

## UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

## BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: KULTUR TISSU SECARA IN VITRO KE ATASTUMBUHAN UBATAN Brucea Javonica (L) MERRIjazah: SARJANA MUDASESI PENGAJIAN: 2003 / 2004Saya KWONG PING SHIN

(HURUF BESAR)

mengaku membenarkan tesis (LPS/Sarjana/Doktor Falsafah)\* ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:

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

SULIT

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

TERHAD

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

TIDAK TERHAD

Disahkan oleh

One

(TANDATANGAN PENULIS)

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Alamat Tetap: SK. KIAWAYAN,  
PETI SURAT 03 : 89657DR. JUALANG @ AILAN G ANSAU

Nama Penyelia

TAMBUNAN, SARAWAKTarikh: 24 / 03 / 04

Tarikh: \_\_\_\_\_

CATATAN: \* Potong yang tidak berkenaan.

\*\* Jika tesis ini SULIT atau TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa/organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu dikelaskan sebagai SULIT dan TERHAD.

@ Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana secara penyelidikan, atau disertasi bagi pengajian secara kerja kursus dan penyelidikan, atau Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

KULTUR TISU SECARA *IN VITRO* KE ATAS TUMBUHAN UBATAN

*Brucea javanica (L) MERR*

KWONG PING SHIN

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

PROGRAM BIOTEKNOLOGI  
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

MAC 2004

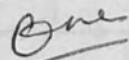


**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

**PENGAKUAN**

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

(10 Mac 2004)



---

KWONG PING SHIN

HS2001-2913

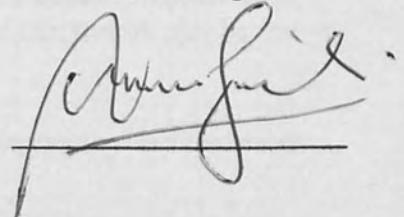


**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

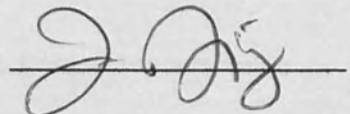
**DIPERAKUKAN OLEH****1. PENYELIA**

(Dr. Jualang @ Azlan bin Gansau )

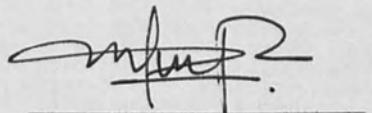
Tandatangan

**2. PEMERIKSA 1**

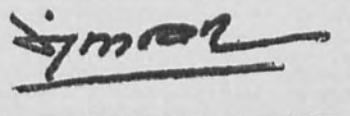
(Dr. Zaleha Abdul Aziz)

**3. PEMERIKSA 2**

(Dr. Vijay Kumar)

**4. DEKAN**

(Prof. Madya Dr. Amran Ahmed)



**UMS**  
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

## PENGHARGAAN

Syukur kepada Tuhan yang Maha Esa kerana dengan berkatNya disertasi ini dapat disiapkan dengan jayanya.

Pertama sekali saya ingin mengucapkan jutaan terima kasih kepada penyelia saya iaitu Dr. Jualang @ Azlan bin Gansau di atas segala bimbingan dan tunjuk ajar beliau dalam melaksanakan projek ini.

Kepada kawan-kawan yang telah memberikan sokongan sepanjang pelaksanaan projek ini, terima kasih banyak saya ucapkan.

Tidak lupa juga kepada para pelajar ijazah sarjana yang telah memberikan tunjuk ajar kepada saya semasa menjalankan kerja-kerja di dalam makmal kultur tisu, serta semua pihak yang terlibat secara langsung atau tidak langsung dalam menjayakan disertasi ini.

Akhir sekali, ucapan terima kasih khas buat ibu saya Christina Diana Durus, sumber inspirasi saya sepanjang pelaksanaan projek ini.

## ABSTRAK

Kajian pengkulturan secara *in vitro* ke atas tumbuhan ubatan *Brucea javanica* telah dijalankan. Dua kepekatan klorox yang berbeza [20% dan 25% (v/v)] digunakan dalam pensterilan biji benih untuk menguji kaedah pensterilan yang terbaik. Pengkulturan biji benih telah dibuat dengan menggunakan 12 kombinasi kepekatan hormon BAP dan NAA yang berbeza untuk mengenalpasti kombinasi hormon yang paling sesuai untuk percambahan dan pertumbuhan biji benih. Pucuk, batang tanpa nodus, batang dengan nodus, kotiledon dan akar telah digunakan sebagai eksplan dalam pengkulturan yang menggunakan 10 kombinasi hormon (NAA:BAP) untuk mengenalpasti penggandaan pucuk terbaik. Hasil kajian mendapati bahawa kedua-dua kepekatan klorox yang digunakan dalam pensterilan adalah sesuai kerana kedua-duanya memberikan keputusan yang sama iaitu tiada kontaminasi. Bagi pengkulturan biji benih, rawatan hormon pertumbuhan 0:2  $\mu\text{M}$  (NAA:BAP) memberikan hasil pertumbuhan kultur terbaik selepas 20 hari pengkulturan, yang mana pertumbuhan kultur (pemanjangan akar dan batang serta kemunculan pucuk) adalah cepat dan keadaan anak pokok pada akhir pemerhatian yang lebih baik berbanding kultur lain. Manakala kultur dengan rawatan hormon 0:6  $\mu\text{M}$  (NAA:BAP) pada eksplan akar memberikan hasil penggandaan pucuk terbanyak sehingga minggu ke-16 iaitu dalam julat bilangan 16-25 pucuk.



## ABSTRACT

The study on *in vitro* tissue culture of the medicinal herb *Brucea javanica* was performed. Two different concentrations [20% and 25% (v/v)] of Clorox were used in the seeds sterilization method to test the best result in the sterilization method. Seed culture was carried out using 12 different combinations of NAA and BAP growth hormone to determine the best combination for seed germination and growth. Shoot, stem without node, stem with node, cotyledon and root were used as explants in determining the best shoot multiplication using 10 different hormone combinations (NAA and BAP). Result showed that both Clorox concentrations were suitable for sterilization as both resulted in no contamination of seeds. For seed culture, the treatment at the ratio of 0:2  $\mu\text{M}$  (NAA: BAP) gave the best growth after 20 days of culture, as the seed's growth (root and stem elongation and shoot emergence) was quick and the seedling's condition was better than the others at the end of observation. On the other hand, the best treatment for shoot multiplication was 0:6  $\mu\text{M}$  (NAA: BAP) on root explant, which produced multiple shoots at the range of 16-25 shoots up until week-16<sup>th</sup>.



## KANDUNGAN

	<b>Muka surat</b>
Pengakuan	ii
Pengesahan	iii
Penghargaan	iv
Abstrak	v
Abstract	vi
Senarai kandungan	vii
Senarai Jadual	ix
Senarai Foto	x
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	1
<b>BAB 2 ULASAN KEPUSTAKAAN</b>	3
2.1 <i>Brucea javanica (L) Merr</i>	3
2.2 Kultur Tisu Tumbuhan	5
2.3 Percambahan biji benih	7
2.4 Penggandaan Pucuk	8
2.5 Pembentukan Kalus	8
2.6 Pengakaran	9
2.7 Media Kultur	10
2.8 Hormon pertumbuhan	10
2.9 Eksplan yang digunakan	11
2.9.1 Biji benih	12
2.9.2 Kotiledon	12
2.9.3 Pucuk	13



2.9.4 Batang	13
2.9.5 Akar	13
2.10 Pensterilan	14
2.11 Balang kultur	15
<b>BAB 3 BAHAN DAN KAEADAH</b>	<b>17</b>
3.1 Penyediaan eksplan	17
3.2 Penyediaan Media	18
3.3 Penyediaan hormon	19
3.4 Pensterilan biji benih	19
3.5 Pengkulturan biji benih	20
3.6 Pengkulturan bagi Penggandaan pucuk	21
3.7 Bekas Kultur yang Digunakan	21
<b>BAB 4 KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN</b>	<b>22</b>
4.3.1 Perbandingan Keputusan Pensterilan Biji Benih	22
4.3.1 Pengkulturan Biji Benih	22
4.3.1 Kultur Penggandaan Pucuk	34
4.3.1 Pemerhatian ke atas Kultur Penggandaan Pucuk	41
4.3.3 Penghasilan pucuk berganda	43
4.3.3 Penghasilan kalus/globul	44
<b>BAB 5 KESIMPULAN</b>	<b>46</b>
<b>RUJUKAN</b>	<b>47</b>
<b>LAMPIRAN</b>	<b>49</b>



## SENARAI JADUAL

Muka surat

4.1 Pemerhatian ke atas kultur-kultur pada hari ke-3	24
4.2 Pemerhatian ke atas kultur-kultur pada hari ke-6	24
4.3 Pemerhatian ke atas kultur-kultur pada hari ke-8	25
4.4 Pemerhatian ke atas kultur-kultur pada hari ke-11	25
4.5 Pemerhatian ke atas kultur-kultur pada hari ke-15	26
4.6 Pemerhatian ke atas kultur-kultur pada hari ke-20	26
4.7 Julat bilangan pucuk berganda yang dihasilkan	40
4.8 Julat bilangan kalus/globul yang dihasilkan	41



## SENARAI FOTO

No. Foto	Muka surat
1.1 Pokok <i>Brucea javanica</i>	5
4.1 Kultur biji benih dalam piring petri bagi ujian pensterilan menunjukkan keadaan tiada kontaminasi	23
4.2 Kultur biji benih tanpa rawatan hormon (kawalan)	27
4.3 Kultur dengan rawatan hormon 0.5:0	27
4.4 Kultur dengan rawatan hormon 1:0	27
4.5 Kultur dengan rawatan hormon 2:0	27
4.6 Kultur dengan rawatan hormon 0:2	28
4.7 Kultur dengan rawatan hormon 0.5:2	28
4.8 Kultur dengan rawatan hormon 1:2	28
4.9 Kultur dengan rawatan hormon 2:2	28
4.10 Kultur dengan rawatan hormon 0:4	29
4.11 Kultur dengan rawatan hormon 0.5:4	29
4.12 Kultur dengan rawatan hormon 1:4	29
4.13 Kultur dengan rawatan hormon 2:4	29
4.14 Kultur penggandaan pucuk dengan rawatan hormon 0:2	34
4.15 Kultur penggandaan pucuk dengan rawatan hormon 0.5:2	35
4.16 Kultur penggandaan pucuk dengan rawatan hormon 1:2	35
4.17 Kultur penggandaan pucuk dengan rawatan hormon 0:4	36
4.18 Kultur penggandaan pucuk dengan rawatan hormon 0.5:4	36
4.19 Kultur penggandaan pucuk dengan rawatan hormon 1:4	



4.20 Kultur penggandaan pucuk dengan rawatan hormon 0:6	37
4.21 Kultur penggandaan pucuk dengan rawatan hormon 0.5:6	38
4.22 Kultur penggandaan pucuk dengan rawatan hormon 1:6	38
4.23 Kultur penggandaan pucuk dengan rawatan hormon 2:6	39

## PENDAHULUAN

Pada masa kini, teknologi sains dan teknologi pengeluaran mewujudkan teknologi pertanian semakin maju. Teknologi ini membolehkan hasil pertanian yang berjaya dan berkesan. Pada masa kini, teknologi pertanian yang terkenal ialah teknologi genetik. Teknologi ini membantu dalam menghasilkan hasil pertanian yang berkualiti dan berjumlah yang banyak. Teknologi ini juga membantu dalam mengurangkan penggunaan pestisida dan herbisida. Selain itu, teknologi ini juga membantu dalam mengurangkan penggunaan air dan bahan kimia. Teknologi ini juga membantu dalam mengurangkan penggunaan tenaga kerja. Selain itu, teknologi ini juga membantu dalam mengurangkan penggunaan ruang dan tenaga kerja. Selain itu, teknologi ini juga membantu dalam mengurangkan penggunaan tenaga kerja. Selain itu, teknologi ini juga membantu dalam mengurangkan penggunaan ruang dan tenaga kerja.



## BAB 1

### PENDAHULUAN

Kultur tisu tumbuhan merujuk kepada pengkulturan secara *in vitro* terhadap semua bahagian tumbuhan hidup, sama ada sel, tisu ataupun organ di bawah keadaan yang aseptik. Teknik ini amat penting dan berguna kerana ia dapat diaplikasikan ke atas banyak jenis tumbuhan, terutamanya tumbuhan-tumbuhan yang mempunyai potensi komersil seperti herba ubatan dan tumbuhan berbunga. Kajian ini melibatkan kultur tisu ke atas *Brucea javanica* (L) merr, sejenis herba yang mempunyai potensi perubatan yang tinggi. Teknik ini akan membolehkan herba yang tumbuh jauh di kawasan hutan ini lebih mudah diperolehi dan fenomena kepupusan juga dapat dielakkan. Ini kerana, dengan hanya menggunakan eksplan daripada pelbagai bahagian tumbuhan, banyak anak-anak pokok yang baru dapat dihasilkan dengan cepat melalui teknik ini. Kajian kultur tisu ke atas *Brucea javanica* belum dijalankan secara meluas. Beberapa aspek dalam kultur tisu perlu dikaji seperti teknik pensterilan, rawatan hormon, eksplan dan media yang sesuai untuk digunakan bagi herba ini.



Objektif-objektif kajian ini ialah:

- Melakukan pensterilan ke atas biji benih *Brucea javanica* dengan menggunakan dua kepekatan klorox yang berbeza iaitu 20% (v/v) dan 25% (v/v) untuk menguji kaedah pensterilan yang terbaik.
- Melakukan pengkulturan biji benih *Brucea javanica* dengan menggunakan 12 nisbah kombinasi hormon BAP dan NAA yang berbeza untuk mengenalpasti kombinasi hormon yang paling sesuai untuk pertumbuhan biji benih.
- Melakukan kultur pelbagai eksplan yang diperolehi daripada kultur biji benih *Brucea javanica* dengan menggunakan 10 nisbah kombinasi hormon BAP dan NAA yang berbeza untuk mengenalpasti kombinasi hormon yang memberikan hasil penggandaan pucuk terbaik.



## BAB 2

### ULASAN KEPUSTAKAAN

#### 2.1 *Brucea javanica* (L) Merr

*Brucea javanica* (L) Merr merupakan sejenis tumbuhan yang tergolong dalam keluarga Simaroubaceae, kumpulan yang terkenal sebagai tumbuhan yang mempunyai ciri-ciri perubatan. Herba ini digunakan untuk merawat pelbagai jenis penyakit, terutamanya malaria. Penyakit lain seperti disentri, diarrhoea dan juga demam boleh dirawat menggunakan herba ini (Soepadmo dan Wong, 1995). Dalam perubatan tradisional masyarakat Cina, ia digunakan untuk merawat ulcer, haemorrhoid, kematu, ketuat dan kanser. Penggunaan sebagai pembunuhan serangga juga merupakan antara kepentingan tumbuhan ini. Bahagian daun digunakan untuk mengubati kurap, bisul, gigitan lipan dan limpa yang membengkak. Selain penting untuk merawat sakit pada bahagian abdomen dan batuk, akarnya merupakan penawar yang penting untuk keracunan dalaman. Di Australia, kulit batang dan akarnya digunakan untuk merawat sakit gigi (Huang, 1999).



*Brucea javanica* tumbuh tersebar di kawasan tropika Asia, Indonesia dan Australia utara (Christine *et al.*, 1995; Luyengi *et al.*, 1996; Soepadmo dan Wong, 1995). Ia dikenali dengan pelbagai nama di berlainan tempat seperti kuwalot (Indonesia), embalau padang (Malaysia), balaniog (Filipina), damli thnang (Cambodia) dan ratchadat (Thailand). Di Sabah, ia juga dikenali dengan pelbagai nama seperti kuinin (dusun/kadazan Tambunan), pait-pait (Kinabatangan) dan payas (dusun/kadazan Ranau).

Pokok *Brucea javanica* boleh tumbuh hingga mencapai ketinggian 5 meter. Daunnya berukuran kira-kira 20-40 cm panjang. Pokok ini berbunga dan berbuah sepanjang tahun. Bunganya berwarna putih kehijauan kepada merah kehijauan atau ungu. Buahnya berukuran 4-5 mm panjang (Soepadmo dan Wong, 1995). Semasa muda buahnya berwarna hijau dan kemudian berubah kepada warna ungu tua apabila matang. Selain warna, struktur luarnya juga berubah apabila tua iaitu menjadi berkedut.

Pelbagai quissanoid yang terkandung di dalam biji *Brucea javanica* mempunyai aktiviti antikanser dan antimalaria. Majoriti bahan kimia yang terkandung dalam biji *Brucea javanica* adalah triterpene quissanoid seperti bruceantin, bruceantinol, bruceantinoside A, brucein A-G dan Q, brucein E 2-O- $\beta$ -D-glucoside, bruceolide, bruceoside A-C, brusatol, dihydrobrucein A, yadanzigan, yadanzeolide A-D dan yadanzeoside A-P (WHO, 1999).

Terdapat beberapa bahan aktif *Brucea javanica* yang telah dihasilkan melalui pengkulturan *in vitro*. Alkaloid Canthin-6-one misalnya, telah dihasilkan melalui kultur ampaian sel *Brucea javanica*.



**Foto 1.1** Pokok *Brucea javanica*

## **2.2 Kultur Tisu Tumbuhan**

Kultur tisu tumbuhan melibatkan pengasingan satu bahagian yang kecil daripada tisu tumbuhan yang dipanggil eksplan dan pengkulturannya di atas media nutrien. Teknik ini amat penting dalam banyak bidang kajian, bukan sahaja dalam bidang fisiologi tumbuhan, biologi sel dan genetik, tetapi juga dalam bidang pertanian, hortikultur dan

industri. Pengkulturan sel dan tisu telah menyebabkan peningkatan dalam pengetahuan tentang pembahagian sel, nutrisi sel, metabolism, radiobiologi, penyimpanan sel dan banyak lagi (Reinert dan Bajaj, 1977). Perkembangan teknologi kultur tisu tumbuhan telah membawa kesan penting terhadap kajian bioteknologi tumbuhan.

Kaedah kultur tisu merupakan satu penemuan besar yang memudahkan penghasilan anak pokok. Dengan hanya menggunakan eksplan daripada pelbagai bahagian tumbuhan, banyak anak-anak pokok yang baru dapat dihasilkan dengan cepat. Anak-anak pokok ini dapat dihasilkan melalui pelbagai cara atau kaedah pertumbuhan mengikut jenis eksplan yang digunakan. Misalnya, eksplan meristem dan apeks pucuk boleh menghasilkan banyak anak pokok setelah mengalami proses percabangan aksiliari dan dirangsang pertumbuhan akarnya. Morfogenesis secara langsung dan tidak langsung pada pelbagai jenis eksplan lain seperti batang, kotiledon, akar dan daun juga boleh menghasilkan banyak anak pokok. Morfogenesis secara langsung berlaku sama ada melalui pembentukan pucuk secara langsung atau melalui embriogenesis secara langsung. Morfogenesis secara tidak langsung juga terbahagi kepada dua cara iaitu pembentukan pucuk secara tidak langsung atau embriogenesis secara tidak langsung (Endress, 1994).

Kultur tisu telah banyak diaplikasikan ke atas pelbagai jenis tumbuhan. Para pengkaji biasanya tertarik untuk melakukan pengkulturan ke atas tumbuhan berubat, tumbuhan perhiasan atau tumbuhan yang mempunyai kepentingan atau nilai ekonomi yang tinggi. Bagi tumbuhan hiasan, orkid merupakan tumbuhan yang sering menjadi tumpuan dan perhatian para pengkaji di serata tempat. Di Malaysia, tumbuhan berubat

yang pernah dikulturkan termasuklah *Eurycoma longifolia* (Tongkat ali), *Morinda citrifolia* (mengkudu), *Centella asiatica* (pegaga) dan banyak lagi.

### 2.3 Percambahan Biji Benih

Percambahan merupakan peringkat awal dalam pertumbuhan biji benih untuk membentuk anak pokok, seterusnya menjadi satu tumbuhan yang lengkap dan matang. Plumul, iaitu pucuk embrio dan radikel, iaitu akar embrio muncul dan tumbuh masing-masing ke atas dan ke bawah. Simpanan makanan untuk percambahan datang daripada tisu endosperma atau kotiledon. Biji benih bercambah sama ada secara epigeal atau hipogeal. Bagi percambahan epigeal, kotiledon akan muncul dari bawah tanah dan berfungsi sebagai daun sebenar. Manakala dalam percambahan hipogeal, kotiledon akan tinggal di bawah tanah (Oxford Dictionary of Science, 1999). Biji benih *Brucea javanica* bercambah secara epigeal, iaitu kotiledon naik dari atas permukaan media kultur mengikut arah pertumbuhan pucuk.

Proses percambahan memerlukan nutrien yang mencukupi serta keadaan persekitaran yang sesuai. Dalam teknik kultur tisu, nutrien-nutrien yang diperlukan telah disediakan dalam bentuk media kultur. Manakala keadaan persekitaran dalam bilik kultur atau “growth chamber” menyediakan keadaan seperti suhu dan pencahayaan yang bersesuaian untuk percambahan.

## 2.4 Penggandaan pucuk

Kajian Al-Bahrany (2002) mendapati bahawa penggandaan pucuk telah dihasilkan daripada eksplan nodus *Citrus aurantifolia*. Media yang digunakan telah dicampurkan dengan hormon BAP, kinetin dan NAA. Jumlah pucuk yang tertinggi dihasilkan oleh media yang mengandungi  $8.8 \mu\text{M}$  hormon BAP,  $4.6 \mu\text{M}$  hormon kinetin dan  $5.4 \mu\text{M}$  hormon NAA. Morgan, Butler dan Bicknell (1997) melaporkan bahawa berlaku penggandaan pucuk pada kultur *Gentiana cerina* dan *G. corymbifera*. Kedua-dua spesies itu dikulturkan di dalam media MS yang mengandungi hormon 6-benzylaminopurine (BAP).

## 2.5 Pembentukan kalus

Hanya sebahagian kecil sel-sel dalam sesuatu eksplan menyumbang kepada pembentukan kalus. Sebaik-baiknya permukaan eksplan yang dipotong didedahkan kepada medium kultur. Kalus juga boleh terbentuk daripada parenkima, seperti yang berlaku pada kultur *Nicotiana*, atau daripada prokambium seperti pada kultur padi. Pembentukan kalus pada eksplan bermula di bahagian di mana eksplan itu dipotong (Evans *et al.*, 1891).

Pembentukan kalus dipengaruhi oleh sumber eksplan. Ini dapat ditunjukkan dalam pengkulturan yang telah dibuat bagi tumbuhan *Persea*. Didapati bahawa keperluan hormon pertumbuhan dalam medium bagi tisu mesokarp dengan tisu kotiledon adalah berbeza. Begitu juga dalam kultur padi yang mana eksplan yang berbeza memerlukan hormon 2,4-D dalam kepekatan yang berbeza untuk membentuk



kalus. Selain itu, saiz eksplan juga mempunyai kesan terhadap perkembangan kalus. Eksplan yang kecil lebih cenderung membentuk kalus, manakala kalus yang bersaiz besar mengekalkan potensi morfogenetiknya yang lebih baik (Evans *et al.*, 1891).

## 2.6 Pengakaran

Bagi kultur biji benih, akar dan pucuk berkembang bersama untuk membentuk satu tumbuhan lengkap. Hal ini berbeza dengan kultur yang eksplannya bukan biji benih, seperti batang, kotiledon, daun dan lain-lain. Eksplan-eksplan seperti ini biasanya akan membentuk kalus terlebih dahulu, kemudian membentuk pucuk. Akar berkembang secara berasingan dengan pucuk. Sesetengah tumbuhan hanya menghasilkan pucuk daripada kalusnya, seperti yang diperhatikan pada varieti tebu. Dalam kes seperti ini, pengakaran boleh dirangsang dengan mencampurkan hormon auksin ke dalam media kultur.

Al-Bahrany (2002) yang membuat pengkulturan *Citrus aurantifolia* mendapati bahawa pemindahan pucuk *in vitro* ke dalam media pengakaran yang mengandungi hormon IBA dan NAA telah menghasilkan plantlet yang lengkap. Rerambut akar terbentuk daripada sel epidermis akar, yang mana ia meningkatkan kesan luas permukaan akar untuk penyerapan nutrien dan air, menyebabkan lebih banyak tanah yang dapat digunakan. Ia juga memperkuatkan lagi cengkaman tumbuhan pada tanah (Bibikova dan Gilroy, 2000).



## 2.7 Media Kultur

Media pengkulturan mengandungi garam-garam tidak organik, sumber karbon, vitamin-vitamin dan hormon tumbesaran yang mana diperlukan oleh explan yang dikultur. Pemilihan media adalah berdasarkan objektif pengkulturan. Contoh-contoh media yang biasa digunakan dalam pengkulturan tumbuhan termasuklah media B5 (Gamborg *et al.* 1968), DKW (Driver dan Kuniyuki 1984), WPM (Lloyd dan McCown 1980) dan lain-lain. Media nutrien yang digunakan dalam kajian ini adalah media MS (Murasghige dan Skoog 1962). Media MS merupakan media yang digunakan secara paling meluas dalam pengkulturan *in vitro* untuk regenerasi tumbuhan (Gamborg dan Phillips, 1995). Komposisi kandungan media MS adalah seperti yang ditunjukkan dalam Lampiran A.

## 2.8 Hormon Pertumbuhan

Hormon diperlukan untuk merangsang tumbesaran kultur tumbuhan. Hormon auxin biasanya digunakan dengan kombinasi hormon sitokinin. Dalam kajian ini, hormon NAA dari auxin dan BAP dari sitokinin digunakan. Auxin diperlukan untuk merangsang pembahagian dan perkembangan sel dan untuk pengakaran. Manakala bagi sitokinin, hormon ini mempunyai peranan penting dalam menggalakkan pertumbuhan pucuk dan regenerasi tumbuhan. Ia boleh juga merangsang pembahagian sel (Gamborg dan Phillips, 1995). Menurut David Evans *et al.* (1981), secara umumnya kombinasi auksin pada kepekatan tinggi dengan sitokinin pada kepekatan rendah menggalakkan pembentukan kalus. Sebaliknya, auksin pada

kepekatan rendah yang dikombinasikan dengan sitokinin pada kepekatan tinggi akan menggalakkan pembentukan pucuk atau plantlet.

## 2.9 Eksplan Yang Digunakan

Semua sel hidup yang normal di dalam tumbuhan mempunyai kebolehan untuk mengalami regenerasi menjadi satu tumbuhan yang lengkap. Kebolehan ini dipanggil totipotensi. Semua bahagian tumbuhan yang mempunyai totipotensi boleh digunakan sebagai eksplan untuk dikulturkan. Bahagian-bahagian yang biasa digunakan sebagai eksplan ialah hujung pucuk, keratan batang, daun, akar, anter, biji benih, kotiledon, hipokotil, embrio dan sebagainya. Saiz dan bentuk eksplan mempunyai pengaruh kepada hasil pengkulturan. Semakin besar saiz eksplan, maka semakin tinggi kemungkinan untuk memperolehi pengkulturan yang berjaya.

Regenerasi tumbuhan untuk menjadi satu tumbuhan lengkap berlaku sama ada melalui proses organogenesis atau melalui proses embriogenesis (Vasil dan Thorpe, 1994). Organogenesis pucuk secara langsung boleh dirangsang daripada tisu pucuk, ruas dan kotiledon seperti yang diperhatikan oleh Siregar dan Chan (2002). Mereka telah membuat pengkulturan *in vitro* terhadap bahagian-bahagian anak pokok *Eurycoma longifolia*.

Biji benih bercambah dan tumbuh menjadi satu tumbuhan lengkap apabila dikulturkan. Ia boleh menghasilkan pucuk dan akar secara bersamaan sehingga menjadi satu anak pokok, walaupun tanpa penambahan hormon tumbesaran. Tetapi berbeza dengan eksplan kotiledon, pucuk, batang dan akar, eksplan jenis ini umumnya

tidak terus menghasilkan satu tumbuhan lengkap. Bagi kotiledon, secara umumnya tisu kotiledon lebih mudah membahagi untuk membentuk organ berbanding bahagian-bahagian tumbuhan yang lain (Siregar dan Chan, 2002). Bagi eksplan batang dan pucuk, kalus akan terbentuk terlebih dahulu sebelum menghasilkan pucuk. Pembentukan pucuk dirangsang oleh hormon sitokinin. Selepas pembentukan pucuk, barulah pengakaran berlaku dengan kehadiran hormon auksin di dalam media kultur.

### 2.9.1 Biji benih

Biji benih akan melalui proses embriogenesis untuk menjadi tumbuhan lengkap apabila dikulturkan. Contoh tumbuhan yang biasa dikulturkan dengan menggunakan biji benih sebagai eksplan adalah tumbuhan orkid. Pengkulturan ke atas biji benih orkid mula berkembang setelah kajian Knudson (1951) tentang pengkulturan biji benih orkid diterbitkan. Biji benih *Gentiana corymbifera* telah dikulturkan dan didapati 54% daripadanya bercambah di atas media MS dalam tempoh 70 hari. Media tersebut mengandungi 100 mg/L asid giberelik (Morgan, Butler dan Bicknell, 1997).

### 2.9.2 Kotiledon

Eksplan kotiledon biasanya diambil daripada bii benih yang sudah bercambah seperti yang dilakukan oleh Siregar dan Chan (2002). Tisu kotiledon telah dijadikan sebagai eksplan 10 minggu selepas percambahan biji benih *Eurycoma longifolia*.

## RUJUKAN

- Bibikova, T. dan Gilroy, S., 2000. Root Hair Development. *Journal of Plant Growth Regulation*. Springer-Verlag, New York
- Endress, R., 1994. *Plant Cell Biotechnology*. Springer, New York.
- Gamborg, O. L. dan Philips, G. C. (pnyt.) 1995. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer, Berlin.
- Huang, K. C., 1999. *The pharmacology of Chinese Herbs*. Edisi kedua. CRC Press, Florida.
- Kamperdick, C. Sung, T. V., Thuy T. T., Tri M. V. dan Adam, G., 1995. (20R)-O-(3)- $\alpha$ -L-Arabinopyranosyl-Pregn-5-EN-3 $\beta$ ,20-Diol from *Brucea javanica*. *Phytochemistry* **38**, (3), 699-701.
- Lebowitz, R. J., 1995. *Plant Biotechnology: A Laboratory Manual*. Wm.C. Brown Publishers, Iowa.
- Luyengi, L. Suh N., Fong, H. S., Pezzuto, J. M. dan Kinghorn, A. D., 1996. A Lignan and Four Terpenoids from *Brucea Javanica* that Induce Differentiation with Cultured HL-60 Promyelocytic Leukemia Cells. *Phytochemistry*, **43**, (2) 409-

Morgan, E. R., Butler, R. M. dan Bicknell, R. A., 1997. *In Vitro Propagation of Gentiana cerina and Gentiana corymbifera*, New Zealand.

<http://www.rsnz.govt.nz/publish/nzjchs/1997/1.php>

Oxford University Press, 1999. Oxford Dictionary of Science. Edisi keempat.  
Markethouse Books Limited, New York.

Reinert, J. dan Bajaj, Y. P. S., 1977. *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Narosa Publishing House, New Delhi.

Reinert, J. dan Yeoman M. M., 1982. *Plant Cell and Tissue Culture: A Laboratory Manual*. Narosa Publishing House, New Delhi.

Siregar, L. M. dan Keng, C. L., 2002. *In vitro Shoot Organogenesis of Eurycoma longifolia*. *The Planter* 78 (915), 289-300.

Soepadmo, E. dan Wong, K. M. (pnyt.). 1995. *Tree Flora of Sabah and Sarawak*. FRIM, Kuala Lumpur

Thorpe, T. A. (pnyt), 1981. *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture*. Academic Press, Inc, London

World Health Organization, 1999. WHO Monographs in Selected Medicinal Plants. 1, WHO, Genera.