

KESAN HORMON DAN CAHAYA TERHADAP PENGARUHAN KALUS DARIPADA
EKSPPLAN DAUN *Etlingera coccinea*

NURSYAMIMI MD. YAZID

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

PROGRAM BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

April 2007



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BERANGKATAN 2007

BORANG MINGCESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: KESAN HORMON DAN CAHAYA TERHADAP PENGARUHAN KALIS

DARIPADA EKSPLAN DAUN Etlingera coccinea

Ijazah: IJAZAH SARJANA MUDA (SAINS) DENGAN KEPUTJIAN

SESI PENGAJIAN: 2004 / 2007

Saya NURSYA MM MD-YAZID

(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)



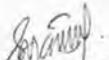
TERHAD

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



TIDAK TERHAD

Disahkan oleh



(TANDATANGAN PENULIS)

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Dr. TUALANG AZLAN GANSAU

Nama Penyelia

Alamat Tetap: LOT 58, KG. FATAF
HARAPAN, KONGKOK, 71300

KEMBANG, N. SEMBILAN

Tarikh: 20 APRIL 2007

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).

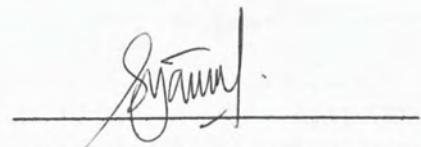


UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGAKUAN

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

20 April 2007



NURSYAMIMI MD. YAZID
HS2004-1790



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PERAKUAN PEMERIKSA

DIPERAKUKAN OLEH

Tandatangan

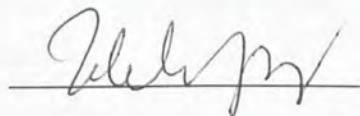
1. PENYELIA

(DSP. (K) DR. JUALANG AZLAN GANSAU)



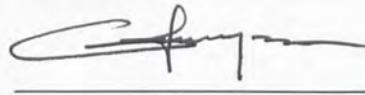
2. PEMERIKSA 1

(DR. ZALEHA A. AZIZ)



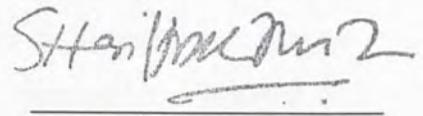
3. PEMERIKSA 2

(DR. IVY WONG NYET KUI)



4. DEKAN

(SUPT/KS PROF. MADYA DR. SHARIFF
A. KADIR S. OMANG)



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGHARGAAN

Penghargaan ini saya ingin tujuarkan kepada semua yang telah terlibat secara langsung atau tidak langsung sepanjang saya membuat disertasi ini. Tanpa nasihat dan pertolongan kalian, disertasi ini tidak mungkin akan dapat disiapkan.

Pertama sekali, saya ingin berterima kasih kepada Prof. Datuk Dr. Mohd. Noh Dalimin, Naib Canselor Universiti Malaysia Sabah (UMS) dan Supt. K. Prof. Madya Dr. Shariff A.Kadir. S Omang, Dekan Seolah Sains dan Teknologi. Jutaan terima kasih juga diucapkan kepada penyelia projek tahun akhir saya, Dsp. (K) Dr. Jualang Azlan Gansau yang telah banyak memberi dorongan, tunjuk ajar, nasihat, teguran, dan didikan yang tidak ternilai kepada saya sepanjang tempoh kajian ini dijalankan.

Tidak lupa juga kepada kakak pascasiswazah dan pembantu-pembantu makmal yang telah banyak membantu saya semasa menjalankan projek tahun akhir saya ini.

Kepada orang yang banyak memberikan sokongan yang kuat dari belakang di sepanjang tempoh kajian ini dijalankan, kedua-dua ibu bapa saya, Md. Yazid Abd. Razak dan Zuraidah Bujang, serta adik-adik saya. Akhir sekali, kepada rakan-rakan seperjuangan dalam jurusan Bioteknologi ini yang telah banyak membantu, memberikan maklumat, dan sentiasa bersama saya di sepanjang kajian ini dijalankan dari awal hingga akhir. Saya amat menghargai jasa dan kerjasama anda semua.



ABSTRAK

Etlingera coccinea adalah sejenis tumbuhan yang termasuk dalam famili Zingiberaceae, yang membiak melalui pecahan rizom. Kajian ini dijalankan untuk menguji kesan hormon, media, dan pencahayaan yang berlainan untuk mendapatkan kesan yang paling baik untuk pengaruan kalus dalam pengkulturan eksplan daun *E. coccinea*. Satu kaedah telah ditemui untuk menghasilkan kalus daripada *E. coccinea*. Daun muda *E. coccinea* dipotong dan dikulturkan atas media kultur MS yang dirawat dengan menggunakan hormon perangsang pertumbuhan secara tunggal dan kombinasi pada kepekatan di antara 0.1 hingga 11.0 μM . Hormon BAP dan NAA digunakan dalam rawatan yang menggunakan hormon tunggal. Manakala bagi kombinasi hormon pula memerlukan dua gabungan hormon yang berlainan iaitu gabungan antara BAP dan 2,4-D, BAP dan NAA, BAP dan IAA, serta Kinetin dan 2,4-D. Eksplan daun dikultur di atas media rawatan dengan jumlah sukrosa 3% (w/v), pH yang telah diselaraskan iaitu 5.7 ± 0.1 , pada suhu $25 \pm 2^\circ\text{C}$, dan diletakkan di bawah keadaan cerah dan gelap sepanjang masa. Keputusan yang diperolehi daripada kajian ni menunjukkan bahawa pengkulturan yang diletakkan di bawah keadaan gelap sepanjang masa mempunyai peratus penghasilan kalus yang lebih tinggi berbanding cerah. Rawatan menggunakan kombinasi hormon pula lebih banyak menghasilkan kalus daripada rawatan menggunakan hormon tunggal. Kombinasi hormon antara BAP dan 2,4-D serta Kinetin dan 2,4-D adalah kombinasi yang paling baik untuk pengaruan kalus. Pembentukan kalus yang paling optimum adalah dalam kombinasi 5.0 μM BAP + 5.0 μM 2,4-D dan 10.0 μM KIN + 8.0 μM 2,4-D yang diletakkan dalam keadaan yang gelap sepanjang masa.

ABSTRACT

Etlingera coccinea is a member of Zingiberaceae family. Normally, the growth of *E. coccinea* is through the rhizome. The effect of hormones, culture medium and light had been studied to get the best results in the production of callus from leaf explants of *E. coccinea*. A successful protocol was developed for callus induction of *E. coccinea*. Excised tissues from young leaves of *E. coccinea* were cultured on MS medium supplemented with single and combination of plant growth regulator at concentrations between 0.1 until 11.0 μM . BAP and NAA were used in treatment using single hormone. Combination of BAP and 2,4-D, BAP and NAA, BAP and IAA, and Kinetin and 2,4-D were used in combination hormones treatment. Leaf explants were cultured on the treatment media supplemented with 3% (w/v) sucrose, pH were adjusted to 5.7 \pm 0.1, temperature was set at 25 \pm 2°C, and incubated under light and dark condition. The results showed the culture that incubated under dark condition have the higher percentage of callus production than light condition. The combination hormone treatment had higher percentage of callus production than single hormone treatment. The combination hormone between BAP and 2,4-D, and Kinetin and 2,4-D is the best combination to produce callus. The optimum callus growth was in 5.0 μM BAP + 5.0 μM 2,4-D and 10.0 μM KIN + 8.0 μM 2,4-D incubated in dark condition all the time.



UMS
UNIVERSITI MAI ASIA SARAWAK

KANDUNGAN

Muka surat

PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	x
SENARAI RAJAH	xi
SENARAI FOTO	xii
SENARAI SIMBOL	xiii
 BAB 1 PENDAHULUAN	 1
 BAB 2 ULASAN PERPUSTAKAAN	 3
2.1 <i>Etlingera coccinea</i>	3
2.2 Pengkulturan <i>in vitro</i>	6
2.3 Kepentingan Pengkulturan <i>in vitro</i>	7
2.4 Aplikasi pengkulturan <i>in vitro</i>	8
2.5 Regenerasi	9
2.5.1 Organogenesis	10
2.5.2 Embriogenesis Somatik	13
2.6 Pembentukan Kalus	14
2.7 Hormon	15
2.7.1 Auksin	15
2.7.2 Sitokinin	16
2.8 Cahaya	17



2.9 Faktor-faktor lain	18
BAB 3 BAHAN DAN KADEAH	20
3.1 Penyediaan Larutan Stok	20
3.1.1 Penyediaan Larutan Stok MS Makronutrien (10X)	21
3.1.2 Penyediaan Larutan Stok MS Mikronutrien (100X)	21
3.1.3 Penyediaan Larutan Stok MS Vitamin (100X)	22
3.1.4 Penyediaan Larutan Stok FeNa ₂ EDTA (100X)	22
3.1.5 Penyediaan Larutan Stok Hormon (mg/ml)	24
3.2 Penyediaan Media Pengkulturan MS	28
3.3 Penyediaan Media Pengkulturan ½ MS	30
3.4 Kaedah Pensterilan	31
3.4.1 Pensterilan Bilik Kultur dan <i>Lamina Flow</i>	31
3.4.2 Pensterilan Alat-alat Radas	32
3.5 Penyediaan Eksplan Daun	33
3.6 Kaedah Pengkulturan	34
3.7 Proses Pencerapan Data	35
BAB 4 KEPUTUSAN	37
4.1 Rawatan Menggunakan Hormon Tunggal	38
4.2 Rawatan Menggunakan Kombinasi Hormon	42
4.3 Rawatan Menggunakan Media ½ MS	46
4.4 Pencahayaan	47
4.5 Kontaminasi	47
4.6 Keperangan	48



BAB 5 PERBINCANGAN	50
5.1 Pembentukan Kalus	51
5.1.1 Rawatan Menggunakan Hormon Tunggal	51
5.1.2 Rawatan Menggunakan Kombinasi Hormon	52
5.1.3 Rawatan Menggunakan Media $\frac{1}{2}$ MS	54
5.1.4 Pencahayaan	55
5.1.5 Faktor-faktor Lain yang Mempengaruhi Penghasilan Kalus	55
4.2 Kontaminasi	57
4.3 Keperangan	58
BAB 6 KESIMPULAN	59
RUJUKAN	61
LAMPIRAN	66



SENARAI JADUAL

No. Jadual	Muka Surat
3.1 Penyediaan Larutan Stok MS (Murashige dan Skoog, 1962) dalam 1 liter	23
3.2 Kepekatan hormon yang digunakan dalam rawatan menggunakan hormon tunggal di dalam media MS	27
3.3 Kombinasi beberapa jenis hormon pada kepekatan yang berlainan di dalam media Murashige dan Skoog (1962)	28
3.4 Isipadu larutan stok untuk media pengkulturan MS (250 ml)	29
3.5 Isipadu larutan stok untuk media pengkulturan $\frac{1}{2}$ MS (250 ml)	30
4.1 Perubahan warna eksplan daun dan kontaminasi yang berlaku di dalam media kultur MS (Murashige dan Skoog, 1962) yang menggunakan hormon NAA dan BAP tunggal dan kultur tersebut diletakkan dalam keadaan yang cerah 24 jam. (%min \pm SD)	39
4.2 Perubahan warna eksplan daun dan kontaminasi yang berlaku di dalam media kultur MS (Murashige dan Skoog, 1962) yang menggunakan hormon NAA dan BAP tunggal dan kultur tersebut diletakkan dalam keadaan yang gelap 24 jam. (%min \pm SD)	39
4.3 Kadar peratusan bilangan eksplan yang telah menghasilkan kalus dalam media MS dengan kombinasi hormon BAP dan 2,4-D dalam keadaan gelap 24 jam. (%min \pm SD)	43
4.4 Kadar peratusan bilangan eksplan yang telah menghasilkan kalus dalam media MS dengan kombinasi hormon 2,4-D dan KIN dalam keadaan gelap 24 jam. (%min \pm SD)	43



SENARAI RAJAH

No. Rajah	Muka Surat
Rajah 2.1 Indole-3-acetic acid (IAA)	16
Rajah 2.2 Naphthaline acetic acid (NAA)	16
Rajah 2.3 Benzylaminopurine (BAP)	17
Rajah 2.4 Kinetin	17



SENARAI FOTO

No. Foto		Muka Surat
Foto 2.1	Bunga <i>Etlingera coccinea</i>	5
Foto 3.1	Sumber-sumber eksplan yang digunakan	33
Foto 3.2	Cara penyusunan eksplan dalam piring Petri	35
Foto 4.1	Perubahan warna eksplan daun yang telah dikultur selepas 3 minggu menggunakan media kultur MS dengan rawatan hormon tunggal.	40
Foto 4.2	Perubahan warna eksplan daun yang telah dikultur selepas 3 minggu menggunakan media kultur MS dengan rawatan hormon tunggal.	41
Foto 4.3	Kalus terbentuk dari eksplan yang dikultur dalam media MS dengan rawatan kombinasi hormon $5.0\mu\text{M}$ BAP + $5.0\mu\text{M}$ 2,4-D yang diletakkan di bawah keadaan gelap 24 jam.	44
Foto 4.4	Kalus terbentuk dari eksplan daun yang dikultur dalam media MS dengan rawatan kombinasi hormon $10.0\mu\text{M}$ KIN + $8.0\mu\text{M}$ 2,4-D dan telah diletakkan di bawah keadaan gelap sepanjang masa.	45
Foto 4.5	Ditunjukkan dua jenis kontaminasi yang telah menyerang media kultur MS menggunakan rawatan kombinasi hormon.	48
Foto 4.6	Eksplan daun yang telah dikultur dalam media MS dengan kombinasi hormon $4.0\mu\text{M}$ KIN + $6.0\mu\text{M}$ 2,4-D telah menjadi perang	49



SENARAI SIMBOL

IAA	Indol-3-asid asetik
NAA	Napftalina asid asetik
BAP	Benzilaminopurin
2,4-D	2,4-Diklorofenoksi asid asetik
KIN	Kinetin
g	gram
mg	milligram
l	liter
ml	mililiter
μl	mikroliter
μM	mikromolar
v/v	isipadu per isipadu
w/v	berat per isipadu
$^{\circ}\text{C}$	darjah Celsius
pH	kepekatan hidrogen



BAB 1

PENDAHULUAN

Etlingera coccinea adalah sejenis tumbuhan dari famili Zingiberaceae. Terdapat 18 genera dan lebih daripada 160 spesis *Zingiber* yang yang tumbuh liar di hutan dan kaki bukit di seluruh Malaysia. Antara spesis *Zingiber* yang terkenal di Malaysia adalah *Etlingera elatior* (bunga kantan), *Etlingera littoralis* dan *Etlingera maingayi*. Spesis-spesis dari famili Zingiberaceae ini bertaburan di kebanyakan tempat yang beriklim khatulistiwa dan di kawasan tropika.

Etlingera coccinea sangat terkenal terutama di kepulauan Borneo. *E. coccinea* mempunyai pelbagai nama yang dipanggil mengikut kawasan masing-masing. Di Sarawak, ia dipanggil tepus kesing, manakala di Sabah, ia terkenal dengan panggilan tuhau oleh masyarakat kadazan (http://www.dalbergpoulsen.com/ginger_poster.html). Tuhau banyak dijumpai di kaki-kaki bukit kerana kawasan kaki bukit sesuai dengan pertumbuhan tuhau yang memerlukan kawasan yang lembap untuk membiak. Ada juga petani yang membuat tuhau sebagai tanaman kebun untuk di jual.



Etlingera coccinea ini membiak melalui pecahan rizom. Oleh sebab itu, ia memerlukan masa yang agak lama untuk membiak. Teknik tisu kultur adalah sangat diperlukan untuk mengurangkan masa pembiakan *E. coccinea*. Tisu kultur adalah satu kaedah pembiakan yang dapat mengeluarkan anak benih secara besar-besaran terutama tanaman yang lambat untuk membiak.

Kajian ini dijalankan untuk merangka satu kaedah kultur tisu bagi pembiakan *E. coccinea* dengan menggunakan daun sebagai eksplan. Kajian ini akan meneliti kesan hormon, cahaya dan media dalam menentukan rawatan pengkulturan yang paling baik untuk mengaruhkan kalus daripada eksplan daun *E. coccinea*. Rawatan ini juga akan menentukan jenis dan kepekatan hormon, serta keadaan pengkulturan yang manakah yang paling sesuai dalam memberikan kesan yang paling bagus untuk pengkulturan *E. coccinea*.

BAB 2

ULASAN PERPUSTAKAAN

2.1 *Etlingera coccinea*

Etlingera coccinea adalah satu tumbuhan asli Malaysia. Sebarannya adalah di negara-negara tropika dan subtropika terutama Indo – Malaya sebagai 1 pusat pelbagai spesis *Zingiber*. Ia tergolong dalam keluarga Zingiberaceae, order Zingiberalis. Daripada 160 spesis yang terdapat di Malaysia, 150 spesis itu telah dikenal pasti berada di kepulauan Borneo (Smith 1989) dan merupakan tumbuhan tropika yang penting pada 7 abad yang lalu (Leverington, 1983; Encyclopedia Britannica Micropedia, 1984).

Etlingera coccinea mempunyai bunga yang cantik dan menarik yang kebanyakannya berwarna merah menyala. Tetapi, *E. coccinea* belum mencapai tahap menjadi tanaman untuk dijadikan perhiasan. Ini adalah kerana bunga *E. coccinea* berada jauh daripada batang keratannya, dan bunga tersebut berada di atas



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

permukaan tanah. Tiada batang yang boleh dijadikan sokongan untuk menyokong bunga tersebut. Mungkin pada suatu hari nanti *E. coccinea* akan menjadi salah satu tanaman hiasan kerana ia mempunyai bunga yang sangat menarik. Gambar bunga *E. coccinea* boleh dilihat pada Foto 2.1.

Satu kajian telah dijalankan mengenai penyebaran *Alpinia* dimana didapati *Alpinia* dan *Etlingera* adalah dua genera yang bergabung sifat. Tetapi secara semulajadi, *Alpinia* adalah berbeza daripada lokasinya dan ini tidak membolehkan ia dikelaskan di bawah jenis yang sama.

Masyarakat di Sabah terutama masyarakat kadazan dusun mempunyai alternatif lain untuk mengkomersialkan *E. cocinea* ataupun lebih dikenali dengan panggilan tuhau ini. Mereka menjadikan tuhau sebagai penambah perasa makanan dalam makanan hidangan sehari-hari mereka. Mereka mengawet ataupun membuat tuhau tersebut sebagai jeruk dengan memotong bahagian rizom tuhau kecil-kecil, kemudian ia akan dicampurkan dengan bahan-bahan penambah perasa yang lain seperti cili dan cuka (http://www.melur.com/myherba.asp?plant_id=202). Walaupun bau tuhau tersebut agak kurang menyenangkan, tetapi bagi mereka ia adalah hidangan yang paling lazat. Sesetengah petani menggunakan peluang ini untuk menambahkan pendapatan mereka dengan menanam dan membuat sendiri jeruk tuhau tersebut. Tetapi, untuk penanaman tuhau, biasanya memakan masa yang sangat lama untuk membawa hasil. Oleh sebab itu, kaedah tisu kultur diperkenalkan untuk mengurangkan masa yang diambil untuk menunggu tuhau tersebut menjadi matang.

Selain daripada masalah pertumbuhan *E. coccinea* yang memerlukan masa yang terlalu lama untuk mendapatkan hasilnya, terdapat juga masalah sampingan yang lain. Serangan nematoda, serangga perosak, dan tikus tanah telah menjadi salah satu masalah kepada penanamannya. Tikus tanah akan mengorek lubang dalam tanah yang mengandungi benih *E. coccinea* dan ia akan memakannya. Oleh sebab permasalahan ini juga telah menyebabkan kaedah tisu kultur secara *in vitro* adalah satu kaedah yang selamat, bersih, disamping menjimatkan masa untuk ia mendapatkan hasilnya (Coleman dan Kearns, 2003).



Foto 2.1 Bunga *Etlingera coccinea*.

2.2 Pengkulturan *in vitro*

Pengkulturan *in vitro* berasaskan konsep totipotensi. Ia bermaksud sel tumbuhan tersebut berupaya melalui proses penjanaan semula membentuk satu individu lengkap jika diberikan keadaan yang sesuai dan sempurna (Van der Have, 1979). Pembibakan *in vitro* juga dikenali sebagai pembibakan secara kultur tisu atau pembibakan mikro. Pembibakan melalui kultur tisu ialah teknik membesarkan sel, tisu, organ dalam media yang bernutrien dan tanpa kehadiran mikroorganisma (Staba, 1980).

Beberapa teknik tisu kultur telah berjaya digunakan untuk memperbaiki genetik tumbuhan berbunga. Tisu kultur boleh digunakan dengan cepat dimana pengkulturan *in vitro* di dalam industri hortikultur hiasan membolehkan pengeluaran anak pokok yang bebas daripada serangan penyakit (Chu, 1985). Kultur *in vitro* menawarkan kaedah untuk mencipta variasi dan mempergunakan variasi yang terhasil terhadap persekitaran tanaman. Tisu dari mana-mana bahagian tumbuhan boleh diasingkan dan tumbuh secara *in vitro* apabila dibekalkan dengan nutrient dan pengawalatur tumbuhan yang sesuai. Kaedah kultur mercu pucuk halia merupakan teknik yang paling sesuai disamping mengeluarkan tumbuhan yang bebas patogen (Sakamura dan Suga, 1989).

Kelebihan pengkulturan *in vitro* yang lain adalah dalam kuantiti bahan tanaman yang boleh dihasilkan secara seragam dalam jangka masa yang singkat (Poincelot, 1979). Kitaran penggandaan mata tunas yang singkat adalah ekonomik untuk mendapatkan

pengawalan tumbuhan yang bebas patogen (Bhojwani dan Radzan, 1983). Teknik ini juga boleh dijalankan disepanjang masa dan risiko penyakit serta perosak dapat dikawal pada tahap minima (Domasco dan Barba, 1984). Penyakit nematoda dapat dihapuskan (De lange *et al.*, 1987). Ia juga tidak memerlukan ruang penanaman yang besar (Kane *et al.*, 1988). Teknik pembiakan ini adalah penting sebagai asas dan penggunaan dalam sesuatu penelitian mahupun pengeluaran secara komersial (Bhojwani, 1990).

2.3 Kepentingan Pengkulturan *in vitro*

Pengkulturan *in vitro* untuk tumbuhan mempunyai lebih banyak kebaikan jika dibandingkan dengan kaedah lama untuk membiakkan tumbuhan tersebut. Melalui tisu kultur tumbuhan, hanya baka tumbuhan yang baik dan berkualiti sahaja yang akan dipilih untuk dikultur. Oleh itu, pada peringkat akhir tisu kultur ini nanti akan menghasilkan progeni tumbuhan yang lebih baik. Kaedah tisu kultur ini juga akan menghasilkan tumbuhan dalam keadaan yang steril dan bilangan progeni yang terhasil pula adalah dalam kuantiti yang lebih banyak dan dalam jangka masa yang singkat (Coleman dan Kearns, 2003). Melalui kaedah tisu kultur yang steril ini akan menghalang tumbuhan ini daripada serangan penyakit atau kulat. Bilangan progeni yang lebih banyak terhasil tidak akan mengubah keadaan genetik tumbuhan tersebut. Genetik progeni yang terhasil adalah sama seperti genetik induk tumbuhan yang telah dikulturkan itu.

Melalui kaedah ini juga kita dapat memperbanyakkan variasi tumbuhan baru dalam masa yang singkat. Tumbuhan bermusim juga boleh dikulturkan. Bagi tumbuhan yang bermusim, ia boleh dilakukan melalui kaedah tisu kultur pada bila-bila masa sahaja tanpa mengikut musim yang biasa dilaluinya kerana tumbuhan ini akan dikulturkan dalam keadaan *in vitro* (Coleman dan Kearns, 2003). Teknik ini juga boleh mengurangkan masa yang diperlukan bagi sesetengah tumbuhan yang memerlukan masa yang lama untuk propagasi seperti orkid. Teknik tisu kultur hanya memerlukan sedikit tisu atau organ daripada induk tumbuhan yang susah untuk dipropagasikan ini, dan dikulturkan secara *in vitro* dengan menggunakan media yang sesuai dengan pertumbuhannya. Dengan ini, ia akan menjimatkan masa dan tenaga untuk mendapatkan tumbuhan yang matang dalam masa yang singkat.

2.4 Aplikasi Pengkulturan *in vitro*

Terdapat beberapa aplikasi dalam kaedah tisu kultur tumbuhan ini. Yang paling penting adalah ia dapat menghasilkan bilangan tumbuhan dengan kandungan genetik yang sama dan banyak dalam masa yang singkat. Mikropropagasi banyak digunakan untuk menyelamatkan spesis-spesies tumbuhan yang hampir pupus dan terancam. Pengklonan ini juga digunakan untuk mengkaji kesan-kesan ke atas genotip dan keadaan fenotip (Ahuja *et al.*, 1988; Glock 1988) tumbuhan tersebut selepas dikulturkan.

Para penyelidik juga boleh menggunakan kaedah tisu kultur ini untuk mengkaji komponen-komponen yang ada dalam tumbuhan tersebut dengan tujuan mencari ciri-ciri yang mungkin ada dalam tumbuhan itu, seperti contoh ciri yang boleh menghalang daripada serangan penyakit dengan menggunakan kaedah penyaringan (Coleman dan Kearns, 2003). Melalui tisu kultur ini juga boleh mengacukkan dua atau lebih tumbuhan yang berlainan spesis untuk menjadi satu tumbuhan baru dengan ciri-ciri yang lebih baik. Selain daripada itu, teknik tisu kultur tumbuhan juga boleh menggunakan bahagian meristem tumbuhan boleh menghasilkan tumbuhan yang bebas daripada penyakit daripada tumbuhan induk yang berpenyakit.

2.5 Regenerasi

Kaedah yang boleh digunakan untuk membentuk satu struktur baru pada eksplan yang telah dikulturkan secara *in vitro* dikenali sebagai regenerasi. Adalah sesuatu yang tidak mustahil untuk membuat regenerasi keseluruhan tumbuhan daripada protoplas, sel tunggal dan sebahagian kecil daripada tisu tumbuhan kerana sel tumbuhan tersebut adalah totipoten. Totipotensi bermakna sel tumbuhan tersebut boleh diaruhkan atau menyebabkan pembentukan tumbuhan yang baru melalui keadaan kultur yang sesuai untuk memperkembangkan tumbuhan tersebut di sepanjang proses pengkulturan tersebut (Bonga dan Aderkas, 1992). Tumbuhan yang telah dilakukan regenerasi boleh dikesan apabila ada sel yang tumbuh pada tumbuhan induk yang telah dikulturkan tersebut.

Regenerasi melalui pengkulturan tisu ini boleh dicapai melalui organogenesis dan embriogenesis. Kebanyakan tumbuhan yang dikultur hanya boleh diregenerasi melalui salah satu cara, samada organogenesis ataupun embriogenesis. Hanya sebilangan kecil tumbuhan yang mampu menjalani kedua-dua organogenesis dan embriogenesis secara serentak. Regenerasi sesuatu tumbuhan boleh dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti sumber eksplan, saiz eksplan, spesis tumbuhan, kepekatan hormon, jenis hormon, suhu, pH dan cahaya (Coleman dan Kearns, 2003).

2.5.1 Organogenesis

Pembentukan organ seperti akar dan pucuk secara langsung dari pengkulturan eksplan atau kalus dipanggil organogenesis (Bonga dan Aderkas, 1992). Organogenesis berkembang melalui dua cara yang berlainan, tetapi pada akhir hasilnya adalah sama. Cara yang pertama adalah organogenesis secara langsung, dan yang kedua adalah secara tidak langsung. Akar atau pucuk yang tumbuh terus daripada eksplan tanpa melalui pembentukan kalus dipanggil organogenesis secara langsung (Coleman dan Kearns, 2003). Manakala, apabila akar atau pucuk tersebut terhasil daripada kalus yang terbentuk pada eksplan, ia dipanggil organogenesis secara tidak langsung. Kebanyakan tumbuhan biasanya akan menjalani organogenesis secara langsung. Dalam teknik tisu kultur, pembentukan akar dan pucuk daripada eksplan samada secara langsung atau tidak adalah bergantung pada kepekatan dan jenis hormon yang digunakan dalam media yang telah disediakan untuk mengaruhkan perkembangan eksplan tumbuhan tersebut. Jika

RUJUKAN

- Ahuja M.R, Krusche D, dan Melchoir G.H. 1988. *Determination of Plantlet Regeneration Capacity of Selected Aspen Clones in vitro*. In: M.R. Ahuja (ed) Somatic Cell Genetics of Woody Plants, Kluwer Academic Publishers, pp 127-135.
- Babu, K.N., Samsudeen, K., dan Ratnabal, M.J. 1992. *In vitro* plant regeneration from leaf-derived callus in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 29:71-74.
- Bhojwani, S.S dan Radzan, M.K. 1983. *Plant Tissue Culture: Application and Limitations*. Elsevier Science Publishers Company, Amsterdam.
- Bhojwani, S.S. 1990. *Plant Tissue Culture : Application and Limitations*. Elsevier Science Publishers Company, Amsterdam.
- Biochemie, D. 2001. *Biochemicals Plant Cell and Tissue Culture*.
- Bonga, J.M. dan Aderkas, P.V. 1992. *In vitro Culture of Trees*. Forestry Science, Vol. 38. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Brown, J.T., 1990. The initiation and maintenance of callus cultures. In: Pollard JW, Walker JM, editors. *Plant Cell and Tissue Culture*. 1st edition. USA:Humana Press; p. 57-63.
- Chu, I.Y.E. 1985. *The Application of Tissue Culture to Plant Improvement and Propagation the Ornamental Horticulture Industry*.
- Coleman, J.O.D. dan Kearns, A. 2003. *Basics Plant Cell Culture*. BIOS Scientific Publishers, London.

De lange, J.H., P. Willers dan M. Nel. 1987. Eliminating of nematodes from ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) by tissue culture. *J. HortScience*. 62:249-252

Domasco, D.P dan Barba R.C. 1984. *In vitro* culture of Saba banana (*Musa sp*) Cv. Saba (BBB). *Philipine Agriculturest*. 67(3):351-358

Elsa, V.Z., Guadalupe, S.M., Ana, N.H.L., Blanca, M.B., Gabriela, T.T., Antonia, D.J.S., Miguel, V.D.V., dan Antonio, J.A. 2003. *In vitro* regeneration of plans of Turmeric (*Curcuma longa L.*) in a hydroponic system. *Biotechnologia Aplicada* 20:25-31

George E.F. dan Sherrington P.D. 1988. *Plant Propagation by Tissue Culture; Handbook and Directory of Commercial Laboratories*. Exegetics Ltd, Edington.

Glock H. 1988. *Differential Norms of Reaction in Tissue Culture of Birch*. In: MR Ahuja (ed) *Somatic Cell Genetics of Woody Plants*, Kluwer Academics Publishers. pp. 119-125.

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

Hart J.W. 1988. *Light and Plant Growth*. Unwin Hyman, London.

Hemant, L., Ebru, B., Alana, H., Markus, G., dan Ikhlas, K. 2002. *In vitro* plant regeneration from leaf-derived callus of *Cimicifuga racemosa*. *Planta med* 68:912-915.

http://www.dalbergpoulsen.com/ginger_poster.html

http://www.melur.com/myherba.asp?plant_id=202

- Kane, M.E., Sheehen T.J. dan Ferwerda F.H., 1988. *In vitro* growth of American lotus embryos. *HortScience*. 23(3):611-613
- Landi, L. dan Mezzetti, B. 2005. TDZ, auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria*. Cell Biology and Morphogenesis. *Plant Cell Rep.* (2006) 25:281-288
- Leopold AC. 1987. *Contemplation on Hormones as Biological Regulators*. In: GV Hoad, JR Lenton, MB Jackson, and RK Atkin (eds). *Hormones action in Plant Development – A Critical Appraisal*, Butterworths, London. pp. 3-15.
- Mancinelli A.L. 1989. Interaction between cryptochrome and phytochrome in higher plant photomorphogenesis. *Amer J Bot* 76:143-154.
- Minocha S.C. 1987. PH of the culture medium and the growth and metabolism of cells in culture. In: JM Bonga and DJ Durzan (eds). *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Vol 1, *General Principles and Biotechnology*, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. pp. 125-141.
- Murashige, T. dan Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nagl W. dan Popp, F. 1983. A physical (electromagnetic) model of differentiation: I. Basic considerations. *Cytobios* 37:45-62
- Noweg, T., Abdullah, A.R. dan Nidang, D., 2003. *Forest Plants as Vegetables for Communities Bordering the Crocker Range National Park*. ASEAN Riview of Diversity and Environmental Conservation (ARBEC).
- Parfitt, D.E, Almehdi, A.A, dan Bloksberg, L.N., 1988. Use of organic buffers in plant tissue culture systems. *Sci Hortic* 36:157-163.

Poincelot, T.P. 1979. *Horticulture Principle and Practical Application*. Prentice Hall, New Jersey.

Rout, G.R. 2002. Direct plant regeneration from leaf explants of *Plumbago* species and its genetic fidelity through RAPD markers. *Annals of Applied Biology* 140:305

Rout, G.R., Das, G., Samantaray, S., dan Das, P. 2000. *In vitro* Micropagation of *Lawsonia inermis* (Lythraceae).

Sakamura, F. dan Suga, T. 1989. *Zingiber officinale* Rosc. (Ginger). In *vitro* Propagation and Production of Volatile Constituents. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol 7 : Medicinal and Aromatic Plants II. Springer – Verlag, Berlin Heidelberg.

Sirugsa, P. 1999. *Thai Zingiberaceae: Species Diversity and Thai uses*. IUPAC.

Smith R. M. 1989. "A Review of Borneo Zingiberaceae": V (Zingiberaceae). *Notes of the Royal Botanic Garden, Edinburgh*. 45:409-423

Smith R.M. 1985. A review of Borneon Zingiberaceae:I (Alpineae). *Notes of the Royal Botanic Garden, Edinburgh*. 42(2) : 261 – 314.

Thériou, K.D. dan Bosabalidis, A.M. 1997. Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation, in kiwifruit cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 47, 127-134.

Toonen, M.A.J. dan De Vries, S.C. 1996. *Initiation of Somatic Embryos from Single Cells*. In T.L. Wang and A. Cuming (eds.), *Embryogenesis, the Generation of a Plant*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK., pp. 173-190.

Van der Have, D.J. 1979. *Plant Breeding Perspective*. Cotennial Publication of Korinklijk Kweekbedrijf En Zaadhinkel Wagening.

Zaerr, J.B. dan Mapes, M.O. 1982. *Action of growth regulators*. In: JM Bonga and DJ Durzan (eds). *Tissue Culture in Forestry*, Martinus Nijhoff/ Dr W Junk Publishers, The Hague, pp 231-255.