

**KESAN KEPELBAGAIAN MEDIA KULTUR,
PENGAWALATUR TUMBUHAN DAN ADITIF
ORGANIK KE ATAS MIKROPROPAGASI
ORKID SELIPAR TERANCAM SABAH
(*Paphiopedilum hookerae* var *volonteanum*
DAN *Paphiopedilum dayanum*)**



ROSLIN OMBOKOU

**TESIS INI DISERAHKAN BAGI MEMENUHI
KEPERLUAN PENGIJAZAHAN IJAZAH
SARJANA SAINS**

**FAKULTI SAINS DAN SUMBER ALAM
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH
2023**

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS

JUDUL : **KESAN KEPELBAGAIAN MEDIA KULTUR, PENGAWALATUR TUMBUHAN DAN ADITIF ORGANIK KE ATAS MIKROPROPAGASI ORKID SELIPAR TERANCAM SABAH (*Paphiopedilum hookerae* var *volonteanum* DAN *Paphiopedilum dayanum*)**

IJAZAH : **SARJANA SAINS**

BIDANG : **BIOTEKNOLOGI**

Saya **ROSLIN OMBOKOU**, Sesi **2015-2023**, mengaku membenarkan tesis Sarjana ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:-

1. Tesis ini 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 1972)

TERHAD

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

TIDAK TERHAD



ROSLIN OMBOKOU
MZ1521004T

Disahkan Oleh,


ANITA BINTI ARSAD
PUSTAKAWAN KANAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

(Tandatangan Pustakawan)

Tarikh : 14 April 2023


(Prof. Madya. Dr. Zaleha Binti M. Aziz)

Penyelia

PENGAKUAN

Saya dengan ini mengaku bahawa bahan dalam disertasi ini adalah kepunyaan saya sendiri melainkan petikan, persamaan, ringkasan dan rujukan yang telah diakui sepenuhnya.

17 November 2022



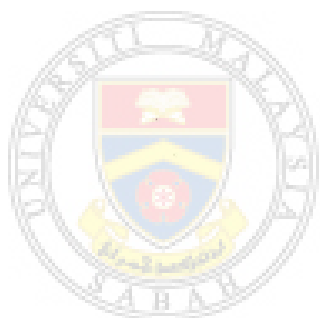
Roslin Ombokou
MZ1521004T



UMMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGESAHAN

NAMA : ROSLIN OMBOKOU
NO. MATRIK : MZ1521004T
TAJUK : KESAN KEPELBAGAIAN MEDIA KULTUR,
PENGAWALATUR TUMBUHAN DAN ADITIF ORGANIK KE
ATAS MIKROPROPAGASI ORKID SELIPAR TERANCAM
SABAH (*Paphiopedilum hookerae* var *volonteanum* DAN
Paphiopedilum dayanum)
IJAZAH : SARJANA SAINS
BIDANG : BIOTEKNOLOGI
TARIKH VIVA : 17 NOVEMBER 2022



DISAHKAN OLEH;

UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

Tandatangan

PENYELIA
Prof. Madya. Dr. Zaleha Binti A. Aziz

PENGHARGAAN

Pertama sekali, ucapan syukur kepada Tuhan atas berkatNya sepanjang penulisan dan penyempurnaan disertasi ini.

Saya ingin merakamkan ucapan terima kasih dan penghargaan yang tidak terhingga kepada Prof. Madya Dr. Zaleha Binti A. Aziz, penyelia saya, atas bimbingan, sumbangan, motivasi dan sokongan yang sangat baik sepanjang pengajian. Saya berasa bertuah kerana mempunyai peluang ini untuk belajar dengan penyelidik yang setia dan berdedikasi seperti beliau.

Saya ingin merakamkan setinggi-tinggi penghargaan kepada ahli keluarga tercinta terutamanya ibu bapa saya. Kasih sayang dan iman mereka yang kuat, saya mampu melangkah sejauh ini.

Penghargaan khas juga ditujukan kepada kakitangan Makmal Kultur Tisu, Makmal Fisiologi Haiwan dan kakitangan Fakulti Sains dan Sumber Alam atas bantuan bersemangat mereka dalam bahan makmal dan kertas kerja. Penghargaan juga ditujukan kepada bahagian Pusat Pengajian Pascasiswazah kerana banyak membantu saya sepanjang pengajian saya.

Akhir sekali, saya ingin mengucapkan terima kasih kepada semua bekas dan rakan makmal yang hadir dari kerana berkongsi idea, persahabatan, pengetahuan mereka dan pengalaman semasa pengajian saya. Terima kasih banyak-banyak saya ucapkan.

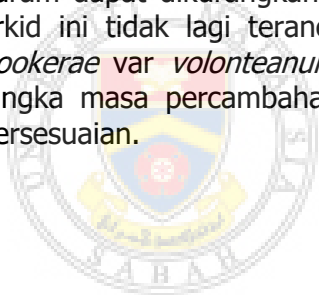
Roslin Ombokou

17 November 2022

ABSTRAK

Paphiopedilum hookerae var *volonteanum* dan *Paphiopedilum dayanum* adalah spesies orkid selipar yang endemik di Sabah yang terkenal dengan keunikan morfologi bunga. Ini telah mengakibatkan orkid ini sering diambil dan diperdagangkan secara haram. Kini, orkid ini telah dilaporkan sebagai spesies yang terancam oleh *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) dan tersenarai dalam Appendix 1: *Convention on International Trade in Endangered Species* (CITES). Ini mendorong kepada kegiatan pemuliharaan bagi mengekalkan populasi orkid selipar. Namun, kadar pertumbuhan orkid selipar adalah sangat rendah dan mengambil masa yang lama. Teknik kultur tisu dapat meningkatkan jumlah individu spesies dalam masa yang singkat. Oleh itu, kajian ini bertujuan untuk membangunkan protokol kultur tisu untuk meningkatkan bilangan individu orkid selipar *P. hookerae* var *volonteanum* dan *P. dayanum* dengan menggunakan biji benih sebagai eksplan. Percambahan biji benih kedua-dua spesies dilakukan ke atas media yang ditambahkan dengan sukrosa (0, 1, 2 dan 3%, w/v), pepton (0, 0.5, 1.0, 1.5 dan 2.0 g/L), dan air kelapa (0, 5, 10, 15 dan 20%, v/v). Seterusnya, jenis dan kepekatan pengawalatur tumbuhan tunggal iaitu 6-benzylaminopurina (BAP; 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/L), asid alpha-naftalenasetik (NAA; 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/L) dan thidiazuron (TDZ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/L) telah diuji sebagai kajian awal. Kemudian, pengawalatur atur tunggal yang terbaik daripada kajian awal iaitu 1.0 mg/L TDZ digabungkan dengan asid 2,4-diklorofenoksiasetik (2,4-D; 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/L). Kajian percambahan diteruskan bagi *P. hookerae* var *volonteanum* untuk meningkatkan percambahan pada media Murashige & Skoog (MS), ½MS, Robert Ernst (RE), dan New Dogashima Medium (NDM). Seterusnya, jus tomato (0, 0.05, 0.2, 0.3 dan 0.5%, v/v) dan homogenat pisang (0, 0.05, 0.2, 0.3 dan 0.5%, w/v) serta faktor kematangan biji benih berumur 240 HSP dan 360 HSP telah diuji terhadap biji benih orkid *P. hookerae* var *volonteanum*. Selepas 80 hari pengkulturan, percambahan tertinggi bagi *P. hookerae* var *volonteanum* ialah pada media ½MS dengan 2% (w/v) sukrosa (57.11±1.1%), 2.0 g/L pepton (69.76±7.7%) dan 10% (v/v) air kelapa (55.76±1.9%). Bagi *P. dayanum* pula, percambahan tertinggi adalah pada 2% (w/v) sukrosa (82.47±8.7%), 2.0 g/L pepton (91.93±7.4%) dan 10% (v/v) air kelapa (90.26±7.7%). Pengawalatur tumbuhan BAP, NAA dan TDZ mencatatkan peratusan percambahan yang rendah berbanding kawalan. Ini menunjukkan kesan perencatan terhadap percambahan biji benih bagi kedua-dua spesies. Kombinasi pengawalatur tumbuhan 1 mg/L TDZ + 1 mg/L 2,4-D memberikan percambahan yang tinggi bagi kedua-dua *P. hookerae* var *volonteanum* (59.00±7.2%) dan *P. dayanum* (71.25±8.2%). Kesan jus tomato 0.5% (v/v) dan homogenat pisang 0.3% (w/v) memberikan percambahan yang rendah terhadap biji benih *P. hookerae* var *volonteanum* masing-masing dengan 19.90±3.6% dan 18.08±7.8%. Biji benih *P. hookerae* var *volonteanum* yang berumur 240 HSP adalah yang terbaik untuk percambahan biji benih secara *in vitro*. Untuk kajian proliferasi protokorm terhadap *P. dayanum*, pengawalatur tumbuhan kinetin (0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/L), BAP (0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/L), TDZ (0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/L), NAA (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L), dan 2,4-D (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L) secara tunggal dan kombinasi auksin-sitokinin telah diuji. Selepas 250 hari pengkulturan, tiada proliferasi protokorm dapat dilihat pada media kawalan, kinetin dan BAP.

Proliferasi protokorm dapat dilihat pada 2.0 mg/L TDZ (10.6 ± 1.5) protokorm baru, 1.5 mg/L 2,4-D (8.3 ± 1.1) protokorm baru dan 1.0 mg/L NAA (6.6 ± 2.5) protokorm baru. Proliferasi protokorm yang tertinggi dicatatkan pada media kombinasi 1.0 mg/L NAA+3.0 mg/L TDZ (3.7 ± 2.6) protokorm baru dan 1.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L TDZ (4.9 ± 0.9) protokorm baru. Untuk perkembangan protokorm *P. dayanum*, baja berasaskan ekstrak rumpai laut dan baja *Orchid Focus* pada kepekatan 0.25% (v/v) telah diuji untuk kajian awal. Kemudian, baja ekstrak rumpai laut diuji pada kepekatan yang berbeza (0, 0.01, 0.25, 0.5, dan 1%, v/v). Kompleks aditif keladi, ubi keledek putih dan ubi keledek ungu mentah dan dimasak pada kepekatan 0.25% (w/v) juga diuji untuk perkembangan protokorm. Selepas 180 hari pengkulturan, perkembangan protokorm yang baik adalah pada media rawatan baja berasaskan ekstrak rumpai laut (0.25%, v/v) dengan panjang daun diukur (0.78 ± 0.3 cm) dan akar (0.84 ± 0.6 cm). Baja berasaskan rumpai laut pada kepekatan 0.01% (v/v) menghasilkan peratus pokok hidup sebanyak 96% serta panjang pucuk 1.1 ± 0.3 cm dan akar 2.3 ± 0.8 cm. Ubi keledek ungu dimasak memberikan daun yang tinggi (2.1 ± 0.7 cm) dan ubi keladi dimasak memberikan akar yang panjang (2.9 ± 0.2 cm). Protokol kultur tisu ini berjaya bagi orkid selipar *P. dayanum*. Namun, percambahan biji benih *P. hookerae* var *volonteanum* adalah perlahan dan tiada protokorm berproliferasi. Protokol yang telah dibangunkan ini boleh diaplikasikan dalam program konservasi seperti mewujudkan hasil-hasil tisu kultur yang telah diaklimatisasi pada pasaran awam agar pengambilan secara haram dapat dikurangkan atau dikembalikan semula ke habitat asal agar spesies orkid ini tidak lagi terancam kepupusan. Walau bagaimanapun bagi spesies *P. hookerae* var *volonteanum*, kajian lanjut masih diperlukan untuk memendekkan jangka masa percambahan biji benih seterusnya membangunkan protokol yang bersesuaian.



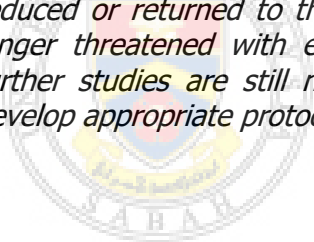
UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

ABSTRACT

EFFECTS OF DIVERSITY OF CULTURE MEDIA, PLANT REGULATORS AND ORGANIC ADDITIVES ON THE MICROPROPAGATION OF SABAH'S THREATENED SLIPPER ORCHID (*Paphiopedilum hookerae* var *volonteanum* AND *Paphiopedilum dayanum*)

Paphiopedilum hookerae var *volonteanum* and *Paphiopedilum dayanum* are endemic slipper orchid species in Sabah that are famous for their unique flower morphology. This has resulted in these orchids being taken and traded illegally. Now, this orchid has been reported as an endangered species by the International Union for Conservation of Nature (IUCN) and listed in Appendix 1: Convention on International Trade in Endangered Species (CITES). This prompts conservation activities to maintain the slipper orchid population. However, the growth rate of slipper orchids is very low and takes a long time. Tissue culture techniques can increase the number of individuals of the species in a short time. Therefore, this study aims to develop a tissue culture protocol to increase the number of individual slipper orchids *P. hookerae* var *volonteanum* and *P. dayanum* by using seeds as explants. Germination of seeds of both species was carried out on media supplemented with sucrose (0, 1, 2 and 3%, w/v), peptone (0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 g/L), and coconut water (0, 5, 10, 15 and 20%, v/v). Next, the type and concentration of single plant regulators, namely 6-benzylaminopurine (BAP; 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/L), alpha-naphthaleneacetic acid (NAA; 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/L) and thidiazuron (TDZ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/L) were tested as a preliminary study. Then, the best single regulator from the initial study was 1.0 mg/L TDZ combined with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D; 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/L). Germination studies continued for *P. hookerae* var *volonteanum* to improve germination on Murashige & Skoog (MS), $\frac{1}{2}$ MS, Robert Ernst (RE), and New Dogashima Medium (NDM) media. Next, tomato juice (0, 0.05, 0.2, 0.3, 0.5% v/v) and banana homogenate (0, 0.05, 0.2, 0.3, 0.5% w/v) as well as the maturity factor of seeds aged 240 DAP and 360 DAP were tested against orchid seeds *P. hookerae* var *volonteanum*. After 80 days of culture, the highest germination of *P. hookerae* var *volonteanum* was on $\frac{1}{2}$ MS media with 2% (w/v) sucrose (57.11±1.1%), 2.0 g/L peptone (69.76±7.7%) and 10% (v/v) coconut water (55.76±1.9%). For *P. dayanum*, the highest germination was at 2% (w/v) sucrose (82.47±8.7%), 2.0 g/L peptone (91.93±7.4%) and 10% v/v coconut water (90.26±7.7%). The plant regulators BAP, NAA and TDZ recorded a low percentage of germination compared to the control. This shows an inhibitory effect on seed germination for both species. The combination of plant regulator 1 mg/L TDZ + 1 mg/L 2,4-D gave high germination for both *P. hookerae* var *volonteanum* (59.00±7.2%) and *P. dayanum* (71.25±8.2%). The effect of tomato juice 0.5% (v/v) and banana homogenate 0.3% (w/v) gave low germination of *P. hookerae* var *volonteanum* seeds with 19.90±3.6% and 18.08±7.8% respectively. The seeds of *P. hookerae* var *volonteanum* aged 240 HSP were the best for in vitro seed germination. For protocorm proliferation of *P. dayanum*, plant regulators kinetin (0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/L), BAP (0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/L), TDZ (0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/L), NAA (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L), and 2,4-D (0, 0.5, 1.0, 1.5,

2.0 mg/L) alone and auxin-cytokinin combinations were tested. After 250 days of culturing, no protocorm proliferation could be seen on control, kinetin and BAP media. Protocorm proliferation can be seen at 2.0 mg/L TDZ (10.6 ± 1.5 new protocorms), 1.5 mg/L 2,4-D (8.3 ± 1.1 new protocorms) and 1.0 mg/L NAA (6.6 ± 2.5 new protocorms). The highest protocorm proliferation was recorded on the combination media of 1.0 mg/L NAA+3.0 mg/L TDZ (3.7 ± 2.6 new protocorms) and 1.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L TDZ (4.9 ± 0.9 new protocorms). For *P. dayanum* protocorm development, fertilizer based on seaweed extract and Orchid Focus fertilizer at a concentration of 0.25% (v/v) were tested for preliminary studies. Then, the seaweed extract fertilizer was tested at different concentrations (0, 0.01, 0.25, 0.5, and 1%, v/v). Additive complex of raw and cooked yam, white sweet potato and purple sweet potato at a concentration of 0.25% (w/v) was also tested for protocorm development. After 180 days of culture, good protocorm development was on the seaweed extract-based fertilizer treatment media (0.25%, v/v) with measured leaf length (0.78 ± 0.3 cm) and root (0.84 ± 0.6 cm). Seaweed-based fertilizer at a concentration of 0.01% (v/v) produced a percentage of live plants of 96% and a shoot length of 1.1 ± 0.3 cm and a root length of 2.3 ± 0.8 cm. Cooked purple sweet potatoes give tall leaves (2.1 ± 0.7 cm) and cooked yams give long roots (2.9 ± 0.2 cm). This tissue culture protocol was successful for the slipper orchid *P. dayanum*. However, seed germination of *P. hookerae* var *volonteanum* was slow and no protocorm proliferated. This protocol that has been developed can be applied in conservation programs such as introduce tissue culture products that have been acclimatized to the public market so that the illegal activity can be reduced or returned to the original habitat so that this orchid species will be no longer threatened with extinction. However, for *P. hookerae* var *volonteanum*, further studies are still needed to shorten the period of seed germination and develop appropriate protocols.



SENARAI KANDUNGAN

	Halaman
TAJUK	i
PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
<i>ABSTRACT</i>	vii
SENARAI KANDUNGAN	ix
SENARAI JADUAL	xv
SENARAI RAJAH/FOTO	xviii
SENARAI SINGKATAN/SIMBOL	xxiv
SENARAI LAMPIRAN	xxv
BAB 1 : PENGENALAN	
1.1 Latar Belakang Kajian	1
1.2 Pernyataan Masalah	2
1.3 Hipotesis Kajian	3
1.4 Objektif Kajian	3
1.5 Sumbangan Kajian	4
BAB 2 : ULASAN LITERATUR	
2.1 Orkid	5
2.1.1 Genus <i>Paphiopedilum</i>	8
2.1.2 <i>Paphiopedilum hookerae</i> var <i>volonteanum</i> dan <i>Paphiopedilum dayanum</i>	9
2.2 Propagasi Orkid	12

2.3	Faktor Mempengaruhi Mikropropagasi Orkid	14
2.3.1	Faktor Abiotik	14
2.3.2	Faktor Eksplan	16
2.3.3	Elemen Media	17
2.4	Kajian Tisu Kultur Orkid <i>Paphiopedilum</i>	32
2.5	Kepentingan Pemuliharaan Orkid	34

**BAB 3 : KAJIAN BOTANIKAL DAN PERCAMBAHAN BIJI
BENIH *P. hookerae* var *volonteanum* DAN *P. dayanum* SECARA *IN VITRO***

3.1	Pengenalan	35
3.2	Bahan dan Kaedah	36
3.2.1	Sumber Eksplan	36
3.2.2	Deskripsi Botanical Tumbuhan	36
3.2.3	Morfologi Benih Orkid	37
3.2.4	Pensterilan Eksplan	37
3.2.5	Pengkulturan	38
3.2.6	Kesan sukrosa terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> dan <i>P. dayanum</i> secara <i>in vitro</i>	38
3.2.7	Kesan aditif organik terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> dan <i>P. dayanum</i> secara <i>in vitro</i>	39
3.2.8	Kesan pengawalatur tumbuhan terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> dan <i>P. dayanum</i> secara <i>in vitro</i>	39
3.2.9	Kesan media asas terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> secara <i>in vitro</i>	40

3.2.10	Kesan jus tomato dan homogenat pisang terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> secara <i>in vitro</i>	40
3.2.11	Kesan kematangan kapsul terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> secara <i>in vitro</i>	41
3.2.12	Pemerhatian dan cerapan data	41
3.2.13	Rekabentuk eksperimen dan analisis statistik	43
3.3	Keputusan	43
3.3.1	Kajian botanikal pokok <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> dan <i>P. dayanum</i>	43
3.3.2	Kesan sukrosa terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> dan <i>P. dayanum</i> secara <i>in vitro</i>	50
3.3.3	Kesan pepton terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> dan <i>P. dayanum</i> secara <i>in vitro</i>	55
3.3.4	Kesan air kelapa terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> dan <i>P. dayanum</i> secara <i>in vitro</i>	58
3.3.5	Kesan pengawalatur tumbuhan terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> dan <i>P. dayanum</i> secara <i>in vitro</i>	62
3.3.6	Kesan media asas terhadap percambahan <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i>	75
3.3.7	Kesan jus tomato dan homogenat pisang terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> secara <i>in vitro</i>	77
3.3.8	Kesan kematangan kapsul terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> secara <i>in vitro</i>	79
3.4	Perbincangan	82
3.4.1	Kajian botanikal pokok <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> dan <i>P. dayanum</i>	82

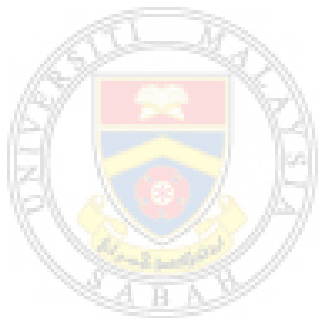
3.4.2	Kesan sukrosa terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> dan <i>P. dayanum</i> secara <i>in vitro</i>	83
3.4.3	Kesan pepton terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> dan <i>P. dayanum</i> secara <i>in vitro</i>	85
3.4.4	Kesan air kelapa terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> dan <i>P. dayanum</i> secara <i>in vitro</i>	86
3.4.5	Kesan pengawalatur tumbuhan terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> dan <i>P. dayanum</i> secara <i>in vitro</i>	87
3.4.6	Kesan media asas terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> secara <i>in vitro</i>	89
3.4.7	Kesan jus tomato dan homogenat pisang terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i>	93
3.4.8	Kesan kematangan kapsul terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i>	95
3.5	Kesimpulan	98
BAB 4 : PROLIFERASI PROTOKORM <i>Paphiopedilum dayanum</i> SECARA IN VITRO		
4.1	Pengenalan	99
4.2	Bahan dan Kaedah	100
4.2.1	Sumber Eksplan	100
4.2.2	Kesan pengawalatur tumbuhan tunggal terhadap proliferasi protokorm <i>P. dayanum</i>	101
4.2.3	Kesan pengawalatur tumbuhan kombinasi terhadap proliferasi protokorm <i>P. dayanum</i>	101
4.2.4	Cerapan dan analisis data	102

4.3	Keputusan	103
4.3.1	Kesan pengawalatur tumbuhan tunggal terhadap proliferasi protokorm <i>P. dayanum</i>	103
4.3.2	Kesan pengawalatur tumbuhan kombinasi terhadap proliferasi protokorm <i>P. dayanum</i>	111
4.4	Perbincangan	116
4.4.1	Kesan pengawalatur tumbuhan tunggal terhadap proliferasi protokorm <i>P. dayanum</i>	116
4.4.2	Kesan pengawalatur tumbuhan kombinasi terhadap proliferasi protokorm <i>P. dayanum</i>	119
4.5	Kesimpulan	122

BAB 5 : PERKEMBANGAN PROTOKOM *Paphiopedilum dayanum* SECARA *IN VITRO*

5.1	Pengenalan	123
5.2	Bahan dan Kaedah	124
5.2.1	Sumber eksplan	124
5.2.2	Kesan baja berasaskan rumpai laut dan baja <i>Orchid Focus</i> terhadap perkembangan protokom <i>P. dayanum</i>	125
5.2.3	Penyediaan ubi keladi dan ubi keledak putih dan ubi keledak ungu terhadap perkembangan protokom <i>P. dayanum</i>	125
5.2.4	Pengukuran daun dan akar	126
5.2.5	Cerapan dan analisis data	127
5.3	Keputusan	127
5.3.1	Kesan baja berasaskan ekstrak rumpai laut dan baja <i>Orchid Focus</i> terhadap perkembangan protokom <i>P. dayanum</i>	127
5.3.2	Kesan kepekatan baja berasaskan ekstrak rumpai laut terhadap perkembangan protokom <i>P. dayanum</i>	130

5.3.3	Kesan ubi keladi dan ubi keledak putih dan ubi keledak ungu terhadap perkembangan protokom <i>P. dayanum</i>	132
5.4	Perbincangan	135
5.5	Kesimpulan	140
BAB 6: KESIMPULAN UMUM DAN CADANGAN		
6.1	Rumusan Kajian	141
6.2	Cadangan	142
6.3	Penutup	143
RUJUKAN		144
LAMPIRAN		187



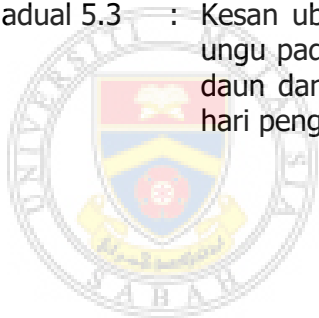
UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

SENARAI JADUAL

	Halaman
Jadual 2.1 : Klasifikasi taksonomi <i>Paphiopedilum hookerae</i> var <i>volonteanum</i> dan <i>Paphiopedilum dayanum</i> .	11
Jadual 2.2 : Kesesuaian sumber karbon terhadap kultur tisu <i>Paphiopedilum</i> .	20
Jadual 2.3 : Pengawalatur tumbuhan (PGR) yang biasa digunakan dalam kultur tisu <i>Paphiopedilum</i> .	24
Jadual 2.4 : Analisis kandungan nutrisi baja pertumbuhan <i>Orchid Focus</i> .	30
Jadual 3.1 : Kategori saiz biji benih orkid.	37
Jadual 3.2 : Ukuran batang, daun, bahagian bunga dan kapsul biji <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> .	44
Jadual 3.3 : Ukuran batang, daun, bahagian bunga dan kapsul biji benih <i>P. dayanum</i> .	46
Jadual 3.4 : Kesan sukrosa pada media ½MS, MS, NDM dan RE terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> mengikut hari percambahan sehingga 80 hari pengkulturan.	52
Jadual 3.5 : Kesan sukrosa pada media ½MS terhadap percambahan biji benih <i>P. dayanum</i> selepas 80 hari pengkulturan.	54
Jadual 3.6 : Kesan pepton terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> mengikut hari percambahan sehingga 80 hari pengkulturan.	56
Jadual 3.7 : Kesan pepton terhadap percambahan biji benih <i>P. dayanum</i> selepas 80 hari pengkulturan.	57
Jadual 3.8 : Kesan air kelapa terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> mengikut hari percambahan sehingga 80 hari pengkulturan.	59
Jadual 3.9 : Kesan air kelapa terhadap percambahan biji benih <i>P. dayanum</i> selepas 80 hari pengkulturan.	61

Jadual 3.10	: Kesan pengawalatur tumbuhan tunggal BAP terhadap percambahan <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> mengikut hari percambahan sehingga 80 hari pengkulturan.	63
Jadual 3.11	: Kesan pengawalatur tumbuhan tunggal NAA terhadap percambahan <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> mengikut hari percambahan sehingga 80 hari pengkulturan.	65
Jadual 3.12	: Kesan pengawalatur tumbuhan tunggal TDZ terhadap percambahan <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> mengikut hari percambahan sehingga 80 hari pengkulturan.	67
Jadual 3.13	: Kesan pengawalatur tumbuhan kombinasi TDZ dan 2,4-D terhadap percambahan <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> mengikut hari percambahan sehingga 80 hari pengkulturan.	69
Jadual 3.14	: Kesan pengawalatur tumbuhan tunggal TDZ terhadap percambahan biji benih <i>P. dayanum</i> selepas 80 hari pengkulturan.	71
Jadual 3.15	: Kesan pengawalatur tumbuhan kombinasi TDZ 1.0 mg/L + 2,4-D (variasi) terhadap percambahan biji benih <i>P. dayanum</i> selepas 80 hari pengkulturan.	73
Jadual 3.16	: Kesan media asas terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> mengikut hari percambahan sehingga 80 hari pengkulturan.	76
Jadual 3.17	: Kesan jus tomato dan homogenat pisang terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> selepas 80 hari pengkulturan.	78
Jadual 3.18	: Kesan kematangan kapsul terhadap percambahan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> selepas 80 hari pengkulturan.	80
Jadual 4.1	: Kesan kinetin dan BAP pada pelbagai kepekatan menggunakan media asas ½ MS terhadap proliferasi protokorm <i>P. dayanum</i> selepas 250 hari pengkulturan.	104
Jadual 4.2	: Kesan TDZ pada pelbagai kepekatan menggunakan media asas ½MS terhadap proliferasi protokorm <i>P. dayanum</i> selepas 250 hari pengkulturan.	106
Jadual 4.3	: Kesan 2,4-D pada pelbagai kepekatan menggunakan media asas ½ MS terhadap proliferasi protokorm <i>P. dayanum</i> selepas 250 hari pengkulturan.	108

Jadual 4.4	: Kesan NAA pada pelbagai kepekatan menggunakan media asas ½ MS terhadap proliferasi protokorm <i>P. dayanum</i> selepas 250 hari pengkulturan.	110
Jadual 4.5	: Kesan rawatan pengawalatur tumbuhan kombinasi NAA dan TDZ terhadap proliferasi protokorm <i>P. dayanum</i> selepas 250 hari pengkulturan.	112
Jadual 4.6	: Kesan rawatan pengawalatur tumbuhan kombinasi 2,4-D dan TDZ terhadap proliferasi eksplan protokorm <i>P. dayanum</i> selepas 250 hari pengkulturan.	114
Jadual 5.1	: Kesan penambahan baja terhadap pemanjangan daun dan akar dan proliferasi anak benih <i>P. dayanum</i> selepas 180 hari pengkulturan.	128
Jadual 5.2	: Kesan kepekatan baja ekstrak rumpai laut terhadap perkembangan <i>P. dayanum</i> selepas 180 hari pengkulturan.	131
Jadual 5.3	: Kesan ubi keladi, ubi keledek putih dan ubi keledek ungu pada kepekatan 2.5 g/L terhadap pembentukan daun dan akar anak benih <i>P. dayanum</i> setelah 180 hari pengkulturan.	134



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

SENARAI RAJAH

	Halaman
Rajah 2.1 : Ilustrasi perbezaan corak pertumbuhan orkid secara monopodial dan simpodial.	7
Rajah 2.2 : Peta Gunung Kinabalu, Sabah sebagai kawasan habitat pertumbuhan orkid <i>Paphiopedilum hookerae</i> var <i>volonteanum</i> dan <i>Paphiopedilum dayanum</i> .	11
Rajah 2.3 : Baja Pertumbuhan <i>Orchid Focus</i> .	30
Rajah 3.1 : Pembahagian pada piring kultur.	42
Rajah 3.2 : Peringkat perkembangan benih orkid. 1) Embrio membengkak untuk mengisi lapisan kulit benih. 2) Embrio muncul dari kulit benih. 3) Peringkat awal protokom. 4) Protokorm berpucuk. 5) Protokorm berpucuk 2 helai daun. 6) Anak benih dengan 2 helai daun dan akar.	42
Rajah 3.3 : Permukaan biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> . A) Seluruh biji benih. Bar: 100 μ m. B) Embrio biji benih. C) Bahagian tengah testa biji benih. D) Bahagian hujung kulit biji benih. Bar : 20 μ m.	49
Rajah 3.4 : Permukaan biji benih <i>P. dayanum</i> . A) Seluruh biji benih. Bar: 100 μ m. B) Embrio biji benih. C) Bahagian tengah kot/testa biji benih. D) Bahagian hujung kulit biji benih. Bar : 20 μ m.	49

SENARAI FOTO

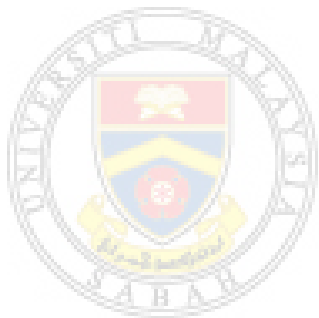
	Halaman
Foto 2.1 : Orkid Selipar. (A) <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> (pokok); (B) <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> (Bunga); (C) <i>Paphiopedilum dayanum</i> (Pokok); (D) <i>P. dayanum</i> (Bunga). Bar: 1.0 cm.	10
Foto 2.2 : Baja berasaskan ekstrak rumpai laut merah.	29
Foto 3.1 : Pokok <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> . A) Pokok berbunga terdiri daripada daun di bahagian bawah, batang dan bunga. B) Daun spesies, anak panah menunjukkan ciri khas identiti spesies iaitu warna ungu pada permukaan bawah daun. C) Bunga <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> , i) Dorsal Sepal. ii) Kelopak bunga yang mempunyai corak berbintik berwarna ungu gelap dan seluruh hujung kelopak berwarna ungu cerah. iii) Staminod dan stigma. iv) Bibir/Mulut. Bar: 0.5 cm.	45
Foto 3.2 : Kapsul biji benih <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> berumur 240 HSP.	45
Foto 3.3 : Pokok orkid <i>P. dayanum</i> . A) Pokok lengkap spesies terdiri daripada daun, batang dan bunga pada bahagian hujung tangkai dan atas pokok. B) Bunga spesies berwarna putih dengan jalur menegak berwarna hijau pada dorsal sepal dan kelopak berwarna ungu. C) Bibir bunga. D) Daun spesies, anak panah menunjukkan ciri khas identiti spesies iaitu belahan kecil pada hujung daun. E) Bahagian pangkal pokok spesies. Bar: 0.5 cm.	47
Foto 3.4 : Kapsul biji benih <i>P. dayanum</i> berusia 240 HSP.	47
Foto 3.5 : Kesan sukrosa terhadap percambahan biji benih selepas 80 hari pengkulturan. A) <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> . B) <i>P. dayanum</i> . Bar: 0.05 mm.	55
Foto 3.6 : Kesan pepton terhadap percambahan biji benih selepas 80 hari. A) <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> . B) <i>P. dayanum</i> . Bar: 0.05 mm.	58
Foto 3.7 : Kesan air kelapa terhadap percambahan <i>P. hookerae</i> var <i>volonteanum</i> selepas 80 hari pengkulturan. Bar: 0.05 mm.	60

- Foto 3.8 : Kesan air kelapa terhadap percambahan *P. dayanum* selepas 80 hari pengkulturan. Bar: 0.05 mm. 61
- Foto 3.9 : Protokorm *P. hookerae* var *volonteanum* daripada kesan rawatan pengawalatur tumbuhan BAP dengan kepekatan yang berbeza selepas 80 hari pengkulturan. A) Media kawalan. B) BAP 0.2 mg/L. C) BAP 0.4 mg/L. D) BAP 0.6 mg/L. (E) BAP 0.8 mg/L. F) BAP 1.0 mg/L. Bar: 0.05 mm. 64
- Foto 3.10 : Protokorm *P. hookerae* var *volonteanum* daripada kesan rawatan pengawalatur tumbuhan NAA dengan kepekatan yang berbeza selepas 80 hari pengkulturan. A) Media kawalan. B) NAA 0.1 mg/L. C) NAA 0.2 mg/L. D) NAA 0.3 mg/L. E) NAA 0.4 mg/L. F) NAA 0.5 mg/L. Bar: 0.05 mm. 66
- Foto 3.11 : Protokorm *P. hookerae* var *volonteanum* daripada kesan rawatan pengawalatur tumbuhan TDZ dengan kepekatan yang berbeza selepas 80 hari pengkulturan. (A) Media kawalan, TDZ 0mg/L. (B) TDZ 0.2mg/L. (C) TDZ 0.4mg/L. (D) TDZ 0.6mg/L. (E) TDZ 0.8mg/L. (F) TDZ 1.0mg/L. Bar: 0.05 mm. 68
- Foto 3.12 : Protokorm *P. hookerae* var *volonteanum* daripada kesan rawatan kombinasi pengawalatur tumbuhan TDZ dan 2,4-D dengan kepekatan yang berbeza selepas 80 hari pengkulturan. (A) Media kawalan. (B) 2,4-D 0.0 mg/L+TDZ 1.0 mg/L. (C) 2,4-D 0.2 mg/L+TDZ 1.0 mg/L. (D) 2,4-D 0.4 mg/L+TDZ 1.0 mg/L. (E) 2,4-D 0.6 mg/L+TDZ 1.0 mg/L. (F) 2,4-D 0.8 mg/L+TDZ 1.0 mg/L. (G) 2,4-D 1.0 mg/L+TDZ 1.0 mg/L. Bar: 0.5 mm. 70
- Foto 3.13 : Protokorm *P. dayanum* daripada kesan rawatan pengawalatur tumbuhan TDZ dengan kepekatan yang berbeza selepas 80 hari pengkulturan. A) Percambahan benih pada Media kawalan tanpa pengawalatur tumbuhan TDZ (0mg/L). B) Percambahan benih pada kepekatan TDZ 0.2mg/L. C) Percambahan benih pada kepekatan TDZ 0.4mg/L. D) Percambahan benih pada kepekatan TDZ 0.6mg/L. E) Percambahan benih pada kepekatan TDZ 0.8mg/L. F) Percambahan benih pada kepekatan TDZ 1.0mg/L. Bar: 0.5 mm. 72

- Foto 3.14 : Protokorm *P. dayanum* daripada kesan rawatan kombinasi pengawalatur tumbuhan TDZ dan 2,4-D dengan kepekatan yang berbeza selepas 80 hari pengkulturan. (A) Media kawalan iaitu tanpa penambahan sebarang pengawalatur tumbuhan . (B) 2,4-D 0.0mg/L+TDZ 1.0mg/L. (C) 2,4-D 0.2mg/L+TDZ 1.0mg/L. (D) 2,4-D 0.4mg/L+TDZ 1.0mg/L. (E) 2,4-D 0.6mg/L+TDZ 1.0mg/L. (F) 2,4-D 0.8mg/L+TDZ 1.0mg/L. (G) 2,4-D 1.0mg/L+TDZ 1.0mg/L. Bar: 0.5 mm. 74
- Foto 3.15 : Percambahan biji benih *P. hookerae var volonteantum* pada media percambahan yang ditambah dengan organik. A) Jus Tomato 0.5%, v/v. B) Homogenat Pisang 0.5%, w/v. Bar: 0.5 mm. 78
- Foto 3.16 : Percambahan biji benih *P. hookerae var volonteantum* berumur 360 HSP di atas media yang berbeza selepas 80 hari pengkulturan. A) ½MS. B) MS. C) NDM. D) RE. Bar: 0.5 mm. 81
- Foto 3.17 : Percambahan biji benih *P. hookerae var volonteantum* berumur 240 HSP di atas media yang berbeza selepas 80 hari pengkulturan. A) ½MS, *C: Ukur lilit, *A: Luas. B) MS. C) NDM. D) RE. Bar: 0.5 mm. 82
- Foto 4.1 : Proliferasi protokorm daripada protokorm *P. dayanum* pada hari ke-150 selepas pengkulturan. Bar: 0.05 mm. 103
- Foto 4.2 : Perkembangan protokorm *P. dayanum* pada media kinetin dan BAP selepas 250 hari pengkulturan. A) media rawatan kawalan B) Kinetin (KN) dan C) 6-Benzylaminopurine (BAP). Bar: 0.5 mm. 105
- Foto 4.3 : Perkembangan protokorm *P. dayanum* pada media TDZ selepas 250 hari pengkulturan. A) Media kawalan. B) Media rawatan TDZ dengan kepekatan 1.0 mg/L. C) Media rawatan TDZ dengan kepekatan 2.0 mg/L. D) Media rawatan TDZ dengan kepekatan 3.0 mg/L. E) Media rawatan TDZ dengan kepekatan 4.0 mg/L. F) Media rawatan TDZ dengan kepekatan 5.0 mg/L. Bar: 0.5 mm. 107
- Foto 4.4 : Perkembangan protokorm *P. dayanum* pada media 2,4-D selepas 250 hari pengkulturan. A) Media kawalan. B) Media rawatan 2,4-D dengan kepekatan 0.5 mg/L. C) Media rawatan 2,4-D dengan kepekatan 1.0 mg/L. D) Media rawatan 2,4-D dengan kepekatan 1.5 mg/L. E) Media rawatan 2,4-D dengan kepekatan 2.0 mg/L. Bar: 0.5 mm. 109

- Foto 4.5 : Perkembangan protokorm *P. dayanum* pada media NAA selepas 250 hari pengkulturan. A) Media kawalan. B) Media rawatan NAA dengan kepekatan 0.5 mg/L. C) Media rawatan NAA dengan kepekatan 1.0 mg/L. D) Media rawatan NAA dengan kepekatan 1.5 mg/L. E) Media rawatan NAA dengan kepekatan 2.0 mg/L, anak panah menunjukkan proliferasi protokorm nekrosis. Bar: 0.5 mm. 111
- Foto 4.6 : Perkembangan protokorm *P. dayanum* pada media NAA+TDZ selepas 250 hari pengkulturan. A) Media kawalan. B) Media rawatan NAA dengan kepekatan 1.0 mg/L. C) Kombinasi NAA 1.0 mg/L+TDZ 1.0 mg/L. D) Kombinasi NAA 1.0 mg/L+TDZ 2.0 mg/L. E) Kombinasi NAA 1.0 mg/L+TDZ 3.0 mg/L. F) Kombinasi NAA 1.0 mg/L+TDZ 4.0 mg/L. G) Kombinasi NAA 1.0 mg/L+TDZ 5.0 mg/L. Bar: 0.5 mm. 113
- Foto 4.7 : Perkembangan protokorm *P. dayanum* pada media 2,4-D +TDZ selepas 250 hari pengkulturan. A) Media kawalan. B) Media rawatan 2,4-D dengan kepekatan 1.5mg/L. C) Kombinasi 2,4-D 1.5 mg/L+TDZ 1.0 mg/L. D) Kombinasi 2,4-D 1.5 mg/L+TDZ 2.0 mg/L. E) Kombinasi 2,4-D 1.5 mg/L+TDZ 3.0 mg/L. F) Kombinasi 2,4-D 1.5 mg/L+TDZ 4.0 mg/L. G) Kombinasi 2,4-D 1.5 mg/L+TDZ 5.0 mg/L. Bar: 0.5 mm. 115
- Foto 5.1 : Pengukuran panjang daun dan akar anak benih *P. dayanum* selepas 180 hari pengkulturan. 126
- Foto 5.2 : Perkembangan anak benih *P. dayanum* pada media ditambahkan baja berasaskan rumpai laut dengan kepekatan 0.25% (v/v) selepas 180 hari pengkulturan. A) Proliferasi pucuk anak benih. B) Pembentukan akar anak benih. Bar: 0.5 mm. 129
- Foto 5.3 : Perkembangan anak benih *P. dayanum* pada media ditambahkan baja komersial orkid (Orchid Focus) dengan kepekatan 0.25% (v/v) selepas 180 hari pengkulturan. A) Proliferasi pucuk anak benih. B) Pembentukan akar anak benih. Bar: 0.5 mm. 129
- Foto 5.4 : Pertumbuhan anak benih *P. dayanum* pada media ditambahkan baja berasaskan ekstrak rumpai laut selepas 180 hari pengkulturan. A) Media kawalan. B) 0.01% (v/v). C) 0.25% (v/v). D) 0.5% (v/v). E) 1% (v/v). Bar: 0.1 mm. 131

Foto 5.5 : Kesan organik aditif pada kepekatan 0.25% (w/v) terhadap perkembangan anak benih *P. dayanum* selepas 180 hari. A) Media kawalan. B) Ubi keladi mentah. C) Ubi keledek putih mentah. D) Ubi keledek ungu mentah. E) Ubi keladi dimasak. F) Ubi keledek putih dimasak. G) Ubi keledek ungu yang dimasak. Bar: 0.1 cm. 135



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH