

PENGAWETANKRIO BIJI BENIH *Cymbidium*
finlaysonianum DENGAN KAEDAH VITRIFIKASI

PATRICIA ANAK BALLA

PROGRAM BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

2014



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH



UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS

JUDUL: Pengawetan kuo Biji Benih Cymbidium finlaysonianum dengan kaedah vitifikasi

IJAZAH: Ijazah Sarjana Muda sains dengan Kepujian

SAYA: PATRICIA ANAK BALLA SESI PENGAJIAN: 2011/2014
(HURUF BESAR)

Mengaku membenarkan tesis (LPSM/Sarjana/Doktor Falsafah) ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:-

1. Tesis adalah hakmilik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sahaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi.
4. Sila tandakan (/)

☐ SULIT

(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di AKTA RAHSIA RASMI 1972)

☐ TERHAD

(Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)

☒ TIDAK TERHAD

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

Disahkan oleh: NURULAIN BINTI ISMAIL

LIBRARIAN

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

(TANDATANGAN PENULIS)

Alamat tetap: NO 23, Chelsea Heights,
P.O. Box 4302, Jalan Selink,
96800 Kapi, Sarawak,
Malaysia

PROF. MADYA DR ZALETTA ABDUL AZIZ
NAMA PENYELIA

Tarikh: 23 Jun 2014

Tarikh: 26/06/2014

Catatan :-

- * Potong yang tidak berkenaan.
- * Jika tesis ini SULIT atau TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa/organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu dikelaskan sebagai SULIT dan TERHAD.
- * Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana Secara penyelidikan atau disertai bagi pengajian secara kerja kursus dan Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM)

PERPUSTAKAAN UMS



* 1000358265 *



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGAWETANKRIO BIJI BENIH *Cymbidium*
finlaysonianum DENGAN KAEDAH VITRIFIKASI

PATRICIA ANAK BALLA

DISERTASI INI DIKEMUKAKAN UNTUK
MEMENUHI SEBAHAGIAN DARIPADA SYARAT
MEMPEROLEHI IJAZAH SARJANA MUDA SAINS
DENGAN KEPUJIAN

PROGRAM BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

2014



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang setiap satunya telah dijelaskan sumbernya.

16 MAY 2014



PATRICIA ANAK BALLA

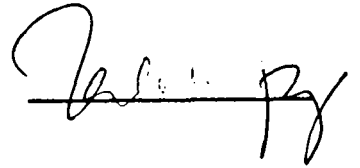
BS11110544

DIPERAKUKAN OLEH

PENYELIA

TANDATANGAN

DR ZALEHA ABDUL AZIZ

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Zaleha Abdul Aziz', written over a horizontal line.

PENGHARGAAN

Pertama sekali, ucapan terima kasih kepada Tuhan atas segala berkat dan pimpinan-Nya sepanjang proses penyiapan untuk projek tahun akhir ini. Dengan berkat pimpinan-Nya, saya mendapat kekuatan dalam menghadapi apa jua cabaran yang ada di hadapan saya dalam menyiapkan projek ini.

Terima kasih juga kepada kedua-dua ibu bapa saya atas sokongan moral dan juga kewangan yang mereka sediakan untuk saya dalam menyiapkan projek ini. Terima kasih juga untuk ahli keluarga yang lain kerana selalu memberi sokongan kepada saya.

Ucapan terima kasih dan penghargaan kepada supervisor saya iaitu Professor Madya Dr Zaleha Abdul Aziz di atas segala tunjuk ajar, bimbingan dan nasihat yang tidak putus-putus daripada beliau. Terima kasih juga kepada beliau atas radas-radas dan bahan-bahan kimia yang beliau kongsi dengan saya sepanjang kajian untuk projek ini dijalankan. Banyak perkara baru yang dapat saya pelajari daripada beliau.

Ucapan terima kasih juga kepada Puan Radizah dan Puan Marylin kerana telah bersusah payah menyediakan radas-radas dan bahan kimia yang saya perlukan untuk kegunaan dalam kajian ini. Terima kasih juga kepada rakan semakmal iaitu Mohd Syaihan, Frisca Raupit, Florisa Landa, Jane Justin dan Siti Aisyah kerana banyak membantu dalam proses menyiapkan projek 1 ini.

Sekali lagi saya ucapkan ribuan terima kasih dan penghargaan kepada semua pihak yang telah terlibat dalam membantu menyiapkan projek tahun akhir saya ini sama ada secara langsung ataupun tidak langsung. Terima kasih.

ABSTRAK

Kajian ini bertujuan untuk mewujudkan satu protokol pengawetan krio biji benih *C. finlaysonianum* melalui kaedah vitrifikasi bagi mengkaji pengaruh tempoh masa inkubasi di dalam larutan pemuat dan pengaruh tempoh masa penyimpanan di dalam cecair nitrogen ke atas kemandirian biji benih *C. finlaysonianum*. Biji benih *C. finlaysonianum* yang dituai enam bulan selepas proses pendebungaan telah disimpan secara langsung ke dalam LN dan juga diawetkrio melalui kaedah vitrifikasi. Viabiliti biji benih diuji berasaskan ujian TTC dan ujian percambahan. Bagi mengkaji pengaruh tempoh masa inkubasi biji benih di dalam larutan pemuat, biji benih dirawat dengan menggunakan larutan pemuat pada suhu 25°C selama 0 minit, 15 minit, dan 60 minit. Biji benih telah didehidrasi menggunakan larutan PVS2 selama 60 minit di atas ais dan kemudian disimpan di dalam cecair nitrogen. Bagi mengkaji tempoh masa penyimpanan biji benih di dalam cecair nitrogen, biji benih dirawat dengan kaedah vitrifikasi sebelum disimpan di dalam cecair nitrogen selama 1 jam, 1 hari, 2 minggu dan 2 bulan. Hasil kajian menunjukkan peratusan viabiliti biji benih yang tidak dirawat dengan larutan pemuat adalah yang tertinggi iaitu sebanyak $90.96 \pm 1.0\%$. Peratusan viabiliti biji benih yang disimpan pada tempoh masa 1 jam di dalam LN adalah paling tinggi iaitu $94.7 \pm 1.2\%$. Tiada percambahan berlaku bagi biji benih *C. finlaysonianum* yang dirawat menggunakan kaedah vitrifikasi. Selepas 5 bulan dikultur di atas media percambahan NDM, biji benih yang telah disimpan secara terus ke dalam cecair nitrogen membentuk protokom, akar rhizoid, dan mengeluarkan pucuk. Tempoh masa inkubasi biji benih di dalam larutan pemuat mempengaruhi kadar viabiliti dan percambahan biji benih secara negatif. Tempoh masa penyimpanan biji benih di dalam cecair nitrogen juga mempengaruhi kadar viabiliti dan percambahan biji benih secara negatif.

ABSTRACT

*This work was carried out to establish a method for the vitrification and cryopreservation of seeds of *C. finlaysonianum* by evaluating the effects of exposure time to loading solution (LS) and the storage time in liquid nitrogen (LN) on the survival rates of the seeds. The seeds of *C. finlaysonianum*, harvested 6 months after self pollination, were directly plunged into liquid nitrogen and were cryopreserved by vitrification prior to storage in LN. Seed viability was assessed based on TTC staining and seed germination. For the study of seed's exposure time in LS, seeds were treated with LS at 25°C for 0, 15, and 60 minutes and dehydrated with PVS2 solution for 60 minutes on ice and then stored in LN. For the study of seeds storage time in LN, seeds were treated with vitrification technique and then stored in LN for 1 hour, 1 day, 2 weeks and 2 months. The results showed seeds that were not treated with LS had the highest, which is $90.96 \pm 1.0\%$. The viability percentage of seeds that was stored in LN for 1 hour was the highest, which is $94.7 \pm 1.2\%$. There was no germination observed for the seeds that were cryopreserved through vitrification technique. After 5 months sown on the germination medium, protocorms of seeds that were directly plunging into liquid nitrogen were formed and developed shoots. The viability and germination of seeds were negatively affected by the exposure time in LS. The storage time of seeds in LN also negatively affects the rates of viability and germination of the seeds.*

KANDUNGAN

SURAT	MUKA
PENGAKUAN	i
PERAKUAN	ii
PENGHARGAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
SENARAI KANDUNGAN	vi
SENARAI JADUAL	x
SENARAI RAJAH	xi
SENARAI FOTO	xii
SENARAI SIMBOL DAN SINGKATAN	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Pengenalan	1
1.2 Objektif Kajian	3
BAB 2 ULASAN PERPUSTAKAAN	4
2.1 Orchidaceae	4
2.1.1 Struktur Umum Orkid	4
2.1.2 Genus <i>Cymbidium</i> dan <i>Cymbidium finlaysonianum</i>	6
2.2 Biji Benih Orkid	8
2.3 Pengawetan Krio	9
2.4 Kaedah Vitrifikasi	10
2.5 Ujian Viabiliti TTC	13

BAB 3 BAHAN DAN KAEDAH	14
3.1 Sumber Eksplan	14
3.2 Pensterilan Permukaan Kapsul Biji Benih <i>Cymbidium finlaysonianum</i>	14
3.3 Ujian Viabiliti Biji Benih	15
3.3.1 Penyediaan Larutan Penimbal Fosfat	15
a) Penyediaan larutan 0.1 M NaH_2PO_4	16
b) Penyediaan larutan 0.1 M Na_2HPO_4	16
3.3.2 Penyediaan Larutan TTC	17
3.4 Ujian Paras kelembapan biji benih	17
3.5 Penyediaan Larutan Stok	18
3.5.1 Penyediaan Larutan Stok Makronutrien NDM	18
3.5.2 Penyediaan Larutan Stok Mikronutrien NDM	19
3.5.3 Penyediaan Larutan Stok Vitamin NDM	20
3.5.4 Penyediaan Larutan Stok Besi NDM	21
3.6 Penyediaan Medium NDM	22
3.6.1 Penyediaan Medium Percambahan NDM	22
3.6.2 Penyediaan Media Prakultur NDM	23
3.6.3 Penyediaan Media Cecair NDM	24
3.7 Penyediaan Larutan Pemuat	24
3.8 Penyediaan larutan vitrifikasi (PVS2)	25
3.9 Penyediaan Larutan Penurunan	26
3.10 Pensterilan Biji Benih	26
3.11 Penyimpanan Biji Benih Secara Langsung Ke Dalam Cecair Nitrogen	27
3.12 Rawatan Prakultur	27
3.13 Proses Pengawetankrio Menggunakan Vitrifikasi	27
3.13.1 Pemuatan, dehidrasi dan pembekuan	28
a) Mengkaji Tempoh Masa Pendedahan Biji Benih kepada Larutan Pemuat	28

b) Mengkaji Tempoh Masa Penyimpanan Biji Benih di dalam Cecair Nitrogen	30
3.13.2 Penyahbekuan, Penurunan, Dan Pemulihan	32
3.14 Cerapan Data	32
3.14.1 Ujian Viabiliti	32
3.14.2 Ujian Percambahan Semula	33
BAB 4 KEPUTUSAN DAN ANALISIS DATA	35
4.1 Sumber Eksplan	35
4.2 Ujian Viabiliti Biji Benih <i>C. finlaysonianum</i> setiap minggu	36
4.3 Paras Kelembapan Biji Benih <i>C. finlaysonianum</i>	38
4.4 Penyimpanan Biji Benih Secara Langsung Ke Dalam Cecair Nitrogen	39
4.5 Pengaruh Tempoh Masa Inkubasi Biji Benih di dalam Larutan Pemuat ke atas Viabiliti Biji Benih berasaskan Kaedah TTC	41
4.6 Pengaruh Tempoh Masa Penyimpanan Biji Benih di dalam Cecair Nitrogen ke atas Viabiliti Biji Benih berasaskan TTC	42
4.7 Percambahan Biji Benih Orkid <i>C. finlaysonianum</i>	44
4.8 Pengaruh Tempoh Masa Inkubasi Biji Benih di dalam Larutan Pemuat ke atas Percambahan Biji Benih	45
4.9 Pengaruh Tempoh Masa Penyimpanan Biji Benih di dalam Cecair Nitrogen ke atas Percambahan Biji Benih	46
BAB 5 PERBINCANGAN	
5.1 Ujian Viabiliti Biji Benih Mingguan Berasaskan TTC	47
5.2 Penyimpanan Biji Benih Secara Langsung Ke Dalam Cecair Nitrogen	49
5.3 Pengaruh Tempoh Masa Inkubasi Biji Benih di dalam Larutan Pemuat ke atas Viabiliti Biji Benih berasaskan Kaedah TTC dan Percambahan biji benih	50
5.4 Pengaruh Tempoh Masa Penyimpanan Biji Benih di dalam Cecair Nitrogen ke atas Viabiliti Biji Benih berasaskan TTC dan dan Percambahan biji benih	52

BAB 6 KESIMPULAN	53
RUJUKAN	54
LAMPIRAN	61

SENARAI JADUAL

No. Jadual	Muka Surat
3.1 Komposisi 0.1 M Larutan Penimbal Fosfat	15
3.2 Senarai Komposisi Bahan Kimia untuk Penyediaan Larutan Stok Makronutrien NDM (X10)	19
3.3 Senarai Bahan Kimia dan Kuantiti untuk Penyediaan Larutan Stok Mikronutrien NDM (X100)	20
3.4 Senarai Bahan Kimia dan Kuantiti untuk Penyediaan Larutan Stok Vitamin NDM (X100)	21
3.5 Senarai Bahan Kimia dan Kuantiti untuk Penyediaan Larutan Stok Besi NDM (X10)	21
3.6 Senarai Larutan Stok dan Komponen yang diperlukan dalam Penyediaan Medium Pencambahan NDM	23
3.7 Komposisi Bahan-bahan Kimia untuk Penyediaan Larutan Pemuatan	25
3.8 Komposisi Bahan Kimia untuk Penyediaan Larutan Vitrifikasi Tumbuhan (PVS2)	25
4.1 Kadar viabiliti dan percambahan biji benih yang disimpan secara langsung ke dalam cecair nitrogen	39
4.2 Pengaruh Jangka masa inkubasi biji benih di dalam larutan pemuat ke atas viabiliti biji benih berasaskan TTC	41
4.3 Perbandingan antara viabiliti biji benih berasaskan ujian TTC bagi biji benih kawalan I dan II dengan biji benih kajian bagi pengaruh tempoh masa penyimpanan di dalam LN	43
4.4 Pengaruh jangka masa inkubasi biji benih di dalam larutan pemuat ke atas percambahan biji benih	45
4.5 Pengaruh tempoh masa penyimpanan biji benih di dalam cecair nitrogen ke atas percambahan biji benih <i>C. finlaysonianum</i>	46

SENARAI RAJAH

No. Rajah		Muka
Surat		
3.1	Carta aliran untuk mengkaji kesan tempoh masa pendedahan biji benih <i>C. finlaysonianum</i> kepada larutan pemuat	29
3.2	Carta aliran untuk mengkaji kesan tempoh masa penyimpanan biji benih <i>C. finlaysonianum</i> di dalam cecair nitrogen	31

SENARAI FOTO

No. Foto	Muka Surat
2.1 Struktur umum bunga orkid	5
2.2 Bunga orkid <i>C. finlaysonianum</i>	7
2.3 Peringkat Perkembangan Biji Benih Orkid	8
4.1 Kapsul dan Biji Benih <i>C. finlaysonianum</i>	35
4.2 Ujian Viabiliti biji benih <i>C. finlaysonianum</i> berasaskan TTC	37
4.3 Peringkat perkembangan biji benih yang tidak disteril dan disimpan secara terus ke dalam LN	40
4.4 Percambahan biji benih <i>C. finlaysonianum</i>	44

SENARAI SIMBOL DAN SINGKATAN

%	Peratus
&	Dan
/	Pembahagi
=	sama dengan
±	Sisihan piawai
NDM	Medium New Dogashima
μL	Mikroliter
μm	Micrometer
cm	Sentimeter
°C	Darjah Celsius
CITES	Convention of International Trade in Endangered Species of Wild Fauna & Flora
DMSO	Dimethyl Sulfosida
g/L	Gram per liter
L	Liter
M	Molar
Mg	milligram
PVS2 s	Larutan vitrifikasi tumbuhan (<i>Plant Vitrification Solution 2</i>)
Min	Minit
TTC	2,3,5-Trifeniltetrazilium klorida
v/v	Isipadu per isipadu
w/v	Jisim per isipadu
SP	Sisihan Piawai
LN	Cecair Nitrogen (<i>Liquid nitrogen</i>)
VW Medium	Vacin and Went Medium

BAB 1

PENDAHULUAN

1.0 Pengenalan

Orkid (Orchidaceae) adalah famili terbesar dalam kumpulan Angiosperma dengan lebih 30,000 spesis (Chugh *et al.*, 2009). Orkid tumbuh di serata kawasan di atas muka bumi kecuali di padang pasir dan kawasan artik, dimana ia meliputi 90% kawasan Asia yang beriklim tropika, Afrika dan Amerika Selatan. Orkid boleh didapati dalam pelbagai saiz, bentuk dan warna (Antony *et al.*, 2011). Orkid juga terkenal sebagai tanaman hiasan dan memainkan peranan yang sangat penting dalam industri bunga-bunga, dimana dengan bunganya yang cantik dan tahan lama, ianya boleh didapati dengan harga yang tinggi di pasaran domestik dan antarabangsa (Saiprasad dan Polisetty, 2003). Permintaan terhadap orkid yang semakin meningkat daripada para penggemar dan penanam orkid telah menyebabkan banyak tanaman hiasan dikumpul dan dijual setiap tahun (Johnson, 2010). Perusahaan orkid yang berjaya sebagai tanaman hiasan dapat dilihat di beberapa buah negara seperti di Thailand dan Singapura. Selain memainkan peranan penting dalam industri bunga-bunga, orkid juga mampu menarik minat para pelancong untuk melancong ke dalam negara untuk melihat variasi orkid popular yang unik dan cantik.



Namun terdapat ancaman global yang serius terhadap tumbuhan orkid seperti perubahan dan kehilangan habitat, penerokaan hutan dan pembalakkan secara haram, dan pembakaran hutan secara terbuka adalah antara penyumbang kepada kepupusan orkid (Siregar, 2008). Jalal (2012), Hirono *et al.*, (2004), dan Dixon *et al.*, (2003) juga melaporkan bahawa spesies orkid berhadapan dengan risiko kepupusan akibat dari kehilangan habitat yang disebabkan penerokaan hutan yang berleluasa, pembalakkan yang tidak terkawal, pemerdagangan orkid liar secara haram dan pelbagai faktor lain. Hasilnya, banyak spesies tanah rendah sukar untuk ditemui dan terancam malah sesetengah spesies orkid hampir pupus.

CITES (*Convention of International Trade In Endangered Species of Wild Fauna and Flora*) merupakan undang-undang dunia yang ditubuhkan untuk melindungi spesies yang hampir pupus dan menghadkan perdagangan haram hidupan liar antarabangsa. CITES telah meletakkan semua spesies Orchidaceae sebagai salah satu tumbuhan yang terancam di bawah lampiran II, bermakna semua perdagangan yang melibatkan orkid hanya dibenarkan melalui permit eksport sahaja (Gogoi *et al.*, 2012; Jalal, 2012). IUCN (*The International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*) juga telah menyenaraikan hampir kesemua spesies orkid sebagai salah satu spesies terancam di Buku Data Merah (*Red Data Book*). Di Rusia, beberapa dozen daripada 150 spesies orkid telah dikenalpasti dan direkodkan sebagai spesies yang hampir pupus (Yin *et al.*, 2011). *Cymbidium finlaysonianum* merupakan antara salah satu spesies orkid yang telah disenaraikan sebagai species terancam oleh IUCN dan juga CITES dibawah Appendix II (Jalal, 2012). Di singapura, *C. finlaysonianum* telah tersenarai sebagai salah satu spesies orkid yang berkemungkinan akan terancam jika tidak dikawal pada masa akan datang (Tim *et al.*, 2010). Oleh itu, germplasma orkid *C. finlaysonianum* harus dipulihara agar tidak menghadapi risiko kepupusan pada masa akan datang.

Kaedah pengawetan krio dikira sebagai salah satu kaedah alternatif terbaik untuk memulihara dan melindungi orkid daripada kepupusan. Pengawetankrio telah diaplikasikan ke atas beberapa bahagian orkid seperti bahagian pucuk, embrio somatik, protokom dan sebagainya (Nabila *et al.*, 2009). Pengawetan krio biji benih

orkid liar adalah salah satu kaedah pemuliharaan yang penting (Hu *et al.*, 2013). Kaedah pengawetan krio biji benih melibatkan di mana sel atau keseluruhan tisu di awet dengan cara penyejukan hingga di bawah dari suhu sifar (-196°C), iaitu suhu bagi takat didih cecair nitrogen (Karta, 1985).

1.2 Objektif Kajian

Di dalam kajian ini, kaedah vitrifikasi telah digunakan untuk mengawetkrio biji benih *C. finlaysonianum*. Mewujudkan satu protokol pengawetan krio dengan kaedah vitrifikasi bagi penyimpanan jangka masa panjang biji benih *C. finlaysonianum* di dalam cecair nitrogen, dan juga pendedahan biji benih *C. finlaysonianum* kepada larutan pemuat mungkin berguna untuk pemuliharaan spesies dan juga penyimpnan jangka masa panjang germplasma orkid dari genus yang sama pada masa akan datang. Oleh itu, kajian ini dijalankan bertujuan untuk:

1. Mengkaji kesan penyimpanan secara langsung biji benih di dalam cecair nitrogen ke atas viabiliti dan percambahan biji benih *C. finlaysonianum*;
2. Mengkaji pengaruh tempoh masa inkubasi larutan pemuat ke atas viabiliti dan percambahan biji benih *C. finlaysonianum* dan;
3. Mengkaji pengaruh tempoh masa penyimpanan biji benih *C. finlaysonianum* di dalam cecair nitrogen ke atas viabiliti dan percambahan biji benih.

BAB 2

ULASAN PERPUSTAKAAN

2.1 Orchidaceae

Malaysia mempunyai lebih daripada 120 genus serta 800 spesies orkid liar. Di bahagian Timur Malaysia (Sabah dan Sarawak) sahaja terdapat lebih kurang 200 spesies orkid liar yang mempunyai pelbagai bentuk dan ciri-ciri menarik tersendiri (Rejab, 1999). Menurut Cribb (1997), Borneo merupakan salah satu kawasan yang kaya dengan orkid. Terdapat kira-kira 2500 hingga 3000 spesies orkid telah ditemui di Borneo iaitu merangkumi sepuluh peratus daripada orkid dunia (Chan *et al.*, 1994). Kepelbagaian orkid kebanyakannya tertumpu di Gunung Kinabalu, Sabah dimana lebih 720 genus spesies orkid telah direkodkan (Wood, 2003). Namun, kebanyakan orkid kini berada di tahap bahaya dan diancam risiko kepupusan.

2.1.1 Struktur umum orkid

Struktur orkid terdiri daripada beberapa bahagian iaitu bunga, buah kapsul, daun, batang dan akar. Terdapat lima bahagian utama seperti sepal, petal, benang sari, putik dan ovari menjadi asas kepada struktur bunga orkid (Gunawan, 1992). Kebiasaannya terdapat tiga sepal diluar dan tiga sepal di sebelah dalam. *Labellum* ataupun bibir untuk setiap orkid

adalah berbeza dan berwarna lebih cerah, dan sering dihinggap oleh serangga (Gunawan, 1992). Kolum orkid mengandungi satu struktur yang mencantumkan bahagian pembiakan lelaki dan perempuan (McConnel & Cruz, 1996). Foto 2.1 menunjukkan struktur umum bunga orkid.

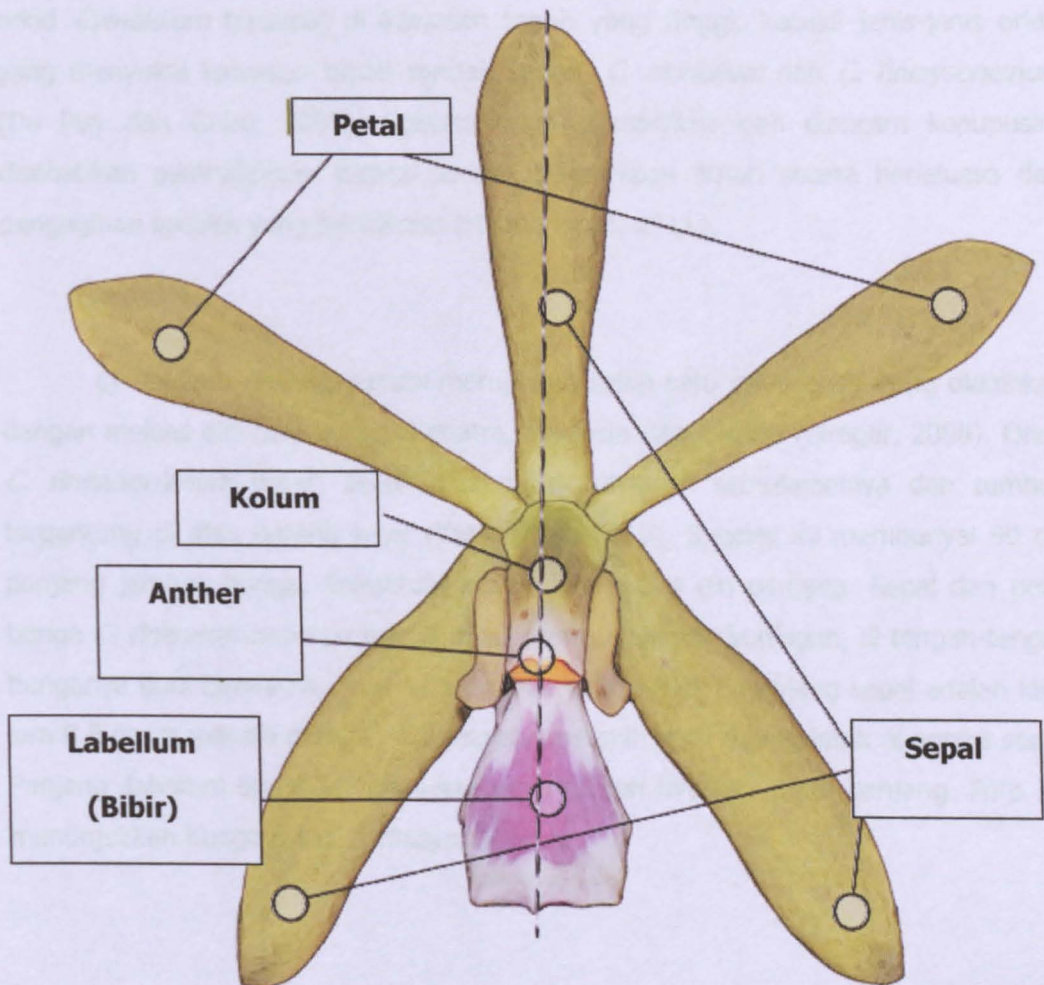


Foto 2.1: Struktur umum bunga orkid. Sumber diperoleh dari <http://www.flnativeorchids.com/observing.htm>

2.1.2 Genus *Cymbidium* dan *Cymbidium finlaysonianum*

Genus orkid *Cymbidium* merangkumi kira-kira 52 spesies berasal dari bahagian Asia di antara bahagian barat laut Himalaya hingga Jepun dan dari Indochina dan Malaysia hingga utara dan timur Australia (Du Puy dan Cribb, 2007). Pada umumnya, orkid *Cymbidium* terdapat di kawasan tanah yang tinggi, kecuali jenis-jenis orkid yang menyukai kawasan tanah rendah seperti *C. aloifolium* dan *C. finlaysonianum* (Du Puy dan Cribb, 2007). Spesies orkid *Cymbidium* kian diancam kepupusan disebabkan pembalakkan secara haram, penerokaan hutan secara berleluasa dan pengagihan spesies yang berleluasa (Hirano *et al.*, 2011).

Cymbidium finlaysonianum merupakan salah satu orkid epifit yang diagihkan dengan meluas diantara benua Sumatra, Malaysia dan Filipina (Siregar, 2008). Orkid *C. finlaysonianum* masih boleh didapati di kawasan semulajadinya dan tumbuh tergantung di atas batang kayu (Yam *et al.*, 2010). Spesies ini mempunyai 90 cm panjang jambak bunga. Sekuntum bunga kira-kira 4 cm panjang. Sepal dan petal bunga *C. finlaysonianum* berwarna hijau suram kekuning-kuningan, di tengah-tengah bunganya pula berwarna ungu suram (Yam *et al.*, 2010). Panjang sepal adalah kira-kira 0.8 cm manakala petal *C. finlaysonianum* lebih kecil dan terletak di antara sepal. Panjang *labellum* bunga *C. finlaysonianum* adalah kira-kira 2 cm panjang. Foto 2.2 menunjukkan bunga orkid *C. finlaysonianum*.



Foto 2.2: Bunga orkid *C. finlaysonianum*. Sumber diperolehi daripada <http://www.rv-orchidworks.com/orchidtalk/orchids-other-genera-bloom/35975-cymbidium-finlaysonianum-2013-a.html>

Menurut Siregar (2008), *C. finlaysonianum* merupakan salah satu daripada orkid yang berasal daripada Borneo. Species ini telah disenaraikan sebagai species terancam oleh IUCN and juga tersenarai dalam CITES (Convention of International Trade in Endangered Species of Wild Fauna & Flora) dibawah Appendix II (Jalal, 2012). Tim *et al.* (2010) melaporkan bahawa di Singapura, *C. finlaysonianum* telah tersenarai sebagai salah satu spesies orkid yang berkemungkinan akan terancam jika tidak dikawal pada masa akan datang (*critically endangered species*). Oleh itu, ia nya amatlah penting untuk memelihara germplasma orkid *C. finlaysonianum*.

2.2 Biji Benih Orkid

Biji benih orkid adalah berlainan dengan biji benih tumbuhan yang lain. Ini adalah disebabkan saiznya yang sangat kecil seperti habuk. Saiz biji benih orkid hanyalah dalam lingkungan 1.0 hingga 2.0 mm panjang dan 0.5 hingga 1.0 tebal (Chawla, 2002). Biji benih orkid terdapat dalam kapsul atau testa yang berfungsi untuk melindungi embrio dari serangan mikrob. Di dalam kapsul tersebut terdapat beribu-ribu biji benih yang belum disenyawakan (Thammasiri dan Soamkul, 2007) dan merupakan biji benih yang paling kecil di antara tumbuhan yang berbunga (Chan *et al.*, 1994). Biji benih orkid yang halus dan sangat kecil menyebabkan ia boleh tersebar melalui udara.

Proses percambahan biji benih orkid melibatkan 6 peringkat di mana setiap peringkat akan menunjukkan ciri-ciri yang berlainan (Foto 2.3). Menurut Yamazaki dan Miyoshi (2006), enam peringkat percambahan biji benih adalah peringkat 0 ialah peringkat dimana tiada percambahan biji benih yang berlaku. Peringkat satu pula ialah peringkat pra-percambahan dimana embrio biji benih membengkak tetapi masih berada di dalam testa. Pada peringkat dua, testa akan mula pecah dan hilang sementara embrio biji benih masih membengkak. Peringkat tiga ialah peringkat pembentukan protokom dimana embrio biji benih telah keluar dari testa. Peringkat empat pula ialah peringkat dimana rhizoid tumbuh dari permukaan protokom, dan pada peringkat lima iaitu peringkat terakhir, pucuk akan tumbuh dari protokom.

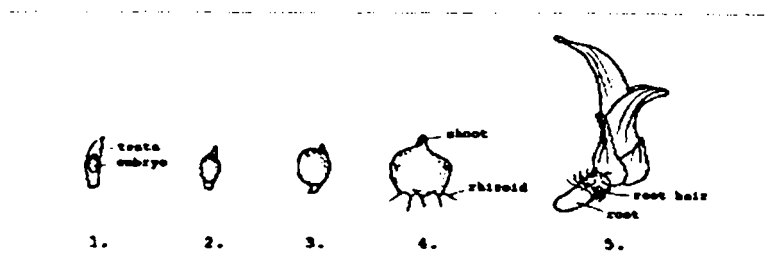


Foto 2.3: Peringkat perkembangan biji benih orkid. 1. Biji benih orkid, 2. Peringkat awal percambahan biji benih, 3. Pembentukan protokom, 4. Pembentukan rhizoid dan pucuk, 5. Penyemaian biji benih

(Sumber diperolehi daripada <http://culturesheet.org/orchidaceae:chysis:bractescens>)

RUJUKAN

- Allahbadia, G. dan Merchant R. 2006. *Contemporary Perspectives on Assisted Reproductive Technology*. Elsevier, India.
- Anthohy , J. J. J., Sinniah, U. R., Keng, C. L., Pobathy, R., Khoddamzadeh, A. A., Subramaniam, S. 2011. Selected potential encapsulation-dehydration parameters on *Dendrobium* Bobby Messina protocorm-like bodies using TTC analysis. *AJSC*, **5**(13):1817-1822.
- Anthohy , J. J. J., Hazirah, B., Sinniah, U. R., Poobathy, R., Subramaniam, S. 2013. Effects of PVS2 vitrification on *Brassidium* shooting star orchid using protokom-like bodies (PLBs). *AJCS*, **7**(8):1078-1084.
- Ashmore, S. E. 1997. *Status Report on the Development and Application of In Vitro Conservation and Use of Plant Genetic Resources*. IPGRI, Rome, Italy.
- Brown, A. H. D. 2000. The genetic structure of crop landraces and the challenge to conserve them *in situ* on farms. Dlm: Brush, S. B. (pnyt.) *Genes in the Field: On Farm Conservation of Crop Diversity*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Chan, C. L, Lamb, A., Shim, P. S., & Wood, J. J. 1994. *Orchids of Borneo*. The Sabah Society Malaysia: Natural History Publications.
- Chang, C., Chen, C. T., Tsai, T. C., and Chang, W. C. 2000. A tissue culture protocol for propagation a rare plant species *Lilium speciosum* Thunb var. *gloriosoides* Baker. *Bot Bull Acad Sin*, **41**: 139-142.
- Chawla, H. S. 2002. *Introduction to Plant Biotechnology*. Science Publishers.
- Chugh, S., Guha, S., Usha Rao, I. 2009. Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. *Sci Hort*, **22**: 507-520
- Cribb, P. 1997. *Slipper Orchids of Borneo*. Natural History Publication (Borneo) Sdn. Bhd., Sabah.

- Day, J. G., dan Stacey, G. N. 2007. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. In: Pegg, D. E. (eds). *Principles of Cryopreservation*. Second edition. Humana Press Inc., New Jersey.
- Dixon, K. W., Kell, S. P., Barrett, R. L., and Cribb, P. J. 2003. *Orchids Conservation*. Natural history Publications (Borneo).
- Du Puy, D., dan Cribb, P. 2007. *The genus cymbidium*. Royal Botanic Gardens, Richmon.
- Engelmann, F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: Engelmann F., and Takagi, H. (eds). *Cryopreservation of tropical plant germplasm*. IPGRI, Italy.
- Engelmann, F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, **47**:5-16.
- Gayle, M. W & Walter, C. 2005. Plant virification solution 3 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. *National Center for Genetic Resources Preservation, United States Department of Agriculture*, 11111 S, Mason St., Ft. Collin, CO 80521 USA.
- Gogoi, K., Kumaria, S., Tandon, P. 2012. *Ex situ* conservation of *Cymbidium eburneum* Lindl.; A threatened and vulnerable orchid, by asymbiotic seed germination. *3 Biotech*, **2**: 337-343
- Gogoi, K., Kumaria, S., Tandon, P. 2013. Cryopreservation of *Cymbidium eburneum* Lindl. and *Cymbidium hookerianum* Rchb. F, two threatened and vulnerable orchids via encapsulation-dehydration.
- Gonzalez-Benito ME, Fernandez-Llorente F, Perez-Garcia F (1998) Interaction between cryopreservation, rewarming rate and seed humidification on the germination of two Spanish endemic species. *Ann Bot* **82**:683–686
- Gonzales-Arno, M. T., Panta, A., Roca, W. M., Escobar, R. H. & Engelmann, F. 2008. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **92**:1-13.

- Gunawan, L. W. 1992. *Budidaya Anggerik*. Ed ke-6. PT Penebar Swadaya, Jakarta.
- Hieber, D. A., Rasika, G., Mudalige, J., Adelheid, R., & Kuehnle, A. 2006. Color genes in the orchid *Oncidium* Gower Ramsey: identification, expression and potential genetic instability in an interspecific cross. *Planta*, **223**: 521-531.
- Hirano, T., Ishikawa, K., Mii, M. 2004. Cryopreservation of immature seeds of *Ponerorchis-gramanifolia* var *suzukiana* by vitrification. *Cryoletters*, **26**: 139-146.
- Hirano, T., Godo, T., Mii, M., Ishikawa, K. 2005. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. *Plant Cell Rep*, **23**(8): 534-539.
- Hirano, T., Godo, T., Miyoshi, K., Ishikawa K., Ishikawa, M. and Mii, M. 2009. Cryopreservation and low-temperature storage of seeds of *Phaius tankervilleae*. *Plant Biotechnol Rep*, **3**:103-109.
- Hirano, T., Yukawa, T., Miyoshi, K. and Mii, M. 2011. Wide applicability with vitrification method for seeds of some *Cymbidium* species. *Plant Biotechnology*, **28**:99-102.
- Hu, W. H., Yang, Y. H., Liaw, S. L. and Chang, C. 2013. Cryopreservation the seeds of a Taiwanese terrestrial orchid, *Bletilla formosana* (HAYATA) Schltr. by vitrification. *Botanical Studies*, **54**:33.
- Ishikawa, K., Harata, K., Mii, M., Sakai A., Yoshitmasu, K., and Shimonura, K. 1997. Cryopreservation of zygotic embryo on Japanese terrestrial orchid (*Bletilla Striata*) by vitrification. *Plant Cell Rep*, **16**: 754-757.
- Jalal, J. S. 2012. Status, threats and conservation strategies for orchids of Western Himalaya, India. *Journal of Threatened Taxa*, **4**(15):3401-3409.
- Jitsopakul, N., Thammasiri, K., Yukawa, T., and Ishikawa, K. 2012. Effect of cryopreservation on seed germination and protocorm development of *Vanda tricolor*. *Science Asia*, **38**:244-249.
- Johnson, L. 2010. *Orchids*. London: Royal Horticultural Society.
- Karta, K. K. 1985. *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*. CRC Press, Boca Raton, Florida.

- Karta, K. K, and Engelmann, F. 1994. Cryopreservation and gerplasm storage. In: Vasil, I. K., Thorpe, T. A. (eds). *Plant Cell and Tissue Culture*. Springer.
- Kull, T., and Arditti, J. (Eds). 2002. *Orchid Biology Reviews and Perspectives VIII*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands and Boston, MA.
- Khoddamzadeh, A. A., Sinniah, U. R., Lynch, P., Kadir, M. A., Kadzimin, S. B. & Mahmood, M. 2011. Cryopreservation of protocorm-like bodies (PLBs) of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) christenson by encapsulation-dehydration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **107**:471-478.
- Lauzer D, St-arnaud M, Barabe D. 1994. Tetrazolium staining and in vitro germination of mature seeds of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). *Lindleyana* **9**:197–204
- Liggio, J., Liggio, A.O. and Riskind, D.H. 2010. *Wild Orchids of Texas*. University of Texas Press.
- Matsumoto, T., Sakai, A., Yamada, K. 1994. Cryopreservation of in vitro grown apical meristems of wasabi (*Wasabi japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. *Plant Cell Reports*, **13**: 442-446.
- Melo, C. G., Barbosa, M. H. P., Motoike, S. Y., Sabino, M. V., Ventrella, M. V., Petemelli, L. A. & Olivia, M. A. R. 2010. Preculture sugarcane in sucrose-supplemented culture medium to induce dessication tolerance. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, **11**: 320-329.
- Nabila, J., Chan, L. K., Rathinam, X. & Subramaniam, S. 2009. Cryopreservation of *Brassia rex* orchid shoots using PVS2 technique. *Research Journal of Botany*, **4**: 74-88.
- Niino, T. Sakai, A., Yakuwa H., dan Nojiri, K. 1992. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **28**: 261-266.
- Nikishina, T. V., Popov, A. S., Kolometseva, G. L., Golovkin, B. N. 2001. Effect of cryopreservation on seed germination of rate tropical orchids. *Russ J Plant Physiol*, **48**:810-815

- Panis, B., Totte, N., Piette, B., and Swennen, R. 2005. Droplet vitification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. Cryopreservation of banana (*Muss* Ispp.). *Plant Science*, **168**:45-55.
- Pegg, D. 2010. Cryopreservation. Dlm: Galea G., (pnyt.). *Essentials of Tissue Banking*. Springer, Berlin.
- Pence, V. C. 1995. Cryopreservation of recalcitrant seed. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, **32**:29-50.
- Popov A. S., Popova E. V., Nikishina T. V., Kolomeitseva G. L. 2004. The development of juvenile plants of the hybrid orchid *Bratonia* after seed cryopreservation. *Cryo-Letters*, **25**:205–221
- Popova EV, Nikishina TV, Kolometseva GL, Popov AS (2003) The effect of seed cryopreservation on the development of protocorms by the hybrid orchid *Bratonia*. *Russ J Plant Physiol*, **50**:672–677
- Poobathy, R., Azwa, N., Julkifle, A. L., Subramaniam, S. 2013. Cryopreservation of *Dendrobium* Sonia-28 using an alternative method of PVS2 droplet freezing. *Emir. J. Food Agric*, **25**(7):531-538.
- Pritchard, H. W. & Predergast, F. G. 1990. Viability testing in terrestrial orchid seed. *Acta Universitatis Wratislaviensis*, **1055**:11-16
- Rasmussen H. N. 1995. Cultivation of immature seed. In: Rasmussen HN (ed) *Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Saiprasad, G. V. S., and Pollisetty R. 2003. Propagation of three orchid genera using encapsulated protocorm-like bodies. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, **39**:42-48.
- Safrinah, R., Xavier, R. & Sreeramanan, S. 2009. Optimisation of cryopreservation technique in *Mokara* Golden Nugget using PVS2 vitrification. *International Journal of Agricultural Research*, **4**: 218-227.
- Sakai, A. dan Engelman, F. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *Cryoletters*, **21**:237-244.

- Subramaniam, S., Sinniah, U. R., Khoddamzadeh, A. A., Periasamy, S., James, J. J. 2011. Fundamental concept of cryopreservation using *Dendrobium Sonia-17* protocormlike bodies by encapsulation dehydration technique. *Afr J Biotechnol.*, **10** (19):3902-3907.
- Siregar, C. 2008. Exploration and inventory of native orchid germplasm in West Borneo, Indonesia. *HortScience*, **43**(2):554-557.
- Swart, N. D. & Dixon, K. W. 2009. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany*, **104**: 543-556.
- Takagi, H., Tien Thinh, N., Islam, O. M., Senboku, T., Sakai, A. 1997. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. *Plant Cell Rep*, **16**(9): 594-599.
- Thammasiri, K. 2000. Cryopreservation of seeds of a Thai orchid (*Doritis Pulcherrima* lindl.) by vitrification. *Cryo Letters*, **21**(4): 237-244.
- Thammasiri, K. and Soamkul, L. 2007. Cryopreservation of *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. seeds by vitrification. *ScienceAsia*, **33**:223-227.
- Tim W. Y., Jenny, C., Felicia, T., Peter, A. 2010. Conservation of the native orchids through seedling culture and reintroduction-a singapore experience. *Botanical Review*, **76**:263-274.
- Tokuhara, K. and Mii, M. 1993. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Reports*, **13**:7-11.
- Tsai, S. F., Yeh, S. D., Chan, C. F., Liaw, S. I. 2009. High-efficacy vitrification protocols for cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of transgenic papaya lines. *Plant Cell Tissue Org Cult*, **98**:157-164.
- Van Waes, J.M. Debergh, P.C. 1986. Adaptation of the tetrazolium method for testing the seed viability, and scanning electron microscopy study of some Western European orchids. *Physiology of Plants*, **66**: 435-442.

- Volk, G. M dan Walters, C. 2006. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior shoot tips during cryoprotection. *Cryobiology*, **52**:48-61.
- Voronkova N. M., Kholina A. B. 2010. Conservation of endemic species from the Russian far east using seed cryopreservation. *Biol Bull*, **37**:469–501.
- Vujanovic, V., ST-Arnaud, M., Barabe, D., Thibeault, G. 2000. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. *Annals of Botany*, **86**: 79-86.
- Wang, J. H., Ge, J. G., Liu, F., Brian, H. W., Huang, C. N. 1998. Cryopreservation of seeds and protocorms of *Dendrobium candidum*. *Cryo-Letters*, **19**:123-128.
- Wood, J. J. (2003). *Orchids of Borneo*. Volume 4. Kota Kinabalu: Sabah Society.
- White, J. (2009). *Bloom-again Orchids*. Portland: Timber Press, Inc.
- Yam, T. W., Chua, J, Tay, F. and Ang, P. 2010. Conservation of the native orchids through seedling culture and reintroduction-a Singapore experience. *The Botanical Review*.
- Yin, L. L, Poobathy, R., James, J., Julkifle, A. L., Subramaniam, S. 2011. Preliminary investigation of cryopreservation by encapsulation-dehydration technique on *Brassidium* Shooting Star orchid hybrid. *African Journal of Biotechnology*, **10**(22):4665-4672.