut antara lain pra perlakuan mata tunas pada suhu <18°C, mengubah komposisi dan menurunkan konsentrasi larutan krioprotektan, mengurangi waktu perendaman, memperbaiki mekanisme dan media regenerasi.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Rismayani (2007) Usahatani dan pemasaran hasil pertanian. Medan USU Press
- [2] Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian (2016) Outlook Komoditas Pertanian Tanaman Pangan: Ubi Kayu. Kementerian Pertanian 74 p.
- [3] Adrian (2012). Pertumbuhan akar dan tunas stek batang mini tanaman ubi kayu. Prosiding Seminar Hasil-hasil Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat. Universitas Lampung. 11-18
- [4] Nahar EN, Tan SI (2012) Cassava mini cutting as a source of planting materials. J. Trop. Agric. And Fd. Sci. 40(1): 145-151.
- [5] Escobar RH, Mafla G, Roca WM (1997) A methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. Plant Cell Reports 16:474–478.
- [6] Charoensub R, Phansiri S, Yongmanitchai W, Sakai A (2003) Kriopreservasi rutin pada apeks ketiak yang ditanam secara in vitro (*Manihot esculenta* Crantz) dengan vitrifikasi: pentingnya kultur mononodal sederhana. Scientia Horticulturae 98 (4): 485-492.
- [7] Roostika I, Mariska I, Sunarlim N (2004) Penyimpanan ubi kayu (*Manihot utilissima*) secara kriopreservasi dengan teknik vitrifikasi. J. Bioteknologi Pertanian 9(1): 8-13.
- [8] Suidzinska A, Lukaszewicz E (2008) The effect of breed on freezability of semen of fancy fowl. Anim. Sci. Pap. Rep 26: 331 – 340.
- [9] Kostaman T, Yusuf T L, Fachrudin M, Setiadi MA (2018) Effectiveness of DMSO concentration on recovery rate and viability of primordial germ cell of Gaok chicken. Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner 22(1): 30-37.
- [10] Green J, Grout B, (2010) Direct cryopreservation of winter buds of nine cultivars of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.). Cryo Letters 31 (4): 341-346.
- [11] Neves RDJ, Souza LS, Oliveira EJD (2020) A leaf bud technique for rapid propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Scientia Agricola 77(2): e20180005.
- [12] Warid W, Effendi RS, Widiyanti RA (2018) Respon mata tunas crown terhadap jenis perangsang tumbuh pada perbanyakan tanaman nanas. Jurnal Bioindustri 1 (1): 73-82.
- [13] Sari, R (2017) Evaluasi keragaman karakter morfologi dan agronomi delapan populasi F1 ubi kayu di Bandar Lampung. Digital Repository Unila.
- [14] de Bona CM, Masetto MAM, Deschamps C, Biasi LA (2012) Rooting induction of different *Lavandula angustifolia* accessions by auxin application. Semina: Ciências Agrárias 33(1): 175-182.
- [15] Rantala S, Kaseva J, Karhu S, Veteläinen M, Uosukainen M, Häggman H (2019) Cryopreservation of *Ribes nigrum* (L.) dormant buds: recovery via in vitro culture to the field. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTC) 138:109–119.
- [16] Jenderek MM, Tanner JD, Ambruzs BD, West M, Postman JD, Hummer KE (2017) Twig pre-harvest temperature significantly influences effective cryopreservation of *Vaccinium* dormant buds. Cryobiology 74: 154-159.
- [17] Sudarmonowati E, Henshaw GG (1992) Pengaruh perlakuan awal dan krioprotektan terhadap daya hidup embrio somatik ketela pohon yang dibekukan. Prosiding Seminar Hasil Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi. 11-12 Pebruari 1992. Bogor.
- [18] Sumantri, Gunawan A (2016) Penggunaan Dimethyl sulfoxide sebagai krioprotektan dalam pembekuan semen ayam kampung. Jurnal Veteriner 17(2): 300-308.
- [19] Kostaman T, Setioko AR (2011) Perkembangan penelitian teknik kriopreservasi untuk penyimpanan semen unggas. Wartazoa 21(3): 145-152.
- [20] Bebas W, Laksmi DNDI. (2014) Pengaruh berbagai konsentrasi dimethy sulfoxide terhadap kualitas semen beku ayam hutan hijau post thawing. Jurnal Ilmu dan Kesehatan Hewan 2(2): 105-115.
- [21] Roostika I, Mariska I (2017) Pemanfaatan teknik kriopreservasi dalam penyimpanan plasma nutfah tanaman. Buletin Plasma Nutfah 9 (2): 10-18.
- [22] Ming-Hua HSRY (2010) In vitro conservation of rare and endangered *Emmenopterys henryi* Oliv. Germplasm.

- Bulletin of Botanical Research 30 (2): 191-196.
- [23] Priadi D, Sudarmonowati E (1996) Vitrification of *Acacia mangium* and *Paraserianthes falcataria* shoot tips: Effect of vitrification solutions and thawing temperature. Proceedings of International Workshop on Biotechnology and Development of Species for Industrial Timber Estate, June, 1995, Cibinong, Indonesia.
- [24] Sudarmonowati E, Rosmithayani ES, Mulyaningsih, Priadi D, Sakai A (1998) Cryopreservation of shoot tips of two leguminous trees (*Acacia mangium* and *Paraserianthes falcataria*). Proceedings of International Workshop on Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. October) 20-27 October, 1998, Tsukuba, Japan
- [25] Priadi D, Sudarmonowati E, Arifani R, Farisy S (2000) Kriopreservasi sengon (*Paraserianthes falcataria*) dan mangium (*Acacia mangium* Willd.) dengan metode enkapsulasi dehidrasi. Prosiding Seminar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi III. Cibinong, 7-9 Maret 2000.
- [26] Pancaningtyas S (2013). Evaluasi kuantitas dan hiperhidrisitas embrio somatik kakao pada kultur padat, kultur cair, dan subkultur beruntun. Pelita Perkebunan 29 (1): 10-19.
- [27] Charoensub R, Hirai D, Sakai A (2004) Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of cassava by encapsulation-vitrification method. CryoLetters 25: 51-58.