

KESAN PENGAWALATUR TUMBUHAN KE ATAS REGENERASI ORKID
Vanilla planifolia Andrews SECARA *IN VITRO*

MARLINA BINTI ALIAMAT

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

PROGRAM HORTIKULTUR DAN LANDSKAP
FAKULTI PERTANIAN LESTARI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH
2018



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN TESIS

JUDUL: KESAN PENGAWALATUR TUMBUHAN KE ATAS REGENERASI *Vanilla planifolia* Andrews SECARA IN VITRO

IAJAZAH: IJAZAH SARJANA MUDA SAINS PERTANIAN DENGAN KEPUJIAN (PROGRAM HORTIKULTUR DAN LANDSKAP)

SAYA: MARLINA BINTI ALIAMAT SESI PENGAJIAN: 2014-2018
(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 (/)

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

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

Marlina

(TANDATANGAN PENULIS)

Alamat Tetap: P.O. BOX 24,
KAMPUNG KELANAHAN,
89600 PAPAR,
SABAH.

TARIKH: 9/1/2018

Disahkan oleh:

NORULAIN BINTI ISMAIL
PUSTAKAWAN KANAN

(UNIVERSITI MALAYSIA SABAH)

DEVINA DAVID
PENSYARAH
FAKULTI PERTANIAN LESTARI
UMS KAMPUS SANDAKAN

(NAMA PENYELIA)

TARIKH: 9/1/2018

Catatan:

*Potong yang tidak berkenaan.

*Jika tesis ini SULIT dan 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).



PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya. Saya juga mengakui bahawa disertasi ini tidak pernah atau sedang dihantar untuk perolehi ijazah dari universiti ini atau mana universiti yang lain.

Marlina

MARLINA BINTI ALIAMAT
BR14110040
29 NOVEMBER 2017



DIPERAKUKAN OLEH

Puan Devina David
PENYELIA



DEVINA DAVID
PENSYARAH
FAKULTI PERTANIAN LESTARI
UMS KAMPUS SANDAKAN



PENGHARGAAN

Assalamualaikum w.b.t. Saya bersyukur ke hadrat Illahi kerana dengan limpah dan kunia-Nya saya masih diberi peluang untuk meneruskan pelajaran saya dan menjalankan projek penyelidikan 1 dan 2. Saya ingin mengambil kesempatan ini untuk mengucapkan ribuan terima kasih yang tidak terhingga kepada kedua ibu bapa saya, Encik Aliamat bin Yunus dan Puan Jaimah binti Amat, dan ahli keluarga atas sokongan moral dan kata-kata semangat yang diberikan selama ini. Seterusnya, ucapan terima kasih kepada penyelia saya, Puan Devina David atas masa, tunjuk ajar, nasihat, dan kesudian untuk menyelia saya dalam menjalankan projek penyelidikan 1 dan 2. Tidak lupa juga kepada pembantu makmal, Puan Nurul Syakina binti Marli yang juga banyak membantu saya dalam penyediaan peralatan dan keperluan sepanjang kajian dijalankan. Akhir kata, saya mengucapkan ribuan terima kasih kepada rakan-rakan saya yang juga banyak membantu saya dalam usaha untuk menyiapkan penulisan bagi projek penyelidikan saya.



ABSTRAK

Satu kajian telah dijalankan di Makmal Kultur Tisu Tumbuhan, Fakulti Pertanian Lestari, Universiti Malaysia Sabah, Sandakan untuk mengkaji kesan pengawalatur tumbuhan, *benzylaminopurine* (BAP) dan *naphthaleneacetic acid* (NAA) serta air kelapa (AK) pada kepekatan yang berbeza ke atas regenerasi secara *in vitro* orkid vanila (*Vanilla planifolia* Andrews) menggunakan bahagian nod sebagai eksplan. Kajian ini telah dijalankan selama dua bulan menggunakan Murashige dan Skoog (MS) sebagai media asas yang merangkumi lapan jenis rawatan gabungan BAP dan NAA pada kepekatan berbeza, bersama tambahan ataupun tanpa tambahan 15% (v/v) AK. Setiap rawatan mempunyai lima replikasi dan kesemua kultur diletakkan di dalam kebuk pertumbuhan dengan pencahayaan 12 jam cerah pada suhu $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Parameter seperti bilangan hari bagi pengeluaran akar, bilangan hari bagi pertumbuhan tunas, bilangan akar/eksplan, panjang akar, bilangan tunas/eksplan, panjang tunas dan peratus kemandirian eksplan direkod selepas 60 hari pengkulturan. Kajian dijalankan menggunakan reka bentuk rawak lengkap (CRD) dan data dianalisa menggunakan analisis satu hala daripada varian (ANOVA). Keputusan daripada kajian ini menunjukkan penambahan NAA, BAP dan 15% (v/v) AK di dalam media asas adalah tidak signifikan bagi regenerasi kultur nod *V. planifolia*.



**EFFECT OF PLANT GROWTH REGULATORS ON IN VITRO REGENERATION OF
Vanilla planifolia Andrews ORCHID**

ABSTRACT

*A study have been conducted at Plant Tissue Culture Laboratory, Faculty of Sustainable Agriculture, Universiti Malaysia Sabah, Sandakan to study the effect of the plant growth regulators, benzylaminopurine (BAP) and naphthaleneacetic acid (NAA) and also the coconut water (CW) at various concentrations on the in vitro regeneration of Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) from nodal explant. The study have been conducted for two months using Murashige and Skoog (MS) as the basal media which consist of eight types of treatments combination of BAP and NAA supplemented with or without 15% (v/v) of CW. Each treatment consists of five replicates and all cultures were incubated in a growth chamber with 12h light photoperiod at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Parameters such as number of days for root emergence, number of days for buds break, number of roots/explants, length of roots, number of shoots/explant, length of shoots and the survivality percentage were recorded after 60 days of culture. The experiment was conducted as a Completely Randomized Design (CRD) and data was analysed by using one-way analysis of variance (ANOVA). The result from this study showed that the addition of NAA, BAP and 15% (v/v) of CW in basal media was not significant to regenerate nodal culture of *V. planifolia*.*

SENARAI KANDUNGAN

Kandungan	Muka surat
PENGAKUAN	i
PERAKUAN	ii
PENGHARGAAN	iii
ABSTRAK	iv
<i>ABSTRACT</i>	v
SENARAI KANDUNGAN	vi
SENARAI JADUAL	viii
SENARAI RAJAH	ix
SENARAI SIMBOL, UNIT DAN SINGKATAN	x
BAB 1 PENGENALAN	1
1.1 Latar Belakang Tanaman Vanila	1
1.2 Justifikasi	3
1.3 Objektif	4
1.4 Hipotesis	4
BAB 2 KAJIAN PERPUSTAKAAN	5
2.1 Pengeluaran Tanaman Vanila	5
2.2 Penerangan Botani <i>Vanilla planifolia</i>	7
2.3 Kultur Tisu Tumbuhan	8
2.4 Eksplan	9
2.5 Kaedah Pensterilan	11
2.6 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan dan Perkembangan Eksplan Kultur <i>In Vitro</i>	12
2.6.1 Media Kultur	12
2.6.2 Pengawalatur Tumbuhan	12
2.6.3 Bahan Tambahan Organik	14
2.6.4 Keamatan Cahaya	15
2.6.5 Orientasi Eksplan	15
BAB 3 METODOLOGI	17
3.1 Lokasi Kajian	17
3.2 Penyediaan Stok Larutan	17
3.3 Penyediaan Pengawalatur Tumbuhan	19
3.3.1 <i>Naphthaleneacetic acid</i> (NAA)	19
3.3.2 <i>Benzylaminopurine</i> (BAP)	19
3.3.3 Air kelapa (AK)	19
3.4 Penyediaan Media Murashige dan Skoog (MS)	20
3.5 Bahan Tanaman dan Kultur Aseptik	21
3.6 Proses Kultur	22
3.7 Reka Bentuk Rawatan	23
3.8 Parameter	23
3.8.1 Purata Hari Pembentukan Akar	23



3.8.2	Purata Hari Pertumbuhan Tunas	24
3.8.3	Bilangan Akar	24
3.8.4	Panjang Akar	24
3.8.5	Bilangan Tunas	24
3.8.6	Panjang Tunas	24
2.8.7	Peratus Kemandirian	24
3.5	Reka Bentuk Eksperimen dan Analisis Statistik	25
BAB 4	KEPUTUSAN	26
4.1	Proses Pertumbuhan dan Perkembangan Nod Orkid Vanila	26
4.2	Kesan Pengawalatur Tumbuhan Terhadap Pembentukan Akar Adventitious pada Nod Orkid Vanila	29
4.3	Kesan Pengawalatur Tumbuhan Terhadap Pertumbuhan Bilangan Akar Adventitious pada Eksplan	30
4.4	Kesan Pengawalatur Tumbuhan Terhadap Pertumbuhan Tunas Nod Orkid Vanila	31
4.5	Kesan Pengawalatur Tumbuhan Terhadap Pertumbuhan Bilangan Tunas pada Eksplan	32
4.6	Kesan Pengawalatur Tumbuhan Terhadap Peratus Kemandirian Eksplan Nod Orkid Vanila	33
BAB 5	PERBINCANGAN	35
5.1	Kesan Pengawalatur Tumbuhan Terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Nod Orkid Vanila	35
5.2	Kesan Pengawalatur Tumbuhan Terhadap Pembentukan Akar pada Nod Orkid Vanila	36
5.3	Kesan Pengawalatur Tumbuhan Terhadap Pertumbuhan Tunas pada Nod Orkid Vanila	38
5.4	Kesan Pengawalatur Tumbuhan Terhadap Peratus Kemandirian Eksplan Nod Orkid Vanila	40
BAB 6	KESIMPULAN	42
6.1	Kesimpulan	42
6.2	Cadangan	42
RUJUKAN		43
LAMPIRAN		47

SENARAI JADUAL

Jadual		Muka surat
2.1	Komposisi kimia buah vanila yang sudah diproses	7
2.2	Pemilihan tisu eksplan berdasarkan matlamat pengkulturan	10
3.1	Kuantiti bahan kimia yang digunakan bagi menyediakan stok makronutrien, stok mikronutrien, stok zat besi dan stok vitamin	18
3.2	Jumlah isipadu setiap stok bagi menyediakan 1 L media MS	20
3.3	Rawatan yang direka dengan pelbagai kepekatan pengawalatur tumbuhan yang ditambah pada media Murashige and Skoog (MS)	23
4.1	Kesan pengawalatur tumbuhan terhadap pembentukan akar adventitious pada nod orkid vanila selepas 60 hari pengkulturan	30
4.2	Purata bilangan dan panjang akar adventitious pada eksplan bagi setiap rawatan selepas 60 hari pengkulturan	31
4.3	Kesan pengawalatur tumbuhan terhadap pertumbuhan tunas pada nod orkid vanila selepas 60 hari pengkulturan	32
4.4	Purata bilangan dan panjang tunas pada eksplan bagi setiap rawatan selepas 60 hari pengkulturan	33

SENARAI RAJAH

Jadual		Muka surat
3.1	Keratan tanaman vanila yang digunakan dalam kajian pengkulturan <i>in vitro</i>	21
3.2	Pokok induk bagi eksplan nod yang digunakan dalam pengkulturan	22
4.1	Pertumbuhan dan perkembangan nod orkid vanila sepanjang tempoh 60 hari pengkulturan. (a) Permulaan benjolan bagi pembentukan akar pada eksplan yang dirawat dengan media MS tanpa sebarang pengawalatur tumbuhan; (b) permulaan bagi pertumbuhan tunas media MS yang ditambah dengan 0.5mg/L BAP dan 0.5mg/L NAA; (c) induksi akar dan tunas pada nod eksplan pada hari ke-30 di dalam media MS yang ditambah dengan 0.5mg/L BAP dan 0.5mg/L NAA dan (d) perkembangan eksplan nod pada media MS yang ditambah dengan 0.5mg/L BAP dan 0.5mg/L NAA pada hari ke-60	27
4.2	Regenerasi nod orkid vanila apabila dirawat dengan media MS yang ditambah dengan pengawalatur tumbuhan selepas 60 hari. (a) MS0; (b) MS + 0.5mg/L BAP + 0.5mg/L NAA; (c) MS + 1.0mg/L BAP + 0.5mg/L NAA; (d) MS + 1.5mg/L BAP + 0.5mg/L NAA; (e) MS + 15% v/v AK; (f) MS + 0.5mg/L BAP + 0.5mg/L NAA + 15% v/v AK; (g) MS + 1.0mg/L BAP + 0.5mg/L NAA + 15% v/v AK dan (h) MS + 1.5mg/L BAP + 0.5mg/L NAA + 15% v/v AK	28
4.3	Pembentukan awal akar pada nod orkid vanila	29
4.4	Peratus kemandirian eksplan nod orkid vanila pada hari ke-60	34
4.5	Contoh eksplan (a) bertindak balas dan (b) mati di dalam tempoh kajian	34

SENARAI SIMBOL, UNIT DAN SINGKATAN

°	Darjah
%	Peratus
°C	Darjah Celsius
AK	Air Kelapa
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
BAP	<i>Benzylaminopurine</i>
CRD	<i>Completely Randomised Design</i>
CW	<i>Coconut Water</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organisation</i>
h	<i>Hour</i>
IAA	<i>Indole Acetic acid</i>
IBA	<i>Indole butyric acid</i>
Kg	Kilogram
Km	Kilometer
kPa	<i>Kilopascal</i>
L	Liter
M	Molar
MARDI	<i>Malaysian Agricultural Research and Development Institute</i>
mg	Milligram
mL	Mililiter
MS	Murashige dan Skoog
N	<i>Newtons</i>
NAA	<i>Naphthaleneacetic acid</i>
RM	Ringgit Malaysia
sm	Sentimeter

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Tanaman Vanila

Vanilla planifolia Andrews merupakan tanaman daripada keluarga orkid, iaitu Orchidaceae. Keluarga orkid mempunyai lebih dari 100 spesies (Cribb *et al.*, 2003) dan *Vanilla planifolia* merupakan satu-satunya orkid yang menghasilkan buah yang boleh dimakan. *Vanilla planifolia* atau lebih dikenali dengan tanaman vanila, merupakan tanaman bersifat menjalar dan memanjat, batangnya berwarna hijau tua berbentuk silinder dengan garis pusat 1-2 sm, berair, lunak dan mempunyai cabang yang banyak. Tanaman vanila juga boleh tumbuh setinggi 10-15 meter dan mengeluarkan daun hijau tua daripada ruas-ruas yang berjarak 5-15 sm dan menghasilkan akar udara yang berlawanan dengan kedudukan daun (Divakaran *et al.*, 2015).

Menurut Divakaran *et al.* (2006), tanaman vanila ditanam secara meluas di sesetengah negara iaitu Madagascar, Indonesia dan China kerana ia mampu tumbuh dengan baik di negara yang beriklim sederhana panas dan lembab sepanjang tahun dengan julat suhu 26°C sehingga 30°C. Pengeluar vanila yang utama pada tahun 2006 merupakan negara Madagaskar dengan hasil sebanyak 6,200 tan setahun dan diikuti oleh Indonesia dan China, 2,399 tan setahun dan 1,000 tan setahun (FAOSTAT, 2006). Institut Penyelidikan dan Kemajuan Pertanian Malaysia (MARDI) telah melakukan kajian pada tahun 1992 untuk membuktikan bahawa tanaman vanila yang ditanam di dalam Malaysia boleh menghasilkan buah vanila yang berkualiti baik (Jalal Ali, 2008). Namun, penghasilan benih tanaman ini untuk tujuan komersial adalah terhad, walhal benih yang diperlukan adalah sangat banyak.



Tanaman vanila kini ditanam secara komersial bagi memperoleh buah vanila yang juga dikenali sebagai "kacang" atau pod. Buah vanila merupakan sumber semula jadi untuk bahan perasa yang penting dari segi ekonomi iaitu Vanilin. Vanilin ialah bahan yang diekstrak daripada buah vanila yang digunakan secara meluas didalam industri makanan. Dengan kemajuan sains dan teknologi, vanilin dari buah vanila kini juga banyak digunakan dalam industri perubatan, wangian, cat tayar dan sebagainya. Pada tahun 1988, anggaran pemasaran oleh McCormick & Co., Inc. mendedahkan bahawa penggunaan ekstrak vanila sebahagian besarnya digunakan oleh sektor perindustrian (75%), diikuti oleh sektor runcit (20%), dan sektor pemprosesan makanan (5%) (Gillette dan Hoffman, 1992). Daripada jumlah yang digunakan dalam sektor perindustrian, 30% adalah digunakan dalam penyediaan ais krim, 17% minuman ringan, 11% minuman beralkohol, 10% dalam penyediaan yogurt dan baki 7% digunakan dalam barangan makanan lain seperti roti, bijirin dan sebagainya (Peter, 2008).

Keratan batang yang matang adalah cara yang lazim digunakan sebagai kaedah propagasi tanaman vanila. Walaubagaimanapun, kaedah ini tidak efektif kerana memakan masa yang lama dan memerlukan tenaga buruh yang ramai. Selain itu, kaedah ini juga didapati tidak efisien kerana mempunyai kadar propagasi yang rendah dan jangka masa yang panjang diperlukan bagi tanaman untuk matang (Zuraida *et al.*, 2014). Selain itu, kaedah keratan batang juga tidak elok dilakukan secara kerap kerana pengambilan keratan boleh menyebabkan tanaman induk vanila mengalami rencatan dari segi pertumbuhan dan juga penurunan hasil. Kemungkinan untuk tanaman induk vanila untuk terkena jangkitan virus juga meningkat dengan kaedah ini disebabkan oleh luka yang terhasil.

Namun demikian, kekurangan bahan tanaman selalu menjadi masalah bagi sektor perladangan. Oleh itu, permasalahan yang timbul akibat kekurangan bahan tanaman telah membuka jalan penyelesaian bagi menambahkan dan memperbanyakkan anak benih tanaman vanila. Propagasi orkid menggunakan teknologi kultur tisu tumbuhan, iaitu dengan menggunakan pelbagai jenis eksplan telah menjadi teknik yang terbukti dan mampu bagi memperbanyakkan, memulihara, dan menyelamatkan pelbagai spesies daripada pupus (Kataki, 1993). Oleh itu, teknik kultur tisu tumbuhan merupakan cara alternatif yang terbaik untuk mengatasi masalah ini.

Selain daripada itu, penggunaan kultur tisu tumbuhan sebagai kaedah untuk mempropagasi tumbuhan juga mempunyai banyak kelebihan, antaranya ialah satu eksplan boleh menghasilkan sehingga beberapa ribu anak benih, penghasilan gandaan tumbuhan tanpa menggunakan benih atau pendebunga, dan pengeluaran tumbuhan di dalam bekas yang steril. Tumbuhan di dalam bekas steril membolehkan pemindahan dilakukan dengan kurang peluang bagi penyakit, perosak atau patogen daripada menyerang (Akin-Idowu *et al.*, 2009). Kultur tisu tumbuhan umumnya merupakan teknologi mantap yang telah memberi sumbangan besar terhadap penyebaran dan penambahbaikan tanaman pertanian dan sekaligus meningkatkan hasil pertanian.

Oleh itu, kajian ini pada asasnya adalah untuk meningkatkan kadar pertumbuhan nod tanaman vanila dengan mencari kadar kepekatan yang optimum hasil kombinasi pengawalatur tumbuhan, BAP dan NAA serta air kelapa di dalam media Murashige dan Skoog (MS) sebagai media asas bagi tujuan meningkatkan penghasilan bahan tanaman bagi tanaman vanila melalui kaedah kultur tisu tumbuhan.

1.2 Justifikasi

Tanaman vanila telah diperkenalkan secara meluas kepada negara-negara beriklim tropika, iaitu iklim yang sesuai untuk penanamannya (Weiss, 2002). Namun, penghasilan dan penanaman tanaman vanila adalah sukar kerana pendebungaan secara manual perlu dilakukan pada tanaman vanila untuk menghasilkan buah.

Propagasi tanaman vanila secara komersial selalunya dilakukan secara keratan batang yang diambil daripada batang tanaman vanila yang sihat. Namun demikian, keratan yang pendek, iaitu 20 sm panjang, mengambil masa dalam tiga hingga empat tahun untuk membesar, berbunga dan berbuah. Penggunaan kaedah yang berkesan dan efektif adalah sangat penting dalam usaha untuk memenuhi permintaan untuk anak benih bagi penanaman dan pengeluaran tanaman vanila secara besar-besaran.

Kultur tisu tumbuhan dipilih untuk kajian ini kerana kaedah ini merupakan satu-satunya cara yang praktikal bagi menghasilkan anak benih dalam jumlah yang besar. Hal ini kerana, daripada satu keratan batang, boleh menghasilkan banyak eksplan daripada bahagian-bahagian seperti daun, akar, nod bahkan sel, yang membolehkan penghasilan tumbuhan pada kadar infiniti (Lydiane *et al.*, 2013).

Oleh itu, kajian ini dijalankan untuk mengkaji kesan dua jenis pengawalatur tumbuhan, iaitu *benzylaminopurine* (BAP) dan *naphthaleneacetic acid* (NAA) serta campuran air kelapa ke atas regenerasi *Vanilla planifolia* secara *in vitro* dengan menggunakan bahagian nod sebagai eksplan.

1.3 Objektif

Mengenalpasti kesan penambahan pelbagai jenis kepekatan pengawalatur tumbuhan *benzylaminopurine* (BAP) dan *naphthaleneacetic acid* (NAA) serta campuran air kelapa ke atas regenerasi orkid *Vanilla planifolia* secara *in vitro*.

1.4 Hipotesis

H_0 : Tiada kesan yang ketara hasil penambahan pelbagai kepekatan BAP dan NAA serta campuran air kelapa ke atas regenerasi *Vanilla planifolia* secara *in vitro*.

H_a : Memberi kesan yang ketara hasil penambahan pelbagai kepekatan BAP dan NAA serta campuran air kelapa ke atas regenerasi *Vanilla planifolia* secara *in vitro*.

BAB 2

KAJIAN PERPUSTAKAAN

2.1 Pengeluaran Tanaman Vanila

Orkid memerlukan gabungan kepelbagaian faktor untuk pembiakan berterusan dalam alam semula jadi. Pembiakan spesies orkid secara seksual adalah satu proses yang sangat perlahan kerana benih memerlukan bantuan daripada agen pendebungaan (Arditti *et al.*, 1993). *Vanilla planifolia* Andrews termasuk didalam keluarga orkid (orchidaceae), yang mana merupakan tanaman yang paling maju dalam urutan Liliales, dan terdiri daripada lebih kurang 1,000 genera dan 35,000 spesies seluruh dunia (Lee, 2002).

Vanilla planifolia yang lebih dikenali dengan nama tanaman vanila mengeluarkan buah hasil daripada pendebungaan. Buah yang dihasilkan daripada tanaman vanila adalah satu-satunya buah yang boleh dimakan dalam keluarga orkid. Buah vanila mempunyai kepentingan komersial yang luas dan salah satunya adalah sebagai sumber vanillin asli. Vanilin ialah komponen utama di dalam industri makanan sebagai bahan perasa. Tanaman vanila mempunyai banyak spesies namun, kesemua spesies menghadapi masalah yang sama iaitu pembiakan dan juga hasil keluaran. Bagi menghasilkan buah daripada tanaman vanila, kerja yang rumit bagi pendebungaan bunga terlibat. Hal ini disebabkan oleh ketidakwujudan serangga pendebunga yang boleh melakukan pendebungaan bunga orkid vanila di dalam Malaysia. Oleh itu, bunga orkid vanila perlu didebunga dengan bantuan manusia. Cara alternatif untuk mengatasi masalah ini adalah dengan memperbanyakkan benih tanaman, yang mana merupakan salah satu daripada masalah dalam sektor perladangan.



Pengeluaran vanila seluruh dunia dari tahun 2000 hingga 2006 adalah sebanyak 6,000 – 10,000 metrik tan (FAO, 2009). Harga buah atau pod kering vanila di pasaran antarabangsa juga meningkat sehingga boleh mencapai USD50 hingga USD100 sekilogram (Korporasi Pembangunan Desa, 2007). Selain daripada itu, keperluan vanila juga semakin meningkat kerana sehingga tahun 2011, dunia hanya menggunakan tiga peratus sahaja vanila asli manakala selebihnya masih menggunakan vanila sintetik (Mustapar, 2011).

Vanila sintetik mengandungi campuran bahan kimia. Bagi menghasilkan rasa yang menyerupai rasa vanila asli, campuran kimia yang mempengaruhi rasa pada vanila asli dikenalpasti. Lignin vanilin ialah sebatian yang dihasilkan dengan campuran bahan kimia yang menghasilkan rasa yang menyerupai rasa vanilin asli yang merupakan komponen dalam bahan buangan dari industri pulpa kayu. Bahan buangan seperti sisa daripada pembuatan kertas mengandungi campuran bahan yang boleh menghadirkan gula bagi menghasilkan alkohol melalui proses penapaian. Alkohol yang dihasilkan akan digunakan untuk proses membuat vanilin. Sebahagian besar daripada pengeluaran perasa vanila sintetik mengambil alternatif mencampurkan alkohol ke dalam pemrosesan bahan perasa bagi membantu mengawet bahan perasa mereka. Bahan perasa kebiasaannya akan terlibat dalam masakan dan alkohol di dalam bahan perasa akan terbakar, namun demikian, terdapat kes mabuk setelah pengambilan.

Vanila asli ialah campuran kompleks yang diekstrak daripada buah yang dikeringkan hasil daripada dua spesies orkid vanila yang berbeza iaitu *Vanilla planifolia* dan *Vanilla tahitensis* (Rao dan Ravishankar, 2000). Profil perasa dan wangian ekstrak vanila asli mengandungi lebih daripada 200 komponen dan komponen utama yang mempengaruhi komposisi kimia vanila yang dikenalpasti adalah seperti yang disenaraikan pada Jadual 2.1 di bawah. Selain daripada menjadi bahan penambah perasa, ekstrak vanila asli juga memberikan kebaikan dari segi kesihatan seperti mengandungi kandungan antioksidan yang tinggi, bertindak sebagai agen antibakteria, mengurangkan radang pada tekak dan seluruh badan, mengurangkan kolesterol tinggi dan banyak lagi (Shyamala *et al.*, 2007).

Jadual 2.1: Komposisi kimia buah vanila yang sudah diproses

Komponen	g/Kg buah
Vanilin	20
Asid vanilic	1
p-hidroksibenzaldehide	2
asid p-hidroksibenzoik	0.2
Gula	250
Lipid	150
Selulosa	150-300
Mineral	60
Air	350

Sumber: Rao dan Ravishankar (2000)

2.2 Penerangan Botani *Vanilla planifolia*

Orchidaceae adalah keluarga tumbuhan berbunga terbesar yang terdiri lebih daripada 880 genera dan 25,000 spesies (Moudi *et al.*, 2013) dan taburan bagi tanaman daripada keluarga ini banyak di kawasan tropika. Sebahagian besar daripada tanaman keluarga *orchidaceae* adalah tumbuhan *epiphytic* yang tumbuh pada dahan dan batang pokok dan mempunyai hubungan simbiotik sepanjang kitaran hidup mereka (Chan *et al.*, 1994).

Terdapat beberapa jenis orkid vanila yang boleh menghasilkan buah vanila untuk tujuan bahan perasa dan industri seperti *Vanilla planifolia* Andrews, *Vanilla pompano* schieda dan *Vanilla tahinensis* J. W. Moore (Korporasi Pembangunan Desa, 2007). Walaubagaimanapun, *Vanilla planifolia* adalah varieti yang paling penting dan paling banyak dikaji (FAO, 2009). Purseglove *et al.* (1981) menyatakan terdapat hamper 110 spesies tanaman vanila yang terdapat di kawasan beriklim tropika seluruh dunia. Senarai taksonomi bagi spesies vanila adalah seperti di bawah.

Kingdom	<i>Vegetal</i>
Jenis	<i>Fenerogamae</i>
Kelas	<i>Monocotyledonae</i>
Order	<i>Microspermae</i>
Keluarga	<i>Orchidaceae</i>
<i>Tribe</i>	<i>Vanillae Blume</i>
<i>Genre</i>	<i>Vanilla Swartz</i>
Spesies	<i>Vanilla planifolia</i> Andrews

Sumber: Mabberley *et al.* (1997)

2.3 Kultur Tisu Tumbuhan

Tanaman vanila asalnya dipropagasi secara keratan batang ataupun dengan menggunakan biji benih (FAO, 2009). Namun begitu, tenaga kerja yang banyak diperlukan bagi proses pendebungaan untuk menghasilkan buah membuatkan kaedah ini tidak efektif. Proses pendebungaan perlu dilakukan dengan tangan untuk menghasilkan buah dan bunga yang mekar hanya akan mekar sekali. Bunga yang tidak melalui proses pendebungaan hanya akan bertahan selama sehari. Kini, kaedah kultur tisutumbuhan yang juga dikenali dengan nama mikropropagasi *in vitro*, dapat memperbaiki kaedah bagi memperbanyakkan tanaman vanila.

Kultur tisutumbuhan mempunyai banyak kegunaan termasuklah membolehkan regenerasi klon yang pantas, penghapusan penyakit tumbuhan, kultur anter untuk penghasilan tanaman haploid, pengasingan protoplas untuk penghasilan tanaman hibrid, kultur embrio, pengeluaran bahan botani, pemilihan sel dan mutasi, pengeluaran benih sintetik, kultur kalus dan kultur bunga. Motif bagi kaedah ini adalah mudah iaitu untuk menggandakan bilangan tumbuhan (Kumar dan Singh, 2014).

Sebelum teknik kultur tisutumbuhan diperkenalkan, kaedah keratan merupakan kaedah utama dalam industri pengeluaran vanila secara komersial. Dalam pembiakan secara vegetatif, keratan perlu diambil dari tanaman induk yang kuat dan sihat dan boleh dipotong daripada mana-mana bahagian batang. Panjang pemotongan kebiasannya ditentukan oleh jumlah bahan tanaman yang ada. Keratan yang pendek, 20 sm panjang memerlukan tiga hingga ke empat tahun untuk berbunga dan berbuah. Keratan yang panjang adalah lebih efektif, oleh itu, keberolehan bilangan anak benih tanaman adalah sedikit.

Kini, regenerasi *in vitro* adalah satu kaedah yang berpotensi untuk menyelesaikan masalah kekurangan bilangan anak benih. Regenerasi secara *in vitro* telah melalui pelbagai evolusi hasil daripada kajian-kajian lalu. Kaedah saintifik, alat penyelidikan, aplikasi kajian dan juga eksploitasi masa merupakan faktor penggerak kepada penemuan dan kajian yang dijalankan. Kini, mikropropagasi merupakan asas kepada industri pembiakan tanaman komersial yang melibatkan beratus-ratus makmal kajian di seluruh dunia. Teknologi ini digunakan untuk memenuhi permintaan pasaran bagi anak benih

vanila dan untuk mengatasi masalah dalam kaedah alternatif pembiakan (Zuraida *et al.*, 2013).

Mikropropagasi orkid melalui kultur tisu dapat menggunakan eksplan yang pelbagai, seperti daun, batang, akar dan nod, dan kini telah menjadi satu teknik penting untuk mengeluarkan semula, memulihara, dan menyimpan banyak spesies daripada pupus (Kataki, 1993). Terdapat banyak kelebihan menggunakan kultur tisu sebagai kaedah pembiakan tumbuhan, seperti, penggandaan kepada beberapa ribu tumbuhan daripada satu tanaman induk, pengeluaran membiak tumbuhan dalam ketiadaan benih atau pendebunga, dan pengeluaran tumbuh-tumbuhan di dalam bekas steril. Penghasilan benih tumbuhan pada bekas steril membolehkan mereka bergerak dengan peluang dikurangkan daripada menghantar penyakit, perosak dan patogen (Akin-Idowu *et al.*, 2009).

2.4 Eksplan

Kultur organ ialah perkembangan melalui kajian kultur tisu yang membolehkan mana-mana bahagian pada tanaman diambil sebagai eksplan dan dikultur bagi menghasilkan tanaman baru. Hal ini disebabkan oleh sel tumbuhan yang bersifat totipotensi (Ezhova, 2003). Pengertian totipotensi adalah kemampuan setiap sel tumbuhan untuk membentuk individu baru yang sempurna. Teknik ini juga membolehkan masalah yang pelbagai mengenai morfogenesis, ruang biosintesis metabolik yang spesifik dan gabungan pertumbuhan dikenalpasti (Kumar, 2011). Terdapat dua kategori bagi kultur organ iaitu organ vegetatif dan juga organ pembiakan. Eksplan merupakan tisu yang diambil daripada tanaman induk untuk digunakan dikultur di dalam media kultur tisu.

Pemilihan tisu pada eksplan bergantung kepada matlamat utama pengkulturan. Pelbagai faktor pada sumber eksplan yang boleh mempengaruhi pertumbuhan kultur pada media antaranya adalah fisiologi dan usia tisu, kualiti sumber tisu, saiz eksplan dan matlamat pengkulturan. Jadual 2.2 menunjukkan tisu atau bahagian pada tanaman yang sesuai untuk dijadikan eksplan bagi beberapa matlamat pengkulturan.

Jadual 2.2: Pemilihan tisu eksplan berdasarkan matlamat pengkulturan

Matlamat pengkulturan	Tisu eksplan
Kultur tunas	Tunas apikal dan sisi
Kultur meristem	Meristem apikal
Mikropropagasi	Apeks tunas atau tunas sisi atau embrio
Kultur akar	Akar lateral daripada anak pokok
Kultur kalus/embriogenesis somatik	Kotiledon, hipokotil, batang, daun, akar dan mana-mana bahagian anak pokok
Kultur haploid	Anter dan debunga

Sumber: Kumar dan Singh (2014)

Dengan menggunakan teknik kultur tisu tumbuhan, vanila telah berjaya dipropagasi melalui organogenesis langsung dan organogenesis tidak langsung. Kini, teknik ini telahpun memudahkan pengenalan bahan genetik baru untuk tanaman orkid. Geetha dan Shetty (2000); Kononowicz dan Janick (1984) telah melaporkan penggunaan hujung pucuk dan bahagian nod untuk kaedah mikropropagasi yang efisien. Manakala, hasil daripada kajian oleh Abebe *et al.* (2009) melaporkan bahawa bahagian nod merupakan eksplan yang berpotensi tinggi untuk digunakan dalam kaedah penggandaan *in vitro* orkid vanila yang efisien di Ethiopia. Divakaran *et al.* (2006) juga telah melaporkan penggunaan bahagian nod untuk kajian perbezaan jenis tanaman vanila dalam pemuliharaan spesies vanila secara *in vitro* dan menunjukkan hasil yang positif.

Zuraida *et al.* (2014) mengkaji kaedah yang mudah dan efisien untuk propagasi yang banyak terhadap *Vanilla planifolia* juga telah menunjukkan keputusan bahawa bahagian nod pada pucuk berpotensi sebagai eksplan untuk permulaan pucuk, iaitu pada kadar enam pucuk untuk setiap satu eksplan dalam masa tiga bulan selepas didedahkan dengan 6-benzyl amino purine (BAP) dan α -Naphthalenacetic acid (NAA). Penemuan dalam kajian ini menunjukkan yang segmen eksplan nod menunjukkan prestasi yang lebih baik dalam menghasilkan pelbagai pucuk dibandingkan dengan puncak pada batang.

Kini, penggunaan eksplan nod dalam pengkulturan adalah sangat digalakkan bagi tujuan penghasilan tunas. Namun, untuk mengeluarkan tunas sisi adalah sukar walaupun dengan bantuan pengawalatur tumbuhan seperti sitokinin. Pada masa ini, teknik pengkulturan bahan tanaman adalah popular dalam sektor pertanian, terutama sekali bagi tanaman yang memerlukan kaedah pembiakan komersial bagi menjaga kualiti bahan tanaman. Walaupun kadar pertambahan tanaman kebiasaanya kurang daripada

yang boleh dibawa melalui kultur tunas, namun ada kemungkinan yang hal ini adalah disebabkan oleh kekurangan pembentukan kalus dan pembentukan tunas, yang menyebabkan peringkat kedua sub-kultur membawa sedikit risiko mengenai ketidakaturan genetik (George dan Debergh, 2008).

Beberapa kajian telah menunjukkan bahawa sesetengah eksplan tidak bertindak balas atau menunjukkan gabungan yang serasi antara eksplan, media dan pengawalatur tumbuhan yang digunakan. Menurut Nurul Jadid *et al.* (2015), pilihan media serta jenis pengawalatur tumbuhan yang digunakan adalah sangat penting dalam propagasi *in vitro*. Nurul Jadid *et al.* (2015) telah mengkaji kesan dua jenis pengawalatur tumbuhan, *Indole acetic acid* (IAA) dan Kinetin (KIN) ke atas kultur tumbuhan *in vitro* bagi tanaman *Vanilla planifolia* dengan menggunakan pucuk mikro yang diperolehi daripada eksplan nod dan menghasilkan tindak balas yang baik pada pertambahan pucuk daripada eksplan yang digunakan.

Berdasarkan kajian-kajian yang telah dilakukan, hujung pucuk dan tunas aksil kerap digunakan dalam kultur tisu tumbuhan dan bahagian nod adalah yang eksplan yang menunjukkan respon terbaik untuk tujuan propagasi. Selain itu, ia juga menunjukkan kadar pertahanan yang baik dan mudah untuk didapati berbanding dengan eksplan yang lain. Oleh sebab itu, kultur nod tumbuhan adalah sangat digalakkan oleh para penyelidik sebagai kaedah bagi menghasilkan tanaman secara *in vitro* yang boleh mendorong perubahan kepelbagaian somaklonal (Prakash dan Van Staden, 2008; Ahmad dan Anis, 2011; Asthana *et al.*, 2011).

2.5 Kaedah Pensterilan

Teknik pensterilan pada permukaan setakat ini adalah kaedah yang paling biasa digunakan untuk memberi keadaan aseptik kepada semua jenis eksplan tumbuhan seperti biji benih dan nod sebelum dikultur. Eksplan dibasuh di dalam air steril, dicuci dengan etanol, dan pensterilan permukaan dilakukan dengan menggunakan bahan kimia yang berasaskan klorin. Larutan yang berasaskan kalsium atau natrium hipoklorit, 1-3% (v/v) kebiasanya digunakan untuk eksplan yang lembut, iaitu eksplan yang tidak mempunyai dinding sel yang tebal seperti tanaman spesies orkid.

2.6 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan dan Perkembangan Eksplan Kultur *In Vitro*

2.6.1 Media Kultur

Nutrien mineral adalah salah satu komponen asas dalam media propagasi *in vitro*. Ia mempengaruhi kejayaan pertumbuhan tisu di dalam *in vitro* hasil daripada tindakbalas morfologi oleh jenis dan kepekatan nutrien yang dibekalkan. Komposisi organik dan mineral pada media kultur adalah sangat penting untuk memperbaiki pembahagian dan bagi mengoptimumkan pertumbuhan eksplan yang digunakan. Jumlah nutrien yang terkandung didalam media kultur juga mestilah mencukupi untuk menggalakkan pertumbuhan sepanjang tempoh pengkulturan.

Terdapat 13 unsur mineral penting untuk pertumbuhan tumbuhan (Epstein dan Bloom, 2005) dan penentuan kadar pengawalatur untuk eksperimen bagi mengenal tahap nutrien yang optimum adalah rumit. Kerumitan ini menggambarkan mengapa "media disemak semula" yang dibangunkan oleh Murashige dan Skoog (1962) adalah satu perkembangan yang penting. Walaupun media Murashige dan Skoog (MS) tidak optimum untuk sesetengah jenis tisu, namun banyak tisu berjaya tumbuh di atasnya pada tahap yang tertentu; oleh itu, media MS merupakan titik permulaan untuk memulakan proses memperbaiki tindakbalas eksplan pada media.

2.6.2 Pengawalatur Tumbuhan

a) Auksin (*Naphthaleneacetic acid*)

Sesetengah bahan kimia semula jadi dalam tisu tumbuhan mempunyai susunan dalam peranan pengambilan nutrien bagi membantu pertumbuhan dan pembangunan tumbuhan. Sebatian ini yang secara umumnya aktif pada kepekatan yang sangat rendah, yang dikenali sebagai hormon tumbuhan atau pengawalatur tumbuhan. Bahan kimia sintetik dan aktiviti fisiologi adalah sama dengan bahan pertumbuhan tanaman atau sebatian yang mempunyai keupayaan untuk mengubah suai pertumbuhan tumbuhan yang pada kebiasaannya ditermakan sebagai pengawalatur tumbuhan.

RUJUKAN

- Abebe, Z., Mangesha, A., Teressa, A., & Tefera, W. (2009). Efficient in vitro multiplication protocol for *Vanilla planifolia* using nodal explants in Ethiopia. *African Journal of Biotechnology*, 8 (24), 6817-6821.
- Ahmad, N. & Anis, M. (2011). An efficient in vitro process of recurrent production of cloned plants of *Vitex negundo* L.. *European Journal of Forest Research*, 130, 135-144.
- Akin-Idowu, P. E, Ibitoye, D. O. & Ademoyegun, O. T. (2009). Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. *African Journal of Biotechnology*, 3782-3788.
- Anandana, S. W., Rademaker, M., Ramanna, M., Kumar, U. & Jong, J. D. (2000). Response of stem explants to screening and explant source as basis for methodological advantage of regeneration protocols for chrysanthemum. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 62, 47-55.
- Arditti, J. & Ernst, R. (1993). *Micropropagation of orchids*. New York: John Wiley and sons.
- Asthana, P., Jaiswal, V. S. & Jaiswal, U. (2011). Micropropagation of *Sapindus trifoliatus* L. and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD analysis. *Acta Physiol Plant*, 33, 1821-1829.
- Ayele, Y. B., Tefera, W. & Bantte, K. (2017). Enhanced protocol development for in vitro multiplication and rooting of vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.) clove (van.2/05). *Biotechnology Journal International*, 18(3), 1-11.
- Balakrishnan, V., Latha, M. R., Ravindran, K. C. & Robinson, J. P. (2009). Clonal propagation of *Morus alba* L. through nodal and axillary bud explants. *Botany Research International*, 2(1), 42-49.
- Banu, L. A. & Bari, M. A. (2007). Protocol establishment and multiplication and regeneration of *Ocimum sanctum* Linn. an important medicinal plant with high religious value in Bangladesh. *Journal of Plant Science*, 2(5), 530-537.
- Behera, K. K., Sahoo, S. & Prusti, A. (2009). Regeneration of plantlet of water yam (*Dioscorea oppositifolia* L.) through in vitro culture from nodal segments. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj*, 37(1), 94-102.
- Boon, C. T., Chiew, F. C. & Peter, A. (2011). An improved plant regeneration of *Vanilla planifolia* Andrews. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 21(1), 27-33.
- Bunn, E., & Tan, B. H. (2002). Microbial contaminants in plant tissue culture propagating. In K. Sivasithamparam, & K. W. Dixon (Eds.), *Microorganisms in plant conservation and biodiversity* (pp. 307-335). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Chan, C. L., Lamb, A., Shim, P. S. & Wood, J. J. (1994). *Orchid of Borneo* (Vol. 1). Kota Kinabalu, The Sabah society and Royal Botanic Kew.
- Coenen, C. & Lomax, T. L. (1997). Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends in Plant Science*, 2, 351-356.
- Cribb, P. J., Lell, S. P., Dixon, K. W. & Barrett, R. L. (2003). *Chapter one – Orchid conservation: a global perspective*. Orchid conservation: Natural History Publications.
- Davies, P. J. (2004). *Regulatory factors in hormone action: Level, location and signal transduction*. In: Davies PJ (Eds). *Plant Hormones*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Decruse, S. W., Gangaprasad, A., Seenii, S. & Menon, S. (2003). A protocol for shoot multiplication from foliar meristem of *Vanda spathulata* (L.) Spreng. *Journal of Experimental Biology*, 41, 924-927.

- Divakaran, M., Babu, K. N. & Peter, K. V. (2006). Conservation of vanilla species, in vitro. *Scientia Horticulturae*, 175-180.
- Divakaran, M., Babu, K. N., Ravindran, P. N., & Peter, K. V. (2015). Biotechnology for micropropagation and enhancing variations in vanilla. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5(2), 52-62.
- Dix, L. & Van Staden, J. (1982). Auxin and gibberellins-like substances in coconut milk and malt extract. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1, 239-245.
- Epstein, E. & Bloom, A. J. (2005). *Mineral nutrition of plants: principles and perspectives* (2nd ed.). Sunderland, Sinauer Associates.
- Ezhova, T. A. (2003). Genetic control of totipotency of plant cells in an in vitro culture. *Russian Journal of Developmental Biology*, 34(4), 245-252.
- FAO. (2009). Vanilla post-harvest operations. *InPhO: Post-harvest Compendium*. UN.
- FAOSTAT. (2006). Vanilla post-harvest operations. Javier, C. M., Guadalupe, C. R., & Hugo, S. G.. In: *PHO – Post-harvest Compendium*.
- Geetha, S. & Shetty, A.S. (2000). In vitro propagation of *Vanilla planifolia* a tropical orchid. *Current Science*, 79, 886-889.
- George, E. F. & Debergh, P. C. (2008). Micropropagation: uses and methods. *Plant propagation by tissue culture* (3rd ed., Vol. 1). In: Springer, Dordrecht.
- George, P.S. & Ravishankar, G.A. (1997). In vitro multiplication of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants. *Plant Cell Reports*, 16, 490-494.
- Georges, D., Chemienx, J. C., & Ochatt, S. D. (1993). Plant regeneration from aged callus of woody ornamental species *Lonicera japonica* cv. Hell's prolific. *Plant Cell Reports*, 13, 91-94.
- Gillette, M. H. & Hoffman, P. G. (1992). Vanilla Extract. In *Encyclopedia of Food Science and Technology* (Vol. 4, pp. 2641-2657). New York, John Wiley and Sons, Inc.
- Girija, S., Ganapathi, A. & Vengadesan, G. (1999). Micropropagation of *Crossandra infundibuliformis* (L.) Nees. *Scientia Horticulturae*, 82, 331-337.
- Goh, C. J. & Wong, P. F. (1990). Micropropagation of the monopodial orchid hybrid *Aranda Deborah* using inflorescence explants. *Scientia Horticulturae*, 44, 315-321.
- Jalal Ali, A. R. (2008). Vanilla diperkenal jadi tanaman komoditi baru. *Berita harian*, 27 Februari, 22.
- Janarthanam, B. & Seshadri, S. (2008). Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 44, 84-89.
- Juddy, E. J. & Jualang, A. G. (2016). Effect of growth regulators and explant orientation on shoot tip culture of borneo endemic orchid, *Dimorphorchis lowii*. *Transactions on Science and Technology*, 3(2), 306-312.
- Kataki, S. K. (1993). The present status of some selected orchid genera in North Eastern India. *Journal of the Orchid Society of India*, 7(1-2), 79-81.
- Knauss, J. F., & Miller, J. W. (1978). A contaminant, *Erwinia cartovora*, affecting commercial plant tissue cultures. *In Vitro*, 14(9), 754-756.
- Kononowicz, H. & Janick, J. (1984). In vitro propagation of *Vanilla planifolia*. *Horticultural Science*, 58-59.
- Korporasi Pembangunan Desa. (2007). Penanaman vanilla. Retrieved from: <http://ww2.sabah.gov.my/kpd/oldoldweb/Projek-Vanilla.html>.
- Kozak, D., Elzbieta, P. & Mariusz, S. (2013). The influence of type and orientation of explants on in vitro growth and development of *Cosmos atosanguineus* (Hook.) Voss. *Acta Scientiarum Polonorum, Hotorum Cultus*, 12(1), 41-53.
- Kumar, S., & Singh M. P. (2014). *Plant tissue culture*. New Delhi: APH Publishing Corporation.
- Kumar, U. (2011). *Methods in plant tissue culture*. 3rd edition. Jodhpur: Agribios (India).

- Lee, S. S. (2002). A review of orchid mycorrhizae in Korea. *Plant Pathology Journal*, 169-178.
- Leifert, C. & Waites, W. M. (1994). Dealing with microbial contaminants in plant tissue and cell culture: hazard analysis and critical control points. *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*, 363-378.
- Lo, S. F, Nalawade, S. M., Kuo Chen, C. L. & Tsay, H. S. (2004). Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and ex vitro establishment of plantlets of *Dendrobiumtosaense* Makino – a medicinally important orchid. *In vitro Cellular and Developmental Biology*, 40, 528-535.
- Lydiane, K., John, K., Holly, S. & Mark, B. (2013). *Plants from Test Tubes*. London: Timber Press, inc.
- Mabberley, D. J. (1997). *The plant-book* (pp. 858-870). United Kingdom, University Press, Cambridge.
- Magyar-Tabori, K., Dobranszki, J., Teixeira da Silva, J. A., Bulley, S. M. & Hudak, I. (2010). The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 101, 251–267.
- Mauney, J. R., Hillman, W. S., Miller, C. O. & Skoog, M. F. (1952). Bioassay, purification and properties of a growth factor from coconut. *Plant Physiology*, 5, 485-479.
- Mohapatra, A. & Rout, G. R. (2004). In vitro micropropagation of *Geoderum purpureum* R.Br. *Indian Journal of Biotechnology*, 4, 568-570.
- Moudi, M., Co, R., Yien, C. Y. S. & Saleh, M. N. (2013). A review on molecular systematic of the genus *Dendrobium* Sw. *Acta Biologica Malaysiana*, 2(2), 71-78.
- Murashige, T. & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15, 473–497.
- Mustapar, M. (2011). Agrobiz: Vanilla semakin diusahakan. *Utusan Online*, 10 Januari. Retrieved from: http://ww1.utusan.com.my/utusan/info.asp?y=2011&dt=0110&pub=Utusan_Malaysia&sec=Agrobiz&pg=ag_01.htm.
- Nagesh, K. S. (2008). High frequency multiple shoot induction of *Curculigo orchoides* Gaertn.: Shoot tip V/S Rhizome disc. *Taiwania*, 53(3), 242-247.
- Nurul Jadid, Tutik, N. & Priyono. (2015). In vitro clonal propagation of *Vanilla planifolia* Andrews using microshoot-derived node explants. *Journal of Applied Environmental and Biological Science*, 105-110.
- Peter, K. V. (2008). *Handbook of herbs and spices*. Kerala Agricultural University, India.
- Prakash, S. & Van Staden, J. (2008). Micropropagation of *Searsia dentata*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 44, 338–341.
- Purseglove, J. W., Brown, E. G., Green, G. L & Robbins, S. R. J. (1981). *Spice* (Vol. 2). New York, Longman Inc..
- Rao, S.R & Ravishankar, G. A. (2000). Vanilla flavor: production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 289-304.
- Rethinam, P. & Kumar, N. T. B. (2001). Tender coconut water: an overview. *Indian Coconut Journal*, 33, 2-22.
- Sagawa, Y., Shoji, T. & Shoji, T. (1966). Clonal propagation of Cymbidium through shoot meristem culture. *American Orchid Society Bulletin*, 35, 118-122.
- San-Jose, M. C., Ballester, A., & Vieitez, A. M. (1988). Factor affecting in vitro propagation of *Quercus robur* L. *Tree Physiology*, 4, 281-290.
- Seeni, S. & Latha, P. G. (2000). In vitro multiplication and ecorehabilitation of the endangered Blue Vanda. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61, 1-8.
- Sharma, R. & Bora, S. (2017). Influence of explants type and plant growth regulators on in vitro multiple shoots regeneration of *Vanilla planifolia*. *International Journal of Agricultural Science and Research*, 7(2), 189-195.

- Shyamala, B. N., Naidu, M. M., Sulochanamma, G. & Srinivas, P. (2007). Studies on the antioxidant activities of natural vanilla extract and its constituent compounds through in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7738-7743.
- Steffens, B. & Rasmussen, A. (2016). The physiology of adventitious roots. *Plant Physiology*, 170(2), 603-617.
- Strnad, M., Hanus, J., Vanek, T., Kaminek, M., Ballantine, J. A., Fussel, B. & Hanke, D. E. (1997). Meta-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus x Canadensis* Moench., cv. *Robusta*). *Phytochemistry*, 45, 213-218.
- Swarup, R., Parry, G., Graham, N., Allen, T. & Bennett, M. (2002). Auxin cross-talk: integration of signaling pathways to control plant development. *Plant Molecular Biology*, 49, 411-426.
- Van Staden, J., Zazimalova, E. & George, E. F. (2008). *Plant propagation by tissue culture*. 3rd edition. Dordrecht: Springer.
- Vijaykumar, B., Ashashree, I., Aswini, S. & Patil, M.S. (2016). In vitro studies on the influence of different concentrations of growth regulators on economically important orchid, *Vanilla planifolia*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(9), 311-323.
- Washeem, K., Salimjilani, M., Jaskani, M. & Ullahkhan. (2011). Significance of different plant growth regulators on the regeneration of chrysanthemum plantlets (*Dendranthema morifolium* L.) through shoot tip culture. *Pakistan Journal of Botany*, 43(4), 1843-1848.
- Weiss, E. A. (2002). *Spice Crops*. New York: CABI Publishing.
- Werbrouck, S. P. O., Strnad, M., Van Onckelen, H. A. & Debergh, P. C. (1996). Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture. *Plant Physiology*, 98, 291-297.
- Zuraida A. R, Fatin Liyana Izzati & Ayu Nazreena, O. (2014). In vitro plant propagation for rapid multiplication of *Melicope Lunu-Ankenda*: a plant species of high medicinal value. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1148-1156.
- Zuraida, A. R., Fatin Liyana, K. H, Ayu Nazreena, O., Wan Zaliha, W. S., Che Radziah, C. M. Z., Zamri, Z. & Sreeramanan, S. (2013). A simple and efficient protocol for the mass propagation of *Vanilla planifolia*. *American Journal of Plant Science*, 1685-1692.