

**MIKROPROPAGASI DARIPADA EKSPLAN DAUN  
DAN PROTOKOM ORKID ENDEMIK SABAH :**

*Paphiopedilum rothschildianum*

PERCUSTAIGAN  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

**DIENY TONY PAYAH**

**PROGRAM BIOTEKNOLOGI  
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

**2008**



**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

## UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

## BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: MIKROPROPAGASI DARIPADA EKSPLAN DAUN DAN PROTOKOM ORKID ENDEMIK SABAH : Paphiopedilum rothschildianum

IJAZAH: SARJANA MUDA SAINS DENGAN KEPUJIAN BIOTEKNOLOGI

SAYA DIENY TONY PAYAH SESI PENGAJIAN: 2005/06 - 2007/08  
(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 hak milik 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 (/)

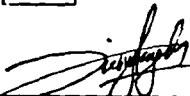
SULIT

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

TERHAD

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

TIDAK TERHAD

  
(TANDATANGAN PENULIS)

Alamat Tetap: A1-0-12, Kepayang Ridge,  
Lrg bunga secamat satui, 88200,  
kota Kinabalu, sabah

Tarikh: 16/05/08

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).

Disahkan Oleh

  
**NURULAIN BINTI ISMAIL**  
 LIBRARIAN  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH  
(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Dr. ZALEHA ABDUL AZIZ

Nama Penyelia

Tarikh: 16/05/08



**MIKROPROPAGASI DARIPADA EKSPLAN DAUN DAN PROTOKOM  
ORKID ENDEMIK SABAH : *Paphiopedilum rothschildianum***

**DIENY TONY PAYAH**

**PERPUSTAKAAN -  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

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

**PROGRAM BIOTEKNOLOGI  
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

**MEI 2008**



**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

## **PENGAKUAN**

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang setiap satu telah dijelaskan sumber dan rujukannya.

**4 April 2008**



---

DIENY TONY PAYAH

HS2005-3821



**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

**DIPERAKUKAN OLEH**

Tandatangan

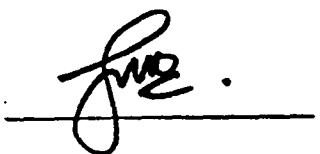
**1. PENYELIA**

**(Dr. ZALEHA ABDUL AZIZ)**



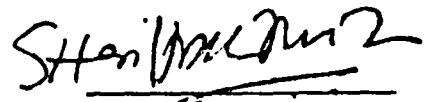
**2. PEMERIKSA**

**(Dr. JUALANG AZLAN GANSAU)**



**3. DEKAN**

**(PROF. MADYA Dr. SHARIFF A.K. OMANG)**



## **PENGHARGAAN**

Terlebih dahulu, saya ingin mengucapkan terima kasih dan memanjatkan rasa syukur kepada Tuhan kerana telah memberi saya kekuatan dalam menempuh pelbagai rintangan dan cabaran sepanjang menjalankan kajian ini. Setinggi-tinggi penghargaan juga saya ucapkan kepada penyelia projek tahun akhir saya iaitu Dr. Zaleha Abdul Aziz yang banyak memberikan tunjuk ajar dan nasihat sepanjang perjalanan projek ini. Pertolongan beliau telah membantu saya agar tidak sesat dan tersilap dalam menjalankan kerja-kerja makmal. Terima kasih juga saya ucapkan kepada pembantu makmal iaitu Puan Radizah kerana telah membantu melicinkan perjalanan eksperimen di dalam makmal. Kepada semua rakan-rakan yang telah berkongsi pengetahuan, memberi pertolongan dan juga kata-kata semangat di saat-saat tekanan melanda, jutaan terima kasih saya ucapkan. Akhir sekali, kepada keluarga saya terutamanya ibu saya, Irene Kosioh dan kakak saya, Dayanie Tony Payah, terima kasih diucapkan kerana membantu saya sedikit sebanyak dalam menyiapkan projek ini tidak kiralah dalam bentuk kewangan, sokongan moral, dan sebagainya. Hasil jasa baik dan pertolongan anda semua, lahirlah disertasi ini. Inilah hadiah untuk anda semua. Terima kasih daun keladi.

Setinggi-tinggi penghargaan.

## ABSTRAK

*Paphiopedilum rothschildianum* merupakan orkid endemik Sabah yang semakin terancam. Secara semulajadinya, proses propagasi spesis ini memakan masa yang panjang. Propagasi melalui teknik tisu kultur boleh diaplikasikan untuk memelihara spesis unik ini. Masa yang diperlukan adalah jauh lebih singkat serta bebas daripada ancaman semulajadi kerana proses mikropropagasi adalah secara *in vitro*. Objektif projek ini adalah untuk mengkaji pengaruh hormon 6-benzilaminopurin (BAP), thidiazuron (TDZ), asid naftalinasetik (NAA), dan 2,4-diklorofenoksiasetik (2,4-D) secara tunggal dan dengan kombinasi terhadap penghasilan jasad seperti protokom (JSP) daripada eksplan daun dan protokom *P. rothschildianum*. Selain itu, kesan membelah eksplan protokom diuji dan dibandingkan dengan pengkulturan protokom penuh. Media berasaskan garam RE yang ditambahkan dengan 10% (v/v) air kelapa digunakan untuk pengkulturan. Bagi pengkulturan daun, hormon 2,4-D, NAA, dan TDZ berkepekatan 0.0 mg/L hingga 5.0 mg/L dengan selang 0.5mg/L serta hormon BAP berkepekatan 0.0 mg/L hingga 10.0 mg/L dengan selang 1.0 mg/L diuji secara tunggal. Bagi pengkulturan protokom, hormon TDZ diuji secara tunggal manakala hormon BAP dikombinasikan dengan NAA dan kemudiannya dengan 2,4-D. Pengkulturan daun *P. rothschildianum* gagal mencapai objektif kajian apabila kesemua eksplan yang dikultur mengalami kematian 100% seawal 40 hari pengkulturan. Dalam pengkulturan protokom penuh *P. rothschildianum*, peratusan eksplan berpropagasi paling tinggi dengan nilai  $54.17\% \pm 19.09$  dicatatkan dalam media yang mengandungi kombinasi 3.0 mg/L BAP dan 0.5 mg/L NAA. Nilai tertinggi untuk purata JSP yang berhasil bagi satu eksplan pula dicatatkan dalam media yang mengandungi kombinasi 3.0 mg/L BAP dan 1.00 mg/L 2,4-D iaitu  $8.25 \pm 4.76$ . Pemerhatian juga mendapati bahawa media kawalan positif mencatat peratusan eksplan berpropagasi yang tinggi mencecah  $81.25\% \pm 12.5$  tetapi purata JSP berhasil bagi satu eksplan yang lebih rendah iaitu hanya  $2.04 \pm 0.57$ . Media kawalan negatif pula mencatat peratusan eksplan berpropagasi yang lebih rendah berbanding dengan media kawalan positif. Pengkulturan protokom yang dibelah dua juga gagal mencapai objektif kajian apabila peratus kematian eksplan mencecah nilai 94.10% secara keseluruhannya. Ini menunjukkan bahawa kedua-dua daun dan protokom *P. rothschildianum* yang diwujudkan kawasan luka adalah tidak sesuai digunakan sebagai eksplan dalam tisu kultur spesis ini.

## ABSTRACT

*Paphiopedilum rothschildianum* is an endemic orchid in Sabah that is currently protected. Its propagation process takes a long time in natural way. One of the ways in conserving this unique species is the application of micropropagation. This technique takes a relatively shorter time and the *in vitro* condition protects the culture from natural threats. The objective of this research was to evaluate the effects of 6-benzylaminopurine (BAP), thidiazuron (TDZ), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), and naphthaleneacetic acid (NAA) hormones, both individually and in combination towards the inducement of protocorm like bodies (PLB) from the leaf and protocorm explants of *P. rothschildianum*. The effectiveness of inducing wound region on the protocorm explants were also evaluated to be compared to the unwounded protocorms. The RE media supplemented with 10% (v/v) coconut water was used in the culturing process. Using leaf segment as explants, the concentrations of the hormones NAA, 2,4-D, and TDZ hormones ranging from 0.0 mg/L to 5.0 mg/L with the interval of 0.5 mg/L and the BAP hormones with the concentration ranging from 0.0 mg/L to 10 mg/L with 1.0 mg/L interval were tested individually. As for the experiment of using protocorms as explant, TDZ hormone were tested individually whereas the BAP hormone were combined with NAA and later with 2,4-D. The experiment of using leaves as explant failed to fulfill the research objective as the explants died as early as the 40<sup>th</sup> day of culturing. In the experiment of using full protocorms, the media supplemented with 3.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA showed the highest percentage of explant propagating with the value of 54.17%±19.09. The highest value of min PLB formed per explant were found out to be in the medium with 3.0 mg/L BAP + 1.00 mg/L 2,4-D with 8.25±4.76. Observations also showed that the positive control medium gave a high percentage of explant propagating of 81.25%±12.5 but a relatively low value of min PLB formed per explant of just 2.04±0.57. The negative control medium showed less percentage of explants propagating as compared to the positive control medium. The culturing of wounded protocorms also failed to fulfill the research objective when the overall death percentage of the explant reached 94.10%. This indicated that both leaves and wounded protocorms of *P. rothschildianum* were not suitable to be used as explant in the tissue culturing of this species.

## KANDUNGAN

**Muka Surat**

---

HALAMAN JUDUL	i
PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
SENARAI KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	x
SENARAI RAJAH	xii
SENARAI FOTO	xiii
SENARAI SINGKATAN	xiv
SENARAI SIMBOL	xv
SENARAI UNIT	xvi

<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	1
--------------------------	---

<b>BAB 2 ULASAN LITERATUR</b>	4
2.1 Orkid	4
2.1.1 Klasifikasi Orkid	6
2.1.2 Orkid di Malaysia	8
2.2 Genus <i>Paphiopedilum</i>	9
2.3 <i>Paphiopedilum rothschildianum</i>	12
2.4 Protokom dan Jasad Seperti Protokom	14
2.5 Kultur Tisu dan Mikropropagasi	15
2.5.1 Kultur Tisu Orkid dan Spesis <i>Paphiopedilum</i>	16
2.6 Hormon	18
2.6.1 Auksin	19



2.6.2 Sitokinin	20
<b>BAB 3 BAHAN DAN KAEADAH</b>	<b>22</b>
3.1 Pemilihan Eksplan	22
3.1.1 Eksplan Daun	22
3.1.2 Eksplan Protokom	23
3.2 Penyediaan Media	23
3.2.1 Penyediaan Larutan Stok	24
3.2.2 Penyediaan Media Kultur	31
3.3 Pengkulturan Eksplan	36
3.3.1 Pengkulturan Daun	37
3.3.2 Pengkulturan Protokom	38
3.4 Pencerapan Data	39
3.4.1 Data Eksperimen Pengkulturan Daun	39
3.4.2 Data Eksperimen Pengkulturan Protokom	40
3.5 Analisis Data	41
<b>BAB 4 KEPUTUSAN</b>	<b>42</b>
4.1 Keputusan pengkulturan eksplan daun <i>P.rothschildianum</i>	43
4.2 Keputusan pengkulturan protokom <i>P. rothschildianum</i>	46
4.2.1 Kesan kehadiran hormon TDZ secara tunggal ke atas penghasilan JSP daripada eksplan protokom penuh <i>P. rothschildianum</i> .	47
4.2.2 Kesan kombinasi hormon BAP dan NAA ke atas penghasilan JSP daripada eksplan protokom penuh <i>P. rothschildianum</i> .	52
4.2.3 Kesan kombinasi hormon BAP dan 2,4-D ke atas penghasilan JSP daripada eksplan protokom penuh <i>P. rothschildianum</i> .	57
4.3 Analisis korelasi Pearson terhadap pengaruh hormon ke atas pembentukan JSP pada eksplan protokom penuh <i>P. rothschildianum</i> .	62
4.3.1 Analisis nilai korelasi Pearson antara kepekatan hormon TDZ dan peratusan eksplan protokom yang berpropagasi	63

4.3.2 Analisis nilai korelasi Pearson antara kepekatan hormon NAA dan peratusan eksplan protokom berpropagasi dengan syarat bahawa kepekatan hormon BAP ditetapkan kepada 3.0 mg/L.	64
4.3.3 Analisis nilai korelasi Pearson antara kepekatan hormon 2,4-D dan peratusan eksplan protokom berpropagasi dengan syarat bahawa kepekatan hormon BAP ditetapkan kepada 3.0 mg/L.	65
4.4 Keputusan pengkulturan protokom <i>P. rothschildianum</i> yang diwujudkan kawasan luka.	67
<b>BAB 5 PERBINCANGAN</b>	69
5.1 Pengaruh hormon terhadap pengkulturan orkid	69
5.1.1 Kegagalan eksperimen pengkulturan daun <i>P. rothschildianum</i>	71
5.1.2 Pengaruh hormon TDZ terhadap penghasilan JSP daripada eksplan Protokom penuh <i>P. rothschildianum</i> .	72
5.1.3 Pengaruh kombinasi hormon BAP dan NAA terhadap penghasilan JSP daripada eksplan protokom penuh <i>P. rothschildianum</i> .	74
5.1.4 Pengaruh kombinasi hormon BAP dan 2,4-D terhadap penghasilan JSP daripada eksplan protokom penuh <i>P. rothschildianum</i> .	77
5.1.5 Kegagalan eksperimen pengkulturan protokom yang diwujudkan Kawasan luka	78
5.2 Korelasi Pearson antara kepekatan hormon dan peratusan eksplan berpropagasi.	80
<b>BAB 6 KESIMPULAN</b>	83
<b>RUJUKAN</b>	86
<b>LAMPIRAN</b>	96

## SENARAI JADUAL

No. Jadual		Muka Surat
3.1	Komponen nutrien makro RE dan sukatannya untuk menyediakan larutan stok 500 ml dengan kekuatan X100.	25
3.2	Komponen larutan MS Vitamin dan sukatannya untuk menyediakan larutan stok 500 ml dengan kekuatan X100.	27
3.3	Komponen larutan FeNaEDTA dan sukatannya untuk menyediakan larutan stok 500 ml dengan kekuatan X100.	28
3.4	Bahan-bahan untuk media RE beserta dengan amauan dan isipadu larutan stok yang betul untuk penyediaan 100 ml media kultur.	33
3.5	Kepekatan hormon auksin ( 2,4-D dan NAA ) dan sitokinin ( BAP dan TDZ ) dalam medium untuk pengkulturan daun.	34
3.6	Kepekatan hormon auksin (2,4-D dan NAA) dan sitokinin (BAP dan TDZ) dalam medium untuk pengkulturan protokom.	36
4.1	Kesan kepekatan hormon auksin (2,4-D dan NAA) yang berbeza terhadap pembentukkan jasad seperti protokom pada hari ke-20 dan ke-40 pengkulturan.	44
4.2	Kesan kepekatan hormon sitokinin (BAP dan TDZ) yang berbeza terhadap pembentukkan jasad seperti protokom pada hari ke-20 dan ke-40 pengkulturan.	45
4.3	Kesan kepekatan hormon TDZ yang berbeza ke atas penghasilan JSP daripada eksplan protokom penuh <i>P. rothschildianum</i> .	48
4.4	Kesan kombinasi hormon BAP dan NAA ke atas proses propagasi protokom penuh <i>P. rothschildianum</i> .	53
4.5	Kesan kombinasi hormon BAP dan 2,4-D ke atas proses propagasi protokom penuh <i>P. rothschildianum</i> .	58
4.6	Nilai korelasi Pearson antara kepekatan hormon TDZ dan peratusan eksplan yang berpropagasi.	63

No. Jadual	Muka Surat
4.7 Nilai korelasi Pearson antara kepekatan hormon NAA dan peratusan eksplan protokom berpropagasi dengan syarat bahawa kepekatan hormon BAP ditetapkan kepada 3.0 mg/L.	64
4.8 Nilai korelasi Pearson antara kepekatan hormon 2,4-D dan peratusan eksplan protokom berpropagasi dengan syarat bahawa kepekatan hormon BAP ditetapkan kepada 3.0 mg/L.	66
4.9 Pemerhatian selama 90 hari bagi eksperimen pengkulturan protokom <i>P. rothschildianum</i> yang diwujudkan kawasan lukanya.	68



## SENARAI RAJAH

No. Rajah	Muka Surat
2.1 Contoh orkid simpodial ( Sumber: Hodgson <i>et al.</i> , 1991)	7
2.2 Contoh orkid monopodial (Sumber: Hodgson <i>et al.</i> , 1991).	8
2.3 Taburan genus <i>Paphiopedilum</i> di Asia.(Sumber: Hodgson <i>et al.</i> , 1991)	11
3.1 Isipadu media RE yang mengisi 25% daripada isipadu maksimum bekas kultur plastik.	32
3.2 Cara pengkeratan daun <i>P. rothschildianum</i> .	38
3.3 Rajah skematik pemerhatian eksperimen pengkulturan daun.	40



## SENARAI FOTO

No. Foto	Muka Surat
2.1 Bahagian bibir <i>Paphiopedilum rothschildianum</i> yang berbentuk selipar wanita. (Sumber: Taman Negeri Sabah, Kundasang)	11
2.2 Bunga <i>Paphiopedilum rothschildianum</i> . (Sumber: Taman Negara Sabah, Kundasang)	13
4.1 Aliran pemerhatian respon eksplan daun dari hari ke-20 ( kawasan luka menjadi gelap) hingga ke-40 (eksplan mati).	46
4.2 Pemerhatian kesan kepekatan hormon TDZ secara tunggal ke atas proses mikropropagasi eksplan protokom penuh <i>P. rothscildianum</i> .	50
4.3 Pemerhatian kesan kombinasi hormon BAP dan NAA ke atas proses mikropropagasi eksplan protokom penuh <i>P. rothscildianum</i> .	55
4.4 Pemerhatian kesan kombinasi hormon BAP dan 2,4-D ke atas proses mikropropagasi eksplan protokom penuh <i>P. rothscildianum</i> .	60
4.5 Eksplan pada media dengan 3.0 mg/L BAP + 1.00 2,4-D yang membentuk jasad seperti protokom daripada kawasan luka.	68



## SENARAI SINGKATAN

2,4-D	Asid 2,4-diklorofenoksiasetik
NAA	Asid naftalinasetik
BAP	6-Benzilaminopurin
TDZ	Thidiazuron
N	Normaliti
RE	Robert Ernst (1982)
JSP	Jasad seperti protokom
SD	<i>Standard deviation</i> (sisihan piawai)
HCL	Asid hidroklorik
NaOH	Natrium hidroksida



## SENARAI SIMBOL

=	bersamaan dengan
&	dan
pH	darjah keasidan
/	per atau bahagi
%	peratus
±	tambah tolak
°C	darjah selsius



## SENARAI UNIT

<b>mm</b>	<b>milimeter</b>
<b>cm</b>	<b>sentimeter</b>
<b>m</b>	<b>meter</b>
<b>ml</b>	<b>mililiter</b>
<b>l</b>	<b>liter</b>
<b>mg</b>	<b>miligram</b>
<b>mg/L</b>	<b>miligram per liter</b>
<b>g</b>	<b>gram</b>
<b>µM</b>	<b>mikromolar</b>
<b> mM</b>	<b>milimolar</b>
<b>M</b>	<b>molar</b>
<b>µl</b>	<b>mikroliter</b>
<b>w/v</b>	<b>berat per isipadu</b>
<b>v/v</b>	<b>isipadu per isipadu</b>



## **BAB 1**

### **PENDAHULUAN**

Flora merupakan aksesori semulajadi yang telah menghiasi alam beribu-ribu tahun lamanya. Terdapat pelbagai jenis flora di dunia dan orkid merupakan salah satu daripadanya. Menurut Menzies (1991), orkid tergolong dalam famili Orchidaceae yang juga merupakan famili terbesar bagi tanaman yang berbunga. Orkid juga tergolong dalam kumpulan tumbuhan yang terbesar iaitu angiosperma.

Di Malaysia, terdapat 808 spesis orkid yang berasal daripada lebih 111 genus (Fadelah *et al.*, 2001). Kepulauan Borneo sahaja menjadi habitat kepada 2500 hingga 3000 spesis orkid yang mana nilai ini mewakili 10% daripada jumlah spesis di dunia dan 30% daripadanya adalah endemik ( Lamb, 1991 ). Di negeri Sabah pula, orkid didapati tumbuh di pergunungan Crocker, Tenom, dan Nabawan. Alec dan Morrison (1991), menyatakan bahawa Gunung Kinabalu merupakan tempat orkid terkaya di dunia dengan bilangan spesis yang mencecah angka 1500.



Namun begitu, ternyata jumlah spesis yang dinyatakan hanyalah angka semata-mata kerana kebanyakkan daripada spesis-spesis orkid yang wujud di dunia kini adalah terancam. Selain daripada faktor bencana alam seperti tanah runtuh dan kebakaran, faktor lain seperti aktiviti penarahan hutan dan pemetikan di luar perundangan telah menyumbang kepada kepupusan spesis-spesis orkid ini. Salah satu daripada spesis orkid yang semakin terancam adalah *Paphiopedilum rothschildianum*. Genera orkid ini telah tersenarai pada lampiran I “*Convention Of International Trade In Endangered Species Of Wild Fauna And Flora*” yang terkini dikeluarkan pada 3 Mac 2007 (CITES, 2007). Akta Taman Negara 1980 dan Enakmen Taman Negara 1938/39 mendeklarasikan bahawa beberapa spesis orkid tertentu adalah tidak dibenarkan untuk dibawa keluar dari hutan simpan yang terdapat di Malaysia. Kerajaan Negeri Sabah seterusnya menggubal Akta Taman Negara pada tahun 1984 untuk melindungi *P. rothschildianum* ( Cribb, 1997 ). Oleh yang demikian, pemeliharaan terhadap spesis orkid ini haruslah dipraktikkan dan salah satu cara yang terbaik adalah dengan menggunakan teknik kultur tisu.

Dalam keadaan semulajadi, biji benih *P. rothschildianum* menghadapi kesukaran untuk bercambah. Ia juga memerlukan masa yang panjang untuk dibiakkan secara vegetatif. Oleh sebab itu, teknik kultur tisu dipraktikkan kerana ia dapat memelihara pertumbuhan spesis orkid ini disamping menjimatkan masa dan memastikannya bebas daripada sebarang jangkitan penyakit. Menurut Arditti (1976), teknik kultur tisu berpotensi untuk menghasilkan tumbuhan yang jauh lebih baik berbanding dengan yang tumbuh di tapak semaian. Peningkatan permintaan terhadap tanaman hiasan terutamanya orkid juga telah berlaku hasil daripada pempraktikkan kaedah kultur tisu (Smith, 1992).

Pada bulan Mei 1887, *P. rothschildianum* telah diperkenalkan buat pertama kalinya kepada pengkulturan *in vitro* oleh Linden (Wong dan Phillips, 1996). Namun begitu, ia tidak dijalankan dengan meluas kerana kesukaran memperoleh sumber dan penentuan kacah *In vitro* yang spesifik dalam pengkulturan spesis orkid ini. Dalam kajian-kajian sebelum ini, proses mikropropagasi spesis *Paphiopedilum* dengan menggunakan teknik tisu kultur telah banyak berjaya dilakukan apabila eksplan seperti pucuk (Huang, 1988; Arditti & Ernst, 1993), protokom (Lin *et al.*, 2000), dan jasad seperti protokom digunakan. Dalam kajian ini pula, daun dan protokom *P. rothschildianum* akan digunakan sebagai eksplan. Potensi tisu daun untuk menghasilkan jasad seperti protokom buat pertama kalinya telah ditunjukkan oleh Wimber pada tahun 1965 dalam kultur daun *Cymbidium* (Vij & Pathak, 1990). Salah satu sebab yang munasabah mengapa daun digunakan sebagai eksplan adalah kerana berbanding dengan bahagian lain seperti meristem pucuk, pemilihan daun sebagai eksplan tidak akan menyebabkan pengorbanan ibu pokok. Oleh itu, proses mikropropagasi akan dapat dilakukan dengan lebih efisyen.

Objektif kajian ini terbahagi kepada dua. Pertama adalah untuk mengkaji kesan empat jenis hormon tumbuhan iaitu asid 2,4-diklorofenoksiasetik (2,4-D), asid naftalinasetik (NAA), 6-Benzilaminopurin (BAP), dan thidiazuron (TDZ) ke atas penghasilan jasad seperti protokom daripada eksplan daun *P. rothschildianum*. Manakala objektif kedua kajian ini juga adalah untuk mengkaji pengaruh empat hormon tumbuhan yang dinyatakan di atas, pada proliferasi eksplan. Dua eksplan ptokom yang digunakan adalah protokom penuh dan protokom yang dibelah dua untuk mewujudkan kawasan luka.

## **BAB 2**

### **ULASAN LITERATUR**

#### **2.1 Orkid**

Dengan bilangan spesis mencecah 35000 dan kemungkinan jumlah hibrid yang sama, hasil daripada proses hibridisasi semulajadi oleh alam dan bukan semulajadi oleh manusia, Orchidaceae merupakan famili terbesar daripada kumpulan tanaman berbunga (Hodgson *et al.*, 1991). Sebelum ini, para saintis berpendapat bahawa famili Compositae adalah merupakan famili terbesar dan paling sukar diklasifikasikan. Namun begitu, kini ternyata famili Orchidaceae mempunyai lebih banyak variasi dan sekaligus menjadikannya famili terbesar (Gunawan, 1992).

Bunga orkid adalah sangat cantik dan kadangkala berbentuk aneh. Pada tahun 1877, Charles Darwin menyokong fakta bahawa orkid adalah hasil proses evolusi daripada tumbuhan yang menyerupai bunga Lili (Dressler, 1993). Kepelbagaiannya bunga

orkid boleh dilihat daripada warna, saiz, bentuk, habitat, dan baunya. Daripada ketinggian 3 milimeter *Bulbopyllum minutissimum* yang boleh dijumpai di australia sehingga alih *Gaieola foliata* yang berketinggian 30 meter, daripada mempunyai bau yang sangat harum sehingga alih yang sangat busuk, daripada bentuk bunga yang biasa sehingga alih yang kompleks, dan daripada habitat yang tumbuh di paras air laut sehingga alih 4200 meter atas paras laut, inilah bukti betapa pelbagai flora yang bernama orkid (Hodgson *et al.*, 1991). Setiap tahun sahaja, ratusan hibrid orkid yang baru terdaftar dan diterbitkan dalam *Sanders' List of Orchid Hybrids*.

Biji benih orkid pula adalah sangat mudah untuk disebarluaskan oleh angin sehingga mencapai ribuan kilometer kerana saiznya yang kecil dan ringan. Fakta ini disokong oleh Menzies (1991) yang membincangkan tentang letusan gunung berapi Krakatoa, Indonesia. Menurutnya, pada tahun 1933 iaitu 50 tahun selepas letusan gunung berapi Krakatoa 1883 yang telah memusnahkan banyak spesis hidupan semulajadi termasuklah orkid, 35 spesis orkid telah dijumpai semula di sekitar pulau Krakatoa. Orkid-orkid ini dipercaya tumbuh hasil daripada biji benih yang ditutup angin dari pulau-pulau Indonesia yang lain.

Di alam semulajadi, kebanyakkan orkid bersifat epifit dimana ia hidup menempel pada tumbuhan lain tanpa merugikan tumbuhan perumahan itu. Ini kerana, orkid mampu berfotositosis menghasilkan makanan sendiri dan tidak memakan makanan yang dibuat oleh perumahnya (Gunawan, 1992). Terdapat juga orkid yang bersifat litofit di mana ia tumbuh pada permukaan batu yang lembap. Jika keadaan pertumbuhan mengizinkan, orkid epifit akan lama-kelamaan bertukar menjadi orkid yang bersifat litofit (Hodgson *et*

*al.*, 1991). Selain itu, terdapat juga orkid yang bersifat saprofit di mana ia bertumbuh dengan nutrien yang dihasilkan daripada bahan organik yang mereput. Walau bagaimanapun, orkid-orkid ini kurang dari segi bilangan klorofil dan kebanyakannya tidak berdaun.

### 2.1.1 Klasifikasi Orkid

Dalam pengklasifikasian orkid yang termampat, famili Orchidaceae terbahagi kepada 3 sub-famili, 12 puak, 45 sub-puak, dan 186 genera. Pengklasifikasian yang dikembangkan pula boleh mengandungi sehingga 6 atau lebih sub-famili sehinggalah kepada 800 genera (Rittershausen dan Rittershausen, 2001). Keenam-enam sub-famili tersebut termasuklah Apostasioideae, Cypripedioideae, Spiranthoideae, Orchidoideae, Epidandroideae, dan Vandoiceae (Pridgen, 1998). Walaubagaimanapun, secara ringkasnya cara pertumbuhan orkid boleh dibahagikan kepada dua jenis iaitu simpodial dan monopodial (Alec dan Morrison, 1991).

#### a. Orkid simpodial

Perkataan ‘simplodial’ berasal daripada bahasa Greek yang bermaksud ‘kaki bersatu’. Ia menggambarkan batang-batang orkid tersebut yang disatukan oleh rizom (Hodgson *et al.*, 1991). Orkid jenis simpodial berupaya untuk tumbuh di atas pokok lain secara epifit mahupun di atas tanas (Rittershausen dan Rittershausen, 2001). Kebanyakkannya spesis orkid adalah simpodial. Antara orkid simpodial yang popular adalah *Dendrobium*,

## RUJUKAN

- Aktari Asma Begum, Masahiko Tamaki, dan Shunji Kako. 1994. Formation of protocorm like bodies and shoot development though *in vitro* of outer tissue of *Cymbidium* protocorm like bodies. *Journal of Japan. Soc. Hort.* 63 (3) : 663-673.
- Alec, P. dan Morrison, A. 1991. *Orchids of the World – Over 1100 Species illustrated and Identified*. Weldon Publisher, United States of America.
- Arditti, J. 1982. *Orchid Biology Reviews and Perspectives II*. Department of Development and Cell Biology, University of California. 352.
- Arditti, J. dan Ernst, R., 1993. *Micropropagation Of Orchids*. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- Arditti, J. dan Ernst, R., 1976. *Micropropagation of Orchids*. John Wiley and Sons Inc., New York.
- Bechtel, H., Cribb, P., dan Laumert, E. 1992. *The Manual of Cultivated Orchid Species*. Third edition. Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart, Germany.



Bhojwani, S.S., dan Razdan, M.K. 1983. *Plant Tissue Culture : Theory and Practice*. Elsevier Science Publishing Company Inc., New York.

Bonga, J.M., dan Adckas, P.V. 1992. *In Vitro Culture of Trees*. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands.

Bose, E. dan Yadav, E. 1989. *Commercial flowers*. Naya Prakash Culcutta, India.

Buyun, L., Laurentyeva, A., Kovalska, L., dan Ivannikov, R. 2004. *In Vitro germination of seeds of some rare tropical Orchids*. *Acta Universitatis Latviensis* 676: 159-162.

Chan, C.L., Lamb, A., Shim, P.S., dan Wood, J.J. 1994. *Orchids of Borneo, Volume 1: Introduction and a Section of Species*. The Sabah Society, Kota Kinabalu.

Chen, T.Y., Chen, J.T., dan Chang W.C. 2004. Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *Paphiopedilum* orchids. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 76: 11-15.

CITES. 2007. *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora : Appendices I, II, and III*. International Environment House. Switzerland.

Comber, J.B. 2001. *Orchids of Sumatra*. Natural History Publication (Borneo) Sdn. Bhd., Kota Kinabalu, Sabah.

Cribb, P. 1997. *Slipper Orchids of Borneo*. Natural History Publications, Kota Kinabalu.

Davies, P.J. 2004. The plant hormones : their nature, occurrence and functions. Dlm: Davies, P.J. (pnyt). *Plant Hormons- Biosynthesis, Signal transduction, action*. Kluwer Academic Press, United States.

Livy Winata Gunawan. 1992. *Budidaya Anggrek*. PT Penebar Swadaya, Anggota IKAPI, Jl. Gunung Shari III/7, Jakarta.

Dressler, R.L. 1993. *The Orchids: Natural History and Classification*. Harvard University Press, Ithaca, New York.

Elizabeth J. dan Jaswinder K. 2006. Beauty and the Theif. *New Sunday Times, The New Straits Times (M) Sdn. Bhd.*

Ernst, R. dan Arditti, J. 1993. *Micropropagation of Orchids*. Irvine: Department of Developmental and Cell Biology. University of California, USA.

Fadelah, A.A., Zaharah, H., Rozlaily, Z., Nuraini, I., Tan, S.L. dan Hamidah, S. 2001. *Orchids the Living Jewels of Malaysia*. Malaysian Agriculture Research and Development Institute, Kuala Lumpur.

George, E.F. 1996. *Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1: The Technology*. Energetics Limited, England.

Grell, E., Haas-Von Schmude, N.F., Lamb, A. & Bacon, A. 1988. Re-introducing *Paphiopedilum rothschildianum* to Sabah, North Borneo. *American Orchid Society Bulletin* 57: 1238-1246.

Green, J.F., Muir, R.M. 1979. An analysis of the role of potassium in the growth effects of cytokinin, light and abscisic acid on cotyledon expansion. *Physiol Plant* 46: 19-24.

Haas-Von Schmude, N.F., Lucke, E., Ernst, R. & Arditti, J. 1986. *Paphiopedilum rothschildianum*. *American Orchids Society Bulletin* 55 (6): 579-584.

Hadley, G. dan Harvais, G. 1968. The effect of certain growth substances on asymbiotic germination and development of orchids *Purpurella*. *New Phytologist* 67: 441-445.

Harley, J.L. 1969. *The Biology of Mycorrhiza*. Leonard Hill Books, London.

Hartmann, H.T dan Kester, D.E. 1983. *Plant Propagation; Principles and Practices*, Ed. Ke-3. Prentice-Hall Inc, New Jersey.

Hodgson, M., Paine, R., dan Anderson, N. 1991. *Letts Guide to Orchids of the World*. Charles Letts & Co. Ltd., London, England.

Huang, L.C. 1988. A procedure for asexual multiplication of *Paphiopedilum* in vitro. *Am. Orchid Society Bulletin* 57: 274-278.

Huang, L.C., Lin, C.J., Kuo, C.I., Huang, B.L., Murashige, T. 2001. *Paphiopedilum* in vitro. *Scientia Horticulturae* 91: ms. 111-121.

Jamili Nais. 2006. *Warisan Alam Kinabalu : Flora*. <http://www.bbec.sabah.gov.my/ParkManagement/WAKinabalu.html>

Khaw, C.H., Ong, H.T., dan Nair, H. 1978. Hormone in the nutrition of orchid tissue culture in orchid propagation. *Proceeding of the Symposium on Orchidiology* : 60-65.

Lamb,A. 1991. *Orchid of Sabah and Sarawak*. Dlm: Kiew, R.(Ed.). The State Of Nature Conservation in Malaysia. Malaysia Nature Society, Selangor, 78-88.



Lehihashi, S. 1992. Micropropagation of *Phalaenopsis* through the culture of lateral buds from young flower stalks. *Lendle yana* 7: 208-215.

Leopold, A.C. 1987. Contemplations on hormones as biological regulators. Dlm: Hoad, G.V., Lenton, J.R., Jackson, M.B., & Atkin, R.A (pnyt.) *Hormone Action in Plant Development. A Critical Appraisal*, Butterworth, London, 3-15.

Lin, Y.H., Chang, C & Chang W.C. 2000. Plant regeneration from callus culture of a *Paphiopedilum* hybrid. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 62: 21-25.

Madgwick, W. 1991. *Orchids*. Heinemann Children's Reference, Britain.

Marjit, S.B. 1994. *Mechanism of Plant Growth and Improved Productivity Modern approached*. John Wiley and Sons, New York.

Menzies, D. 1991. *Orchids*. Bison Book Ltd, London.

Miyoshi, K. dan Mii, M. 1995. Phytohormone pretreatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae) in asymbiotic culture. *Scientia Horticulturae* 63 : 263-267.

Nayak, N.R., Sahoo, S., Patnaik, S. dan Rath, S.P. 2001. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbium aloifolium* (L.) SW. and *Dendrobium nobile* Lindl. *Scientia Horticulture* 94: 107-116.

Nissen S.J. dan Sutter, E.G. 1988. Stability of IA and IB in nutrient medium after autoclaving and after storage under various environmental conditions. *HortScience* 23: 758

Norain Mohd. Rejab. 1999. *Siri Tanaman Bunga-bungaan Dalam Landskap Orkid*. Dewan Bahasa dan Pustaka. Malaysia.

Prakash, E., Khan, S.V., Meru, E., & Rao, K.R. 2001. Somatic embryogenesis in *Pimpinella tirupatiensis*. *Bal. And. Subr. And Endangered Medicinal plant of Tirumala hills, Curr Sei* 81: 1239-1241

Pridgeon, A. 1998. *The Illustrated Encyclopedia of Orchids : Over 1100 Species Illustrated and Identified*. Timber Press, Portland.

Pritchard, H.W. 1989. Orchids propagation by tissue culture technique- past, present and future. Dlm: Steward, J.(pnyt). *Modern Methods of Orchids Conservation : The Role of Physiology, Ecology, and Management*. Cambridge University Press, New York, 87-100.

Rao, A.N. 1980. Importance of basic research in production and breeding of orchids. Proceeding of the third Asean Orchids Congress, Malaysia, Ministry of Agriculture, 13-27.

Reinert, J. dan Bajaj, S.Y.P.S. 1995. *Applied and fundamental aspects of plant cell culture*. Springer- Verlag, India.

Rittershausen, W dan Rittershausen, B. 2001. *Orchids : The Complete Grower's Guide*. Garden Art Press. Woodbridge, England.

Saiprasad, G.V.S., Raghuveer, P., Khetarpal, S dan Chandra, R. 2003. Effects of various polyamines on production of protocorm like bodies in orchid- *Dendrobium 'Sonia'*. *Scientia Horticulture* : 1-8

Seeni, S. dan Latha, P.G. 2000. In Vitro Multiplication and Ecorehabilitation of Endangered Blue *Vanda*. *Plant cell tissue and organ* 61: 1-8.

Sheehan, T. dan Sheehan, M. 1979. *Orchid Genera Illustrated*. Comstock Publishing Associates, Lornell University Press, United States of America.

Sheelavanthmath, S.S., Murthy, H.N., Hema, B.P., Hanh, E. J. dan Paek, K.Y. 2005. High frequency of protocorm like bodies induction and plant regeneration from

protocorm and leaf sections of *Aerides crispum*. *Scientia Horticulture* **106**: 396-401.

Smith, P.H. 1992. *Plant Tissue Culture : Techniques and Experiment*. Academic Press Inc, United States of America.

Soepadmo, E. 1992. IndoMalayan Wild Orchid- Their Ecology and Conservation Status. *Orchid and Ornamental Plants in Asean. Proceeding of the International Conference and Exhibition on Orchid and Ornamental Plants, Eight Asean Congress*, Petaling Jaya : 38-43.

Teo, C.K.H., Kumsaki, J.T. dan Sagawa, Y., 1973. Clonal Propagation of Strap-leaved *Vanda* by Shoot-tip Culture. *American Orchid Society Bulletin* **42** : 402-405.

Vij, S.P., Pathak, P. 1990. Micropropagation of orchids through leaf segments. *Journal Orchids Society* **4** (1,2): 69-88.

William, B. 1980. *Orchids for Everyone*. Salamander Book Ltd, United Kingdom.

Wong, K.M dan Phillips, A. 1996. *Kinabalu Summit of Borneo, A Revised and Expanded Edition*. The Sabah Society, Kota Kinabalu.

Zaerr, J.B. dan Mapes, M.O. 1982. Action of growth regulators. Dlm: Bonga,J.M dan Durzan D.J.(pnyt). *Tissue Culture in Forestry*. Martinus Nijhoff/ Dr W Junk Publisher, The Hague, 231-255.