

MIKROPROPAGASI ORKID *PAPHIOPEDILUM*
ROTHSCHILDIANUM MELALUI KULTUR
KALUS DAN CECAIR



MAKDI MASNODDIN

UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH
2012

MIKROPROPAGASI ORKID *PAPHIOPEDILUM*
ROTHSCHILDIANUM MELALUI KULTUR
KALUS DAN CECAIR

MAKDI MASNODDIN



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

TESIS INI DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI
SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH SARJANA SAINS

SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH
2012

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

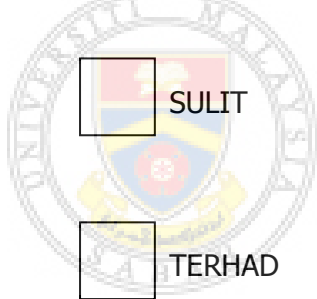
BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS

JUDUL : MIKROPROPAGASI ORKID *PAPHIOPEDILUM ROTHSCILDIANUM*
MELALUI KULTUR KALUS DAN CECAIR

IJAZAH : SARJANA SAINS

Saya MAKDI MASNODDIN, Sesi Pengajian 2008-2012, mengaku membenarkan tesis Sarjana 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

Disahkan Oleh,

(Tandatangan penulis)

(Tandatangan pustakawan)

Alamat Tetap:
Sekolah Sains dan Teknologi,
UMS, Jalan UMS, 88400
Kota Kinabalu, Sabah

Prof. Madya Dr. Zaleha Abd. Aziz
(Penyelia Utama)

Tarikh: 11 Jun 2012

PENGESAHAN

NAMA : **MAKDI MASNODDIN**

NO. MATRIK : **PS2008-8420**

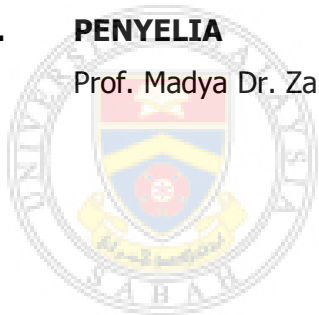
TAJUK : **MIKROPROPAGASI ORKID *PAPHIOPEDILUM*
ROTHSCHILDIANUM MELALUI KULTUR
KALUS DAN CECAIR**

IJAZAH : **IJAZAH SARJANA SAINS (BIOTEKNOLOGI)**

TARIKH VIVA :

DISAHKAN OLEH

1. PENYELIA



Prof. Madya Dr. Zaleha Abdul Aziz

Tandatangan

UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan, ringkasan dan rujukan yang tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

11 Jun 2012

MAKDI MASNODDIN

PS2008-8420



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

ABSTRAK

MIKROPROPAGASI ORKID *PAPHIOPEDILUM ROTHSCILDIANUM* MELALUI KULTUR KALUS DAN CECAIR

Paphiopedilum rothschildianum merupakan spesies orkid selipar yang sangat jarang ditemui di habitat liar dan disenaraikan dalam appendix I *Convention on International Trade in Endangered Species* (CITES). Salah satu faktor yang menyumbang kepada penurunan jumlah populasi spesies ini ialah kadar pertumbuhannya yang perlahan. Dalam kajian ini, kaedah propagasi secara *in vitro* (mikropropagasi) digunakan untuk mempropagasi orkid tersebut kerana ia berpotensi menghasilkan tumbuhan baru dalam jumlah yang banyak dalam masa yang singkat. Objektif kajian ini adalah untuk membangunkan satu protokol untuk mikropropagasi *P. rothschildianum* menggunakan kalus sebagai eksplan dalam sistem kultur separa pepejal dan kultur cecair. Kajian ini terdiri daripada dua peringkat; peringkat pertama ialah untuk mengoptimumkan pengaruh dan penyelenggaraan kalus serta regenerasi JSP/pucuk daripada kalus pada media separa pepejal, peringkat kedua ialah pengaplikasian keadaan yang telah dioptimumkan (peringkat 1) dalam sistem kultur cecair [rendaman berterusan (kelalang) dan separa (RITA®)] untuk proliferasi kalus dan regenerasi JSP/pucuk. Dalam kajian pengaruh kalus, media asas ($\frac{1}{2}$ MS, $\frac{1}{4}$ MS dan RE); eksplan [(biji benih (BB), protokom teraruh dari biji benih (PTB), protokom sekunder (PS) dan segmen daun (SD)]; umur PTB (1, 2 dan 3 bulan); kepekatan TDZ (0-1 mg/l) dan 2,4-D (0-5 mg/l); kepekatan zeatin (0-5 mg/l); aditif (pepton, ekstrak yis, dan air kelapa); dan kepekatan sukrosa (20-50 g/l) yang berlainan dikaji. Penyelenggaraan kalus dilakukan dengan menguji kepekatan aditif (arang teraktif, pepton, ekstrak yis, dan air kelapa) dan sukrosa (20-50 g/l) yang berlainan. Pengaruh JSP/pucuk daripada kalus dilakukan dengan menilai kepekatan (0-5 mg/l) dan jenis (2,4-D, NAA, BAP, TDZ, Kinetin) pengawalatur tumbuhan yang berlainan. Kajian regenerasi JSP/pucuk diteruskan dengan menilai kesan sumber kalus (kalus yang diaruhkan daripada media dengan 0, 3 atau 5 mg/l 2,4-D), jenis (sukrosa, fruktosa dan glukosa) dan kepekatan (0, 2.7, 5 and 20 g/l) sumber karbon yang berlainan. Kalus (0.1 g) yang diaruhkan pada media separa pepejal dipindahkan pada media cecair (5 ml) dalam kelalang kon (50 ml) digoncangkan pada 100 rpm untuk memulakan kultur sel ampai yang bertujuan untuk memproliferasi kalus. Penilaian sistem RITA® (5 min setiap 125 min masa rendaman) dilakukan dengan mengkulturkan kalus (0.5 g) dalam media cecair (150 ml). Kajian regenerasi JSP/pucuk dalam sistem RITA® diteruskan dengan menilai kesan jenis (sukrosa dan glukosa) dan kepekatan (2.7, 5 and 20 g/l) sumber karbon yang berlainan. Hasil kajian menunjukkan pengaruh kalus adalah lebih baik pada media asas $\frac{1}{2}$ MS (80.0%±20.9) berbanding $\frac{1}{4}$ MS (65.0%±10.0) and RE (35.0%±28.5). Pengaruh kalus juga lebih baik pada media $\frac{1}{2}$ MS berbanding media RE walaupun dengan kepekatan TDZ dan 2,4-D yang berlainan. Eksplan BB, PTB dan PS menghasilkan kalus seawal 30 hari pada kesemua rawatan di mana pengaruh dan proliferasi kalus paling baik pada media dengan 1 mg/l TDZ dan 5 mg/l 2,4-D dengan peratusan eksplan menghasilkan kalus masing-masing adalah 77.0%±4.5, 95.0%±10.5, dan 75.0%±20.4 selepas 90 hari pengkulturan. PTB merupakan eksplan terbaik manakala PTB pada umur 3 bulan adalah paling sesuai untuk pengaruh kalus. Penambahan ekstrak yis dan zeatin meningkatkan kadar

pengaruhannya kalus ($85.0\% \pm 19.1$, $90.0\% \pm 11.5$) dan mengurangkan kadar kematian eksplan ($30.0\% \pm 11.5$, $25.0\% \pm 10.0$), manakala air kelapa dan kepekatan sukrosa melebihi 20 g/l mempunyai kesan yang sebaliknya dalam pengaruhnya dan proliferasi kalus. Penambahan 1-2 g/l arang teraktif telah meningkatkan kadar proliferasi kalus ($96.7\% \pm 10.5$) dan mengurangkan kadar keperangan kalus ($45.2\% \pm 25.3$) berbanding aditif lain. Kalus diselenggarakan pada media dengan 1 g/l arang teraktif selama lebih setahun. Regenerasi JSP daripada kalus diperolehi pada media dengan 0.5 TDZ dan 3 mg/l BAP, tetapi dengan kadar yang sangat rendah ($15.0\% \pm 13.7$ kalus menghasilkan purata 3 JSP). Kadar regenerasi JSP/pucuk meningkat ($37.5\% \pm 13.7$ kalus menghasilkan purata 5.9 JSP/pucuk) apabila kepekatan sukrosa dikurangkan (5 g/l) dan dengan penggunaan kalus yang teraruh daripada media dengan 1 mg/l TDZ. Pengubahsuaian jenis dan kepekatan sumber karbon kepada 2.7 g/l glukosa meningkatkan lagi kadar regenerasi ($67.5\% \pm 12.1$ kalus menghasilkan purata 4.1 JSP/pucuk). Peningkatan berat bersih kalus sebanyak $0.06\text{g} \pm 0.03$ direkodkan pada kultur kelalang, tetapi kadar keperangan dan *hyperhydricity* adalah tinggi. Proliferasi kalus menggunakan sistem RITA® menunjukkan 3 kali ganda peningkatan berat bersih kalus selepas 30 hari pengkulturan. Kalus yang teraruh daripada media dengan 1 mg/l TDZ menghasilkan 135 JSP/pucuk per gram kalus dalam sistem RITA® selepas 30 hari pengkulturan. Regenerasi JSP/pucuk meningkat (190 JSP/pucuk per gram kalus) dengan peningkatan kepekatan sukrosa dalam media daripada 5 g/l kepada 20 g/l.



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

ABSTRACT

Paphiopedilum rothschildianum is the rarest slipper orchid in the wild and it has been listed in Appendix I of the Convention on International Trade in Endangered Species (CITES). One of the factors contributing to the reduction of the species population is its slow multiplication rate. In this present work, *in vitro* propagation approach (micropropagation) was explored to multiply the orchid because of its potential to multiply the species in large amount and in a shorter period. The objective of this research was to develop a reliable micropropagation protocol for *P. rothschildianum* using callus as explant in semisolid and liquid culture systems. This work comprised of two stages; the first stage was optimising the induction and maintenance of callus as well as PLB/shoot regeneration from callus on semisolid media, the second stage was application of the optimised conditions (stage 1) in liquid culture systems [continuous (flask) and temporary immersion system (RITA®)] for callus proliferation and PLBs/shoot regeneration. To induce callus, different types of basal media ($\frac{1}{2}$ MS, $\frac{1}{4}$ MS and RE); explant [seed (SE), seed derived protocorm (SDP), secondary protocorm (SP) and leaf segment (LS)]; age of SDP (1, 2 and 3 month); concentrations of TDZ (0-1 mg/l) and 2,4-D (0-5 mg/l); concentrations of zeatin (0-5 mg/l); natural additives (peptone, yeast extract, and coconut water); and concentrations of sucrose (20-50 g/l) were evaluated. To maintain callus, different concentrations of natural additives (activated charcoal, peptone, yeast extract, and coconut water) and sucrose (20-50 g/l) were tested. To induce regeneration of PLB/shoots from callus, different concentrations (0-5 mg/l) and types (2,4-D, NAA, BAP, TDZ, Kinetin) of PGRs were evaluated. PLB/shoot regeneration was further optimised by evaluating the effect of different callus sources (callus induced from media with 0, 3 or 5 mg/l 2,4-D), types (sucrose, fructose and glucose) and concentrations (0, 2.7, 5 and 20 g/l) of carbon sources. Callus (0.1 g) formed on semisolid media were transferred into liquid media (5 ml) in a conical flask (50 ml capacity) and shaken at 100 rpm to initiate cell suspension culture for proliferation of callus. To evaluate RITA® system (immersion time 5 min in every 125 min), callus (0.5g) were inoculated in liquid medium (150 ml). PLB/Shoot multiplication in RITA® system was further optimized by evaluating the effect of different types (sucrose and glucose) and concentrations (2.7, 5 and 20 g/l) of carbon sources. Results showed that callus induction was better on $\frac{1}{2}$ MS basal media (80.0%±20.9) compared to $\frac{1}{4}$ MS (65.0%±10.0) and RE (35.0%±28.5). Callus induction on $\frac{1}{2}$ MS medium was also better than RE medium regardless of TDZ and 2,4-D concentrations. SE, SDP and SP explant produced calli as early as 30 days on every treatment in which medium with 1 mg/l TDZ and 5 mg/l 2,4-D was the best medium with percentages of explant forming callus were 77.0%±4.5, 95.0%±10.5, and 75.0%±20.4 respectively after 90 days of culture. SDP was the best explant and 3 month old SDP was the most suitable for callus induction. Addition of yeast extract and zeatin slightly increased the rate of callus induction (85.0%±19.1, 90.0%±11.5) and reduced the percentage of dead explant (30.0%±11.5, 25.0%±10.0), while coconut water and sucrose at concentrations higher than 20 g/l gave the opposite effect in both callus induction and maintenance stage. Addition of 1-2 g/l charcoal was able to increase proliferation (96.7%±10.5) and reduce browning (45.2%±25.3) rate compared to other additives. Calli were maintained on medium with 1 mg/l TDZ and 5 mg/l 2,4-D containing 1 g/l activated charcoal for more than 1 year. Result showed that calli

regenerated on medium supplemented with 0.5 mg/l TDZ and 3 BAP, but with very low percentage (15.0%±13.7 callus produced average of 3 PLBs). Regeneration capacity increased (37.5%±13.7 callus produced average of 5.9 PLBs/shoots) when lower sucrose concentration (5 g/l) and callus induced from medium with only 1 mg/l TDZ were used as explant. Regeneration capacity of calli was further increased when the type and concentration of carbohydrate was changed to 2.7 g/l glucose (67.5%±12.1 callus produced average of 4.1 PLBs/shoots). After 30 days of culture, fresh weight of calli increased from 0.1 to 0.16 g in shake flask culture but high browning and hyperhydricity was observed on calli. Callus proliferation using RITA® system showed 3-fold increased in fresh weight and 135 PLBs/shoots per gram calli were regenerated from calli induced on ½ MS medium with 1 mg/l TDZ. Regeneration capacity increased to 190 PLBs/shoots per gram calli when sucrose concentration in the medium was elevated from 5 g/l to 20 g/l.



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

SENARAI KANDUNGAN

	Halaman
TAJUK	i
PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
<i>ABSTRACT</i>	vii
SENARAI KANDUNGAN	ix
SENARAI JADUAL	xiii
SENARAI FOTO	xvii
SENARAI RAJAH	xviii
SENARAI SINGKATAN DAN SIMBOL	xxii
BAB 1: PENGENALAN	1
BAB 2: ULASAN PERPUSTAKAAN	4
2.1 Orkid	4
2.2 Genus <i>Paphiopedilum</i>	6
2.3 <i>Paphiopedilum rothschildianum</i>	8
2.4 Propagasi Orkid	12
2.4.1 Propagasi Orkid Secara <i>In Vitro</i>	12
2.4.2 Propagasi Klonal Menggunakan Eksplan yang Berlainan	14
2.4.3 Propagasi Orkid Melalui Kultur Kalus	16
2.4.4 Propagasi Orkid Menggunakan Kultur Cecair	18
2.4.5 Propagasi Orkid pada Skala Besar	21
2.5 Masalah Dalam Propagasi Orkid	25
2.5.1 Sumber Eksplan yang Terhad	25
2.5.2 Kedormanan Biji Benih Orkid	26
2.5.3 Pertumbuhan yang Perlahan	27

2.5.4	Kecenderungan Ekplan Menjadi Keperangan	28
2.6	Faktor-faktor Kejayaan Kultur Kalus	29
2.6.1	Kesan Media Asas	29
2.6.2	Kesan Pengawalatur Tumbuhan	31
2.6.3	Kesan Kepekatan dan Jenis Sumber Karbon	34
2.6.4	Kesan Penambahan Kompleks Aditif	35
BAB 3: PENGARUHAN DAN PENYELENGGARAAN KALUS		39
3.1	Pengenalan	39
3.2	Bahan dan Kaedah	39
3.2.1	Pengaruh Kalus	39
3.2.2	Penyelenggaraan Kalus	44
3.2.3	Pengkulturan	45
3.2.4	Cerapan dan Analisis Statistik	45
3.3	Keputusan	46
3.3.1	Pengaruh Kalus	46
3.3.2	Penyelenggaraan Kalus	74
3.4	Perbincangan	80
3.4.1	Pengaruh Kalus	80
3.4.2	Penyelenggaraan Kalus	92
3.5	Kesimpulan	96
BAB 4: REGENERASI JASAD SEPERTI PROTOKOM/PUCUK DALAM MEDIA SEPARA PEPEJAL		98
4.1	Pengenalan	98
4.2	Bahan dan Kaedah	99
4.2.1	Sumber Kalus	99
4.2.2	Media Asas	99
4.2.3	Kesan Pengawalatur Tumbuhan	100
4.2.4	Kesan Sumber Kalus	101
4.2.5	Kesan Sumber Karbon	101
4.2.6	Perkembangan JSP/Pucuk	101

4.2.7	Pengkulturan Kalus	101
4.2.8	Pemerhatian dan Analisis Statistik	101
4.3	Keputusan	102
4.3.1	Kesan Pengawalatur Tumbuhan	102
4.3.2	Kesan Sumber Kalus	110
4.3.3	Kesan Sumber Karbon	114
4.3.4	Perkembangan JSP/Pucuk	119
4.4	Perbincangan	120
4.4.1	Kesan Pengawalatur Tumbuhan	120
4.4.2	Kesan Sumber Kalus	124
4.4.3	Kesan Sumber Karbon	126
4.4.4	Perkembangan JSP/Pucuk	127
4.5	Kesimpulan	128
BAB 5: PROLIFERASI KALUS DAN REGENERASI JASAD SEPERTI PROTOKOM/PUCUK DALAM MEDIA CECAIR		130
5.1	Pengenalan	130
5.2	Bahan dan Kaedah	132
5.2.1	Sumber Kalus	132
5.2.2	Media	132
5.2.3	Proliferasi Kalus	132
5.2.4	Regenerasi JSP/Pucuk Menggunakan Sistem RITA®	134
5.2.5	Cerapan dan Analisis Statistik	135
5.3	Keputusan	136
5.3.1	Proliferasi Kalus	136
5.3.2	Regenerasi JSP/Pucuk Menggunakan Sistem RITA®	139
5.4	Perbincangan	144
5.4.1	Proliferasi Kalus	144
5.4.2	Regenerasi JSP/Pucuk Menggunakan Sistem RITA®	146
5.5	Kesimpulan	150
BAB 6: PERBINCANGAN DAN KESIMPULAN UMUM		152

RUJUKAN	163
LAMPIRAN	178



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGHARGAAN

Terlebih dahulu saya ingin memanjatkan kesyukuran kepada Allah S.W.T. kerana saya dapat menyiapkan kajian ini dengan sempurna.

Ucapan terima kasih yang tidak terhingga saya ucapkan kepada penyelia saya, Dr. Zaleha Abd Aziz yang banyak membantu dan memberi tunjuk ajar dalam menjalankan kajian serta penulisan tesis ini. Saya juga ingin mengucapkan terima kasih kepada ayah, Masnoddin bin Etir dan keluarga yang banyak memberi sokongan dari segi kewangan dan moral. Penghargaan yang teristimewa saya kepada Allahyarhamah ibu tersayang, Jamariah binti Karaman yang selama ini telah banyak berkorban dan memberi dorongan sepanjang pengajian saya di UMS.

Ribuan terima kasih juga diucapkan kepada pembantu makmal iaitu Puan Radizah Darun, Cik Juliah Intuh, dan Puan Merylyn Tadi, tidak lupa juga kepada Cyril Misong, Bong Chung Schyan, Lai Tianxia, Chia Yean dan pelajar senior lain yang banyak membantu dan memberi bimbingan sepanjang saya melakukan kajian ini di Makmal Fisiologi Haiwan dan Makmal Tisu Kultur.

Kepada rakan-rakan seperjuangan, Ainil Farhan Udayyapan, Azlina Matawali, Adznila Ebrahim, Norhanis Abd Halim, Nurul Ain Ismail, dan Jury Tise Taunsun yang banyak membantu dari segi pengetahuan dan moral. Tidak lupa juga kepada semua yang membantu secara langsung atau tidak langsung sepanjang perjalanan kajian ini, terima kasih saya ucapkan.

Akhir sekali, saya ingin mengucapkan terima kasih kepada Universiti Malaysia Sabah untuk pembiayaan penyelidikan ini di bawah Geran Penyelidikan Pascasiswazah (GPS0009-SG-1/2009) dan biasiswa Skim Biasiswa Penyelidikan Pascasiswazah (SBPP).

Terima kasih sekali lagi.

SENARAI JADUAL

		Halaman
Jadual 3.1	Kombinasi pengawalatur tumbuhan yang digunakan untuk pengaruhan kalus pada media asas ½ MS dan RE	40
Jadual 3.2	Pengawalatur tumbuhan TDZ dan 2,4-D untuk kajian pengaruhan kalus daripada eksplan biji benih (BB), protokom teraruh daripada biji benih (PTB), protokom sekunder (PS) dan segmen daun (SD)	41
Jadual 3.3	Kombinasi pengawalatur tumbuhan TDZ dan 2,4-D yang digunakan untuk pengaruhan kalus pada protokom teraruh daripada biji benih (PTB) dengan umur yang berlainan	43
Jadual 3.4	Kepekatan pengawalatur tumbuhan zeatin dalam media ½ MS dengan 1 mg/l TDZ dan 5 mg/l 2,4-D	43
Jadual 3.5	Kepekatan kompleks aditif dalam media pengaruhan kalus daripada eksplan PTB berumur 90 hari	44
Jadual 3.6	Kepekatan aditif dan sukrosa dalam media ½ MS dengan kombinasi 1 mg/l TDZ dan 5 mg/l 2,4-D untuk kajian penyelenggaraan kalus	45
Jadual 3.7	Indeks kualiti dan saiz kalus untuk tujuan pemerhatian	46
Jadual 3.8	Pengaruhan kalus ke atas eksplan protokom teraruh daripada biji benih (PTB) pada media asas yang berlainan yang mengandungi 5 mg/l 2,4-D dan 1 mg/l TDZ	48
Jadual 3.9	Kesan penggunaan media asas ½ MS dan RE dengan kepekatan of 2,4-D and TDZ yang berlainan ke atas pengaruhan kalus pada eksplan PTB <i>P.rothschildianum</i>	50

Jadual 3.10	Pengaruh kalus ke atas eksplan PTB, PS, BB dan SD <i>P. rothschildianum</i> pada media ½ MS dengan kepekatan 2,4-D dan TDZ yang berlainan pada 30 hari selepas pengkulturan	54
Jadual 3.11	Pengaruh kalus ke atas eksplan PTB, PS, BB dan SD <i>P. rothschildianum</i> pada media ½ MS dengan kepekatan 2,4-D dan TDZ yang berlainan pada 60 hari selepas pengkulturan	56
Jadual 3.12	Pengaruh kalus ke atas eksplan PTB, PS, BB dan SD <i>P. rothschildianum</i> pada media ½ MS dengan kepekatan 2,4-D dan TDZ yang berlainan pada 90 hari selepas pengkulturan	58
Jadual 3.13	Pengaruh kalus ke atas eksplan PTB <i>P. rothschildianum</i> pada umur yang berbeza pada media ½ MS dengan 1 mg/l TDZ dan kepekatan 2,4-D yang berlainan	61
Jadual 3.14	Pengaruh kalus terhadap eksplan PTB <i>P. Rothschildianum</i> pada media ½ MS dengan 1 mg/l TDZ, 5 mg/l 2,4-D dan kepekatan zeatin yang berlainan	64
Jadual 3.15	Kesan penambahan kompleks aditif dalam media ½ MS dengan 1 mg/l TDZ dan 5 mg/l 2,4-D ke atas pengaruh kalus pada eksplan PTB <i>P. rothschildianum</i>	67
Jadual 3.16	Kesan peningkatan kepekatan sukrosa dalam media ½ MS dengan 1 mg/l TDZ dan 5 mg/l 2,4-D ke atas pengaruh kalus pada eksplan PTB <i>P. rothschildianum</i>	72
Jadual 3.17	Kesan penambahan aditif dalam media ½ MS dengan 1 mg/l TDZ dan 5 mg/l 2,4-D ke atas penyelenggaraan kalus <i>P. Rothschildianum</i>	76

Jadual 4.1	Kepekatan pengawalatur tumbuhan secara tunggal dalam regenerasi JSP/pucuk daripada kalus <i>P. Rothschildianum</i>	100
Jadual 4.2	Indeks kualiti kalus untuk tujuan pemerhatian	102
Jadual 4.3	Kesan pengawalatur tumbuhan secara tunggal dalam media ½ MS ke atas regenerasi JSP/pucuk daripada kalus <i>P. rothschildianum</i> selepas 150 hari pengkulturan	104
Jadual 4.4	Kesan kombinasi pengawalatur tumbuhan ke atas regenerasi JSP/pucuk daripada kalus <i>P. rothschildianum</i> selepas 150 hari pengkulturan	108
Jadual 4.5	Kesan sumber kalus yang berbeza ke atas regenerasi JSP/pucuk daripada kalus <i>P. rothschildianum</i> selepas 60 hari pengkulturan	112
Jadual 4.6	Kesan sumber karbon yang berbeza ke atas regenerasi JSP/pucuk daripada kalus <i>P. rothschildianum</i> selepas 60 hari pengkulturan	116
Jadual 4.7	Perkembangan JSP dan pucuk pada media RE dengan 100 g/l aditif keladi, 9 mg/l BAP dan 0.3 mg/l 2,4-D selepas 80 hari pengkulturan	119
Jadual 5.1	Rawatan untuk kajian proliferasi kalus <i>P. rothschildianum</i> dalam media cecair	133
Jadual 5.2	Sumber kalus untuk regenerasi JSP/pucuk daripada kalus <i>P. rothschildianum</i> dalam media cecair ½ MS dengan 0.5 mg/l TDZ dan 3 mg/l BAP	134
Jadual 5.3	Rawatan sumber karbon yang berlainan untuk kajian regenerasi JSP/pucuk daripada kalus <i>P. rothschildianum</i> dalam media cecair ½ MS dengan 0.5 mg/l TDZ dan 3 mg/l BAP	135
Jadual 5.4	Perbandingan kadar regenerasi JSP/pucuk dalam kultur cecair dan kultur separa pepejal	135
Jadual 5.5	Indeks saiz dan kualiti kalus untuk tujuan pemerhatian	136

Jadual 5.6	Proliferasi kalus <i>P. rothschildianum</i> dalam kultur cecair selepas 30 hari pengkulturan	137
Jadual 5.7	Proliferasi kalus <i>P. rothschildianum</i> dalam RITA berisipadu 1 liter yang mengandungi 150 ml media cecair selepas 30 hari pengkulturan	138
Jadual 5.8	Pengaruh JSP/pucuk daripada sumber kalus <i>P. rothschildianum</i> yang berasal daripada media dengan kepekatan 2,4-D berlainan dalam RITA® berisipadu 1 liter yang mengandungi 150 ml media cecair ½ MS dengan 5 g/l sukrosa, 0.5 mg/l TDZ dan 3 mg/l BAP selepas 30 hari pengkulturan	140
Jadual 5.9	Regenerasi JSP/pucuk daripada kalus <i>P. rothschildianum</i> dalam RITA® berisipadu 1 liter yang mengandungi 150 ml media ½ MS cecair dengan rawatan sumber karbon berlainan selepas 30 hari pengkulturan	142
Jadual 5.10	Perbandingan kadar regenerasi JSP/pucuk <i>P. rothschildianum</i> dalam media cecair (RITA®) dan media separa pepejal ½ MS dengan 0.5 mg/l TDZ dan 3 mg/l BAP	143

SENARAI FOTO

		Halaman
Foto 2.1	Bunga <i>Paphiopedillum rothschildianum</i>	10
Foto 2.2	Pokok <i>Paphiopedillum rothschildianum</i> yang mempunyai empat Bunga	11



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

SENARAI RAJAH

		Halaman
Rajah 2.1	Peringkat percambahan embrio dan perkembangan biji benih Orkid	6
Rajah 2.2	Stuktur Bunga <i>Paphiopedillum rothschildianum</i>	10
Rajah 2.3	Gambarajah mekanisma pemindahan media dalam sistem RITA®	24
Rajah 3.1	Jenis eksplan yang digunakan dalam kajian pengaruh kalus <i>Paphiopedillum rothschildianum</i>	42
Rajah 3.2	Kalus yang teraruh daripada eksplan protokom teraruh daripada biji benih (PTB) pada media asas ½ MS, ¼ MS dan RE yang mengandungi 5 mg/l 2,4-D dan 1 mg/l TDZ	47
Rajah 3.3	Kalus yang teraruh daripada eksplan PTB <i>P. rothschildianum</i> pada media asas ½ MS dengan pengawalatur tumbuhan 2,4-D dan TDZ yang berlainan	51
Rajah 3.4	Kalus yang teraruh daripada eksplan PTB <i>P. rothschildianum</i> dalam media asas RE dengan pengawalatur tumbuhan 2,4-D dan TDZ yang berlainan	52
Rajah 3.5	Perubahan eksplan PTB, PS, BB, dan SD pada media ½ MS dengan kepekatan 5 2,4-D dan 1 TDZ pada hari ke 30, 60 dan 90 selepas pengkulturan	55
Rajah 3.6	Pengaruh kalus ke atas eksplan BB, PTB, PS dan segmen daun <i>P. rothschildianum</i> pada media ½ MS dengan kepekatan 2,4-D dan TDZ yang berlainan selepas 90 hari pengkulturan	59
Rajah 3.7	Pengaruh kalus ke atas eksplan PTB dengan umur yang berlainan pada media ½ MS dengan kepekatan 4 mg/l 2,4-D dan 1 mg/l TDZ	62

Rajah 3.8	Kesan penambahan pengawalatur tumbuhan zeatin ke atas pengaruh kalus pada eksplan PTB <i>P. rothschildianum</i>	65
Rajah 3.9	Pengaruh kalus pada eksplan PTB <i>P. rothschildianum</i> di atas media ½ MS dalam media ½ MS dengan 1 mg/l TDZ dan 5 mg/l 2,4-D yang mengandungi aditif pepton dan ekstrak yis	69
Rajah 3.10	Kalus yang teraruh daripada eksplan PTB <i>P. rothschildianum</i> pada media ½ MS dengan 1 mg/l TDZ, 5 mg/l 2,4-D dan 1 g/l pepton yang mengandungi penambahan air kelapa	70
Rajah 3.11	Pengaruh kalus pada media dengan kepekatan sukrosa yang berlainan sepanjang 90 hari pengkulturan	73
Rajah 3.12	Kalus <i>P. rothschildianum</i> pada media ½ MS dengan 1 mg/l TDZ dan 5 mg/l 2,4-D yang mengandungi penambahan aditif arang teraktif dan air kelapa	78
Rajah 3.13	Kalus <i>P. rothschildianum</i> pada media ½ MS dengan 1 mg/l TDZ dan 5 mg/l 2,4-D yang mengandungi penambahan aditif ekstrak yis dan pepton	79
Rajah 3.14	Kalus <i>P. rothschildianum</i> pada media ½ MS dengan 1 mg/l TDZ dan 5 mg/l 2,4-D yang mengandungi kepekatan sukrosa yang berlainan	80
Rajah 4.1	JSP yang terbentuk pada kalus selepas 140 hari pengkulturan	103
Rajah 4.2	Keadaan kalus pada media ½ MS dengan 2,4-D, NAA, BAP, Kinetin dan TDZ secara tunggal	106
Rajah 4.3	Perkembangan kalus pada media ½ MS dengan 0.5 mg/l TDZ dan 3 mg/l BAP	107
Rajah 4.4	Morfologi kalus pada media ½ MS dengan kombinasi NAA, 2,4-D, BAP, dan TDZ	110

Rajah 4.5	Regenerasi JSP/pucuk daripada sumber kalus yang berlainan pada media ½ MS dengan 0.5 mg/l TDZ dan 3 mg/l BAP selepas 60 hari pengkulturan	113
Rajah 4.6	Perkembangan JSP/pucuk pada kalus yang berasal daripada media ½ MS dengan 1 mg/l TDZ dan dipindahkan kepada media ½ MS dengan 0.5 mg/l TDZ dan 3 mg/l BAP untuk regenerasi	114
Rajah 4.7	Regenerasi kalus kalus (teraruh daripada media ½ MS dengan 1 mg/l TDZ) pada media ½ MS dengan pengawalatur tumbuhan 0.5 mg/l TDZ dan 3 mg/l BAP dengan sumber karbon yang berbeza	117
Rajah 4.8	Regenerasi kalus (diaruhkan pada media ½ MS dengan 1 mg/l TDZ dan 3 mg/l 2,4-D) pada media ½ MS dengan pengawalatur tumbuhan 0.5 mg/l TDZ dan 3 mg/l BAP dengan sumber karbon yang berbeza	118
Rajah 4.9	Pengimbasan mikroskop elektron pada kalus yang mengalami regenerasi	119
Rajah 4.10	Pertumbuhan dan perkembangan JSP dan pucuk <i>P. rothschildianum</i> pada media RE dengan 100 g/l aditif keladi, 9 mg/l BAP dan 0.3 mg/l 2,4-D	120
Rajah 5.1	Sistem RITA® dan kelalang (<i>shake flask culture</i>) beroperasi dalam makmal	134
Rajah 5.2	Keadaan kalus dalam media cecair ½ MS dengan 1 mg/l TDZ dan 5 mg/l 2,4-D dalam kelalang dan RITA® selepas 30 hari pengkulturan	139
Rajah 5.3	Keadaan kalus yang berasal daripada media ½ MS dengan 1 mg/l TDZ dalam sistem RITA®	141
Rajah 5.4	Regenerasi JSP/pucuk pada kalus selepas 30 hari pengkulturan dalam sistem RITA® dengan rawatan sumber karbon yang berlainan	142
Rajah 6.1	Garis masa propagasi <i>P. rothschildianum</i> berasaskan kultur kalus dan cecair (RITA®)	160



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

SENARAI SINGKATAN DAN SIMBOL

-	Hingga
%	Peratus
.	Perpuluhan
/	Atau
<	Kurang daripada
>	Lebih daripada
=	Sama dengan
±	Tambah tolak
½	Setengah
¼	Suku
®	<i>Registered</i> (telah didaftarkan)
°C	Darjah Celsius
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
Al	Aluminium
ANOVA	<i>Analysis of Varians</i>
B	Boron
BAP	Benzylaminopurine
Ca	Kalsium
Cl	Klorin
cm	sentimeter
Co	Kobalt
CRD	<i>Completely Randomized Design</i>
Cu	Kuprum
Fe	Ferum
g	Gram
g/l	Gram per liter
HCL	Asid Hidroklorik
I	Iron
JSP	Jasad Seperti Protokom
K	Kalium