

**PERCAMBAHAN *RENANTHERA BELLA* SECARA *IN VITRO* DAN
PERTUMBUHAN SERTA PERKEMBANGAN PROTOKOM**

MOHD. ZUHAIR BIN ZAINAL ABIDIN

**DISERTASIINI DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI SEBAHAGIAN
DARIPADA SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH SARJANA SAINS DENGAN**

KEPUJIAN

**PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

**PROGRAM TEKNOLOGI TUMBUHAN
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

Mac 2007



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: PERCAMBABAAN RENANTHERA BELLA SECARA IN VITRO DAN PERTUMBUHAN SERTA PERICEMBANGAN PROTOKOL

Ijazah: SARJANA MUDA SAINS

SESI PENGAJIAN: 2003 / 04

Saya

(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

TERHAD

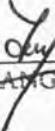
TIDAK TERHAD

PERPUSTAKAAN

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

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

Disahkan oleh


(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

PROF - MADYA DR. MARIAH

Nama Penyelia

ABD LATIF

Alamat Tetap: No. 6, JLN MELUR 21,
TAMAN MELUR AMPANG,
68000 PELANGOR DARUL EHSAN

Tarikh: 27/04/07

Tarikh: 29/04/07

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

16 Mac 2007

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI SABAH

MOHD ZUHAIR BIN ZAINAL ABIDIN

HS 2003-4626



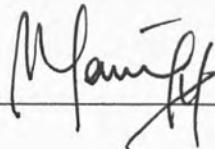
UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

DIPERAKUKAN OLEH

Tandatangan

1. PENYELIA

(Prof. Madya Datin Dr. Mariam Abd. Latif)


2. PEMERIKSA 1

(Tn. Hj. Dandan @ Ame Bin Haji Alidin)

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

HJ. MOHD. DANDAN @ AME BIN HJ. ALIDIN
 Pensyarah Kanan
 Sekolah Pertanian Lestari
 Universiti Malaysia Sabah

3. DEKAN

(Supt/Ks Prof. Madya Dr. Shariff A.Kadir)

(S. Omang)



UMS
 UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGHARGAAN

Syukur alhamdulillah saya panjatkan ke hadrat Ilahi kerana di atas limpah kurnia serta nikmat yang dikurniakan oleh-Nya, saya dapat menyiapkan projek saya yang bertajuk "Kesan media kultur berbeza keatas percambahan *Renanthera Bella* secara *in vitro* dan pertumbuhan serta perkembangan protokom " bagi memenuhi sebahagian daripada syarat memperolehi ijazah sarjana muda sains dengan kepujian ini dalam tahun ini.

Buat julung kalinya, saya ingin mengucapkan terima kasih kepada Universiti Malaysia Sabah yang telah memberikan saya peluang untuk meneruskan pengajian di universiti ini serta penyediaan peralatan serta bahan yang diperlukan dalam menjalankan projek ini. Ucapan terima kasih yang tidak terhingga diucapkan kepada penyelia saya, Prof. Madya Datin Dr. Mariam Abd Latif yang telah banyak memberikan tunjuk ajar serta panduan yang amat bermakna dan berharga bagi menjayakan projek ini. Kegigihan beliau dalam membantu projek ini amat saya hargai. Tanpa tunjuk ajar dari beliau, pastinya projek ini tidak dapat berjalan dengan baik sehingga ke tahap ini. Segala tunjuk ajar dan panduan dari beliau amatlah disanjungi.

Tidak lupa juga ucapan terima kasih kepada pelajar pasca siswazah, Cik Rosmah Murdad, Roseline Baun Ajang dan Cyril, yang turut memberikan pendapat serta bantuan yang tidak terhingga sepanjang projek ini dijalankan. Terima kasih juga diucapkan kepada ibu bapa saya, Encik Zainal Abidin b. Hj. Harun dan Puan Saadiah bt Md Yunus serta keluarga yang tersayang di atas sokongan dan dorongan kepada saya dari bermulanya projek ini sehinggalah ke akhir projek ini dijalankan. Setinggi ucapan terima kasih juga diucapkan kepada Nor Esnita Mohd Salleh di atas sokongan serta bantuan beliau dalam menjayakan projek ini. Seterusnya kepada rakan-rakan di atas bantuan yang diberikan. Segala bantuan serta sokongan yang diberikan tidak ternilai harganya dan amat bermakna bagi menjayakan projek ini dan pastinya menjadi ingatan buat selamanya. Sekian terima kasih. Wassalam.

ABSTRACT

This study was carried out to evaluate the effect of different culture media on germination of and growth and development of protocorms. The culture medium chosen for this *in vitro* germination of *R. bella* was Experimental Ernst Robert medium (XER). The seed was obtained from hand pollinated *R. bella* pods. A Half strength and full strength of MS vitamins were used as an additive in the basal XER medium. XER medium without any additional vitamin was used as control medium. Protocorms formed from the germinated seed were recultured on other medium to observe the growth and development. The culture media used for this purpose were Murashigee & Skoog (MS) and Vacin & Went (VW). The different BAP at concentrations 0, 1.0 and 3.14 μM were used to induce the development of protocorm which were 0 μM , 1.0 μM and 3.14 μM . Each different concentration of hormone was combined with another 4 concentrations of coconut water. Concentration of coconut water used were 0% (v/v), 10% (v/v), 15% (v/v) and 20% (v/v). Solely MS medium and VW medium without any addition of hormone and coconut water were used as control treatment. XER medium with half strength of vitamin MS had the most striking effect on inducing germination of *R. bella* compared to others. For the protocorm growth and development, VW medium containing 3.14 μM BAP formed high percentage of shoot formation but 1.0 μM BAP also recorded high mean numbers of shoot in total treatment. The 20% (v/v) coconut water generally gave a significant effect on proliferation of protocorm in combination with 1.0 μM BAP.

ABSTRAK

Kajian ini telah dijalankan untuk melihat kesan vitamin terhadap percambahan *R. bella* dan kesan hormon dan air kelapa terhadap pertumbuhan protokom *R. bella*. Media Experimental Ernst Robert (XER) telah dipilih dalam percambahan *in vitro* *R. bella*. Proses percambahan secara *in vitro* ini telah menggunakan biji benih *R. bella* daripada pod yang terhasil dari pokok orkid pendebungaan tangan. Proses percambahan *R. bella* ini didorong dengan penggunaan dua kepekatan vitamin MS yang berbeza iaitu separuh kepekatan dan seluruh kepekatan. Protokom yang terhasil kemudiannya di kultur pada media Murashige dan Skoog (MS) dan Vacin & Went (VW). Kepekatan hormon benzylaminopurine (BAP) yang berbeza iaitu $0\mu\text{M}$ dan $1.0\mu\text{M}$ dan $3.14\mu\text{M}$ BAP digunakan. Setiap kepekatan hormon ditambahkan kombinasi dengan empat kepekatan air kelapa yang berbeza: 0% (v/v), 10% (v/v), 15% (v/v) dan 20% (v/v). Media MS dan VW tanpa sebarang penambahan hormon dan air kelapa dijadikan sebagai media kawalan dalam kajian ini. Media XER yang mengandungi separuh kepekatan vitamin MS memberikan peratus percambahan yang tinggi berbanding media kawalan dan media penambahan seluruh kepekatan vitamin MS. Bagi perkembangan protokom, media VW yang mengandungi $3.14 \mu\text{M}$ BAP memberikan pertumbuhan pucuk yang lebih baik. Namun begitu, kepekatan BAP pada $1.0 \mu\text{M}$ memberikan kesan pada pembentukan pucuk dalam keseluruhan rawatan. Kepekatan air kelapa 20% (v/v) memberikan kesan proliferasi pada keseluruhan media dan merangsang pembentukan pucuk dengan kombinasi $1.0 \mu\text{M}$ hormon BAP.

BAB 3	BAHAN DAN KADEAH	26
BAB 4	KEPUTUSAN DAN ANALISIS DATA	45
BAB 5	PERBINCANGAN	66
BAB 6	KESIMPULAN	74
RUJUKAN		77
LAMPIRAN A		83
LAMPIRAN B		84
LAMPIRAN C		87



SENARAI JADUAL

No. Jadual	Muka surat
3.1 Fungsi setiap komponen dan kesan kekurangannya terhadap pertumbuhan eksplan.	28
3.2 Senarai bahan kimia yang terkandung di dalam larutan stok media asas XER. pertumbuhan eksplan.	30
3.3 Senarai bahan kimia yang terkandung di dalam larutan stok media MS. berbeza di dalam setiap set media MS.	32
3.4 Senarai bahan kimia yang terkandung di dalam larutan stok media VW.	33
3.5 Rawatan percambahan <i>R. bella</i> secara <i>in vitro</i> dalam setiap set media XER.	40
3.6 Kepekatan hormon dan air kelapa pada kepekatan yang berbeza di dalam setiap set media MS dan VW.	41
4.1 Percambahan biji benih <i>R. bella</i> pada media yang berbeza.	47
4.2 Jadual ANOVA kesan percambahan <i>R. bella</i> pada hari ke-180.	49
4.3 Ujian Tukey HSD menunjukkan perbezaan singnifikan antara ketiga-tiga media yang digunakan.	49
4.4 Tindakbalas protokol keatas jenis media kultur berbeza pada minggu ke-7 selepas kultur.	54
4.5 Jadual ANOVA kesan kepekatan hormon yang berbeza terhadap penghasilan pucuk pada <i>R. bella</i> dalam media MS.	61
4.6 Jadual ANOVA kesan kepekatan air kelapa yang berbeza terhadap penghasilan pucuk pada <i>R. bella</i> dalam media Ms.	61
4.7 Jadual ANOVA kesan kepekatan air kelapa yang berbeza terhadap penghasilan pucuk pada <i>R. bella</i> dalam media VW.	62



- 4.8 Jadual ANOVA kesan kepekatan hormon yang berbeza terhadap penghasilan pucuk pada *R. bella* dalam media VW. 62



SENARAI RAJAH

No. Rajah	Muka surat
3.1 Langkah penyediaan media.	39
4.1 Perubahan peratusan percambahan biji benih <i>R. bella</i> pada media kultur berbeza.	50
4.2 Indek pertumbuhan <i>R. bella</i> pada media kultur berbeza.	51
4.3 Peratus pembentukan protokom <i>R. bella</i> pada media kultur berbeza.	52
4.4 Min peratus protokom yang bertindakbalas dalam rawatan berbeza pada minggu ke-7 selepas kultur dalam media MS.	55
4.5 Min peratus protokom yang bertindakbalas dalam rawatan berbeza pada minggu ke-7 selepas kultur dalam media VW.	56
4.6 Min pertus protokom yang menghasilkan pucuk dengan perbandingan kepekatan hormon dan air kelap berbeza dalam media MS.	57
4.7 Min pertus protokom yang menghasilkan pucuk dengan perbandingan kepekatan hormon dan air kelap berbeza dalam media VW.	59



SENARAI FOTO

No. Foto		Muka surat
2.1	Bunga orkid <i>Renanthera bella</i>	8
4.1	Biji benih <i>R.bella</i> yang belum bercambah.	48
4.2	Pembentukan pucuk vegetatif selepas minggu ke-4 pengkulturan pada media MS.	63
4.3	Pembentukan pucuk vegetatif selepas minggu ke-4 pengkulturan pada media VW.	64
4.4	Protokom yang mengalami proliferasi pada minggu ke-7 selepas pengkulturan pada media MS dan VW.	65

SENARAI SIMBOL

cm	sentimeter
μM	mikromolar
M	molar
ml	mililiter
g	gram
L	liter
mgl^{-1}	miligram per liter
mgml^{-1}	miligram per mililiter
gl^{-1}	gram per liter
$^{\circ}\text{C}$	darjah selsius
v/v	isipadu/isipadu
w/v	berat/isipadu
v	isipadu
BAP	benzylaminopurine
NAA	naphthaleneacetic acid
IAA	indole acetic acid
%	peratus
N	normaliti
SD	sisihan piawai
JMR	jisim molekul relatif



BAB 1

PENDAHULUAN

Orkid merupakan tumbuhan berbunga yang tergolong dalam famili Orchidaceae. Famili orchidaceae merupakan famili tumbuhan berbunga yang terbesar antara semua jenis tumbuhan berbunga di seluruh dunia. Orkid merupakan tumbuhan monokotiledon yang membesar dengan agak lambat (Menzies, 1991). Terdapat lebih kurang 450 genus dan 35,000 spesies orkid yang telah ditemui di seluruh dunia. Manakala lebih 57,000 spesies kacukan orkid telah dihasilkan. Di Malaysia terdapat sebanyak 220 genus dengan 1,750 spesies orkid (Karim & Haris, 1989). Spesies ini didapati telah mengalami pengurangan dari segi bilangan yang semakin membimbangkan terutamanya dari spesies yang jarang ditemui seperti *Renanthera bella* yang hanya ditemui di Sabah sahaja. Pengurangan bilangan spesies orkid ini berlaku akibat usaha-usaha pembukaan hutan yang giat dijalankan untuk tujuan pembangunan.



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SARAWAK

Usaha pemuliharaan boleh dilakukan dengan cara mengumpulkan spesies di pusat pengumpulan, mengawal pembukaan hutan daripada berlaku berterusan ataupun dengan menggunakan teknik mikropropagasi. Teknik mikropropagasi khususnya teknik kultur tisu membolehkan spesies ini dibiakkan dengan banyak menggunakan pelbagai eksplan, disimpan dalam satu tempoh masa tertentu secara *in vitro* dan diinduksikan morfogenesisisnya kebentuk tumbuhan yang lengkap apabila diperlukan. Morel (1960), adalah orang yang mula-mula berjaya menghasilkan orkid *Cymbidium* yang bebas daripada jangkitan virus dengan kaedah kultur tisu. Beliau mengkultur pucuk yang bersaiz 0.1mm dalam medium Knudson C yang dicampurkan dengan agar sebagai bahan pemejal. Teknik ini kemudiannya digunakan secara meluas untuk tujuan pembiakbakaan klon-klon orkid seluruh dunia. Lebih daripada 4,000,000 pokok orkid boleh diperolehi dalam tempoh setahun daripada satu tunas yang dikultur (Karim & Haris, 1989)

Permintaan yang tinggi terhadap orkid bagi tujuan kajian saintifik mahupun tanaman hiasan menyebabkan teknik propagasi yang biasa dilakukan untuk penanaman orkid tidak dapat menampung semua permintaan-permintaan ini. Ini disebabkan beberapa faktor seperti kekurangan kawasan penanaman (Altman, 1998) dan organisma perosak yang menghalang penghasilan orkid dalam kuantiti yang banyak. Selain masa yang diperlukan bagi kaedah propagasi konvensional ini adalah lebih lama, masalah tenaga buruh juga menjadi penghalang utama dimana kos pembayaran gaji buruh adalah tinggi.



Kaedah percambahan *in vitro* dapat membantu penghasilan orkid yang berkualiti tinggi di samping mengurangkan risiko serangan mikroorganisma. Selain itu, ia juga merupakan salah satu cara yang dapat diaplikasikan bagi meningkatkan hasil tanaman dengan lebih cekap (Altman, 1998). Kaedah ini tidak memerlukan tenaga buruh yang ramai serta kawasan pengkulturan adalah kecil berbanding kawasan penanaman secara konvensional. Eksplan yang digunakan bagi percambahan *in vitro* ialah biji benih orkid yang telah disteril diselenggarakan dalam keadaan yang aseptik agar sebarang jangkitan mikroorganisma dapat dielakkan. Secara semulajadinya, orkid mengambil masa kira-kira 3 hingga 5 tahun untuk membesar bermula daripada biji benih sehingga keperingkat penghasilan bunga (Bhojwani & Razdan, 1983). Kebanyakan orkid memerlukan fungi simbiotik bagi membolehkan ia terus bercambah dalam keadaan semulajadi. Dengan kaedah percambahan *in vitro*, biji benih orkid dapat dicambahkan tanpa kehadiran kulat simbiotik dengan bantuan komposisi mineral di dalam media kultur percambahan, hormon dan pengawalatur pertumbuhan serta komplek aditif.

Kajian ini dijalankan untuk mengenalpasti media yang lebih cekap dalam merangsang proses percambahan biji benih orkid *R. bella* dan juga kepekatan hormon serta komplek aditif yang sesuai untuk pertumbuhan dan perkembangan protokom orkid *R.bella* secara *in vitro*. Spesies orkid *R. bella* adalah diantara spesies orkid endemik Borneo yang populasinya semakin berkurangan. Kajian propagasi keatas species *R. Bella* ini sangat terhad dan oleh itu kajian ini dijalankan sebagai satu usaha untuk memuliharanya.

Diantara objektif kajian ini adalah ;

- a) Mengkaji kesan vitamin MS terhadap proses percambahan biji benih *R.bella* dalam media percambahan XER.
- b) Mengkaji kesan hormon BAP dan air kelapa keatas pertumbuhan dan perkembangan protokom orkid *R.bella*.

BAB 2

ULASAN PERPUSTAKAAN

2.1 Orkid genus *Renanthera*

Perkataan *Renanthera* berasal daripada perkataan greek iaitu *renes* yang memberi maksud hati dan *anthera* yang bermaksud anther. Istilah ini timbul daripada bentuk anter pada orkid *Renanthera* yang bentuknya seakan-akan bentuk hati. Genus ini merangkumi lebih kurang 15 spesies dan bersifat epifit. Ia terdapat di Burma, Semenanjung Malaysia, Borneo, Indonesia dan Papua New Guinea termasuklah pulau-pulau pasifik (Hodgson *et al.*, 1991).

Batang orkid daripada genus ini boleh tumbuh sepanjang 4.5 m atau lebih dan menjadi seakan-akan berkayu apabila telah tua usianya. Bunga bagi orkid genus ini sangat menyerlah dan mempunyai warna yang sangat menarik perhatian. Kebanyakan bunga spesies orkid daripada genus ini berwarna merah dan kuning yang mempunyai panjang pepenjurunya antara 6-9 cm. Serpal dorsal dan petal adalah sama dan mempunyai struktur yang agak mengembang. Sepal lateral adalah segmen yang terbesar bagi orkid genus ini berbanding segmen yang lain. Bahagian labelum pula berbentuk cuping yang bercabang tiga dimana cuping lateral mempunyai struktur menegak ke atas dan cuping di tengah berbentuk reflek (Wood *et al.*, 1993).

Orkid daripada genus ini hidup di kawasan yang lembap serta mempunyai cahaya separa. Spesies orkid daripada genus ini seperti yang terdapat di Filipina iaitu *Renanthera monachica* mengalami proses persenyawaaan setiap bulan sepanjang tahun.

2.2 *Renanthera bella*

R. bella merupakan satu spesies daripada genus *Renanthera* yang agak baru bagi pengkaji orkid. Ia mula diperkenalkan pada tahun 1981 dan disenaraikan antara orkid yang tercantik didunia. *R. bella* merupakan spesies orkid yang endemik di kepulauan Borneo terutamanya di kawasan Sabah. *R. bella* juga merupakan orkid dari jenis yang bersifat epifit dan telah dijumpai epifit kepada *Gymnostoma sumatrana*. *R. bella* ini hidup di kawasan pergunungan Sabah yang beraltitud antara 400 hingga 1200 m. Spesies ini tumbuh di kawasan-kawasan lembap dan memerlukan teduhan serta cahaya separa. Ia mempunyai akar arial sepanjang 38 x 0.3-0.4 cm dimana terhasil



pada setiap nodul dan mempunyai batang sepanjang 20-50 cm. Bunga *R.bella* adalah berwarna merah keorenan dan mempunyai bintik-bintik yang berwarna gelap. Bentuk bunga *R. bella* ini adalah sangat unik dan berbeza daripada spesies orkid yang lain dimana sepal lateralnya rapat antara satu sama lain (Menzies, 1991). Bahagian hujung yang berbentuk seakan-akan bebibir atau labelum bersaiz lebih kecil berbanding bahagian-bahagian yang lain.

R. bella ini telah banyak dilakukan kacukan dengan spesies dari genus yang berlainan seperti *Arachnis* dan *Palaenopsis*. Kacukan hibrid ini memberi satu impak yang berguna dimana hibrid ini mengasilkan warna dan bintik-bintik yang cantik pada bunganya. Hibrid-hibrid ini mendapat permintaan yang tinggi di kalangan ahli hortikultur dan berpotensi menjadi tanaman hiasan yang mempunyai nilai yang tinggi dalam industri tanaman hiasan serta diminati ramai. Setiap bahagian yang terdapat pada *R. bella* boleh digunakan sebagai eksplan dalam mikropropagasi orkid namun begitu bahagian daun jarang dikulturkan kerana kadar kejayaan pengkulturannya adalah sangat rendah.



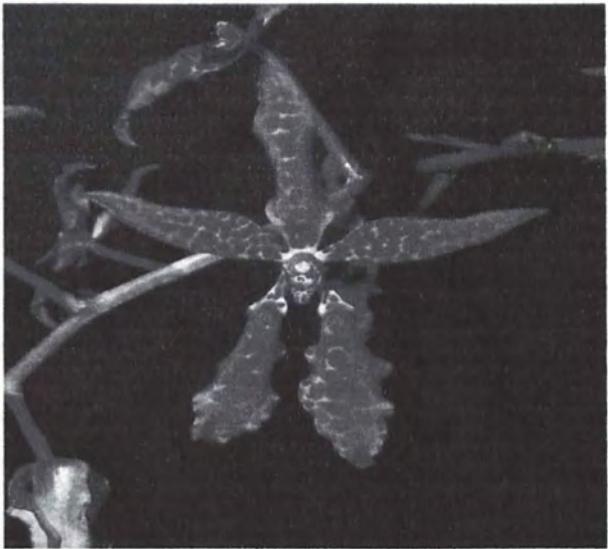


Foto 2.1 Menunjukkan bunga orkid *R. bella* yang terdapat di kawasan tropika.

2.3 Percambahan biji benih orkid

Ahli fisiologi biji benih menerangkan percambahan sebagai suatu proses dimana bermulanya penyerapan air dan berakhir apabila radikal iaitu akar embrionik mula memanjang atau terbit daripada testa (Salisbury, 1991). Terdapat saintis yang menganggap bahawa proses percambahan lengkap apabila kesemua makanan simpanan yang tersimpan di dalam endosperma ataupun kotiledon habis digunakan dan anak pokok dapat membuat makanannya sendiri untuk terus hidup (Bradder, 1988).

Bagi orkid, percambahan berlaku apabila terdapat kehadiran kulat simbiotik seperti mikorrhiza. Biji benih orkid sukar untuk bercambah tanpa kehadiran kulat simbiotik ini. Fenomena ini mengkelaskan orkid kepada dua jenis percambahan iaitu percambahan simbiotik dan percambahan asimbiotik. Noel Bernard, adalah saintis yang terawal melakukan percambahan biji benih orkid secara tabii dimana proses percambahan ini bergantung kepada kehadiran kulat tertentu. Kewujudan simbiosis antara orkid dan kulat telah dibuktikan oleh Hans Bergeff yang telah berjaya memencarkan kulat daripada sel-sel akar orkid. Semasa proses percambahan, biji benih orkid yang sangat halus dan seakan-akan habuk membesar dari segi saiz dan terus memecahkan lapisan luar biji benih. Embrio akan terus membesar membentuk jasad berbentuk kon yang dikenali sebagai protokom (Arditti, 1977).

Dalam keadaan semulajadi, protokom ini akan terus kekal dan tidak berubah sehingga terdapat kehadiran kulat endofitik tertentu. Selepas dijangkiti oleh kulat endofitik ini, pucuk dan daun primordia pertama akan terhasil pada apeks yang

terdapat pada protokom dan diikuti dengan pertumbuhan akar. Kulat endofitik berkebolehan menukar struktur gula iaitu hidrolisi gula sukrosa seperti yang terdapat didalam cecair kultur. Oleh itu ia dipercayai dapat menambah tekanan osmotik didalam dan luar sel yang membolehkan proses imbibisasi atau penyerapan air berlaku lalu biji benih dapat terus bercambah (Arditti, 1967).

Percambahan biji benih orkid secara asimbiotik banyak dilakukan ke atas spesies orkid tropika kerana ia lebih mudah bercambah berbanding orkid dari kawasan temperat. Lengai atau kapsul bagi orkid epifit tropika juga boleh mengandungi lebih daripada sejuta biji benih menyebabkan peratusan percambahan yang tinggi berbanding orkid kawasan temperat (Menzies, 1991). Namun begitu, percambahan orkid secara asimbiotik adalah lebih kompleks dan sukar kerana ia memerlukan konsentrasi mineral dan gula sukrosa yang sesuai untuk percambahan orkid tanpa perantaraan kulat simbiotik. Keperluan mineral adalah berbeza bagi setiap spesies orkid dan media percambahan spesifik diperlukan bagi beberapa jenis orkid yang sukar untuk bercambah.

2.4 Teknik kultur tisu orkid

Morel(1960) merupakan saintis yang pertama melakukan kultur tisu orkid dimana beliau telah mengkultur pucuk daripada orkid *Cymbidium* di atas media kultur. Hasilnya, Morel telah menghasilkan beratus-ratus protokom dalam masa beberapa bulan. Sejak daripada kejayaan Morel mengkultur orkid melalui teknik kultur tisu, kaedah ini menjadi semakin popular dan diaplikasikan kepada berbagai-bagai spesies dan hibrid orkid (Arditti, 1967). Menurut Morel, proses kultur tisu orkid melibatkan

proses dimana penghasilan protokom daripada tisu orkid, penggandaan protokom dan proses pembezaan protokom yang akhirnya menghasilkan dan membentuk anak pokok yang sempurna.

Media kultur yang mengandungi mineral tertentu dan lengkap digunakan bagi menggantikan peranan kulat simbiotik terutamanya dalam proses percambahan *in vitro*. Aspek-aspek yang terlibat dalam menentukan kejayaan kultur tisu orkid adalah komposisi dan keadaan media kultur, sumber karbon, jenis eksplan yang digunakan, kandungan pengatur pertumbuhan, ekstrak tabii dan keadaan fizik kultur sesuatu spesies yang dikaji (Karim & Haris, 1989). Teknik kultur tisu dilakukan dalam keadaan persekitaran yang aseptik bagi mengelakkan eksplan daripada dijangkiti mikroorganisma.

Melalui kaedah kultur tisu, orkid dapat dihasilkan dalam kuantiti yang banyak dan masa yang diperlukan adalah singkat. Orkid yang berkualiti dan bebas daripada sebarang penyakit adalah antara salah satu kelebihan teknik ini dan menyebabkan ia dilakukan secara meluas ke seluruh dunia. Pelbagai hibrid yang berkualiti dapat dihasilkan dan proses pemeliharaan spesies yang kian terancam dan sukar diperolehi dapat dilakukan. Teknik kultur tisu orkid yang semakin berkembang ini berdasarkan kepada sifat sel tumbuhan yang boleh membentuk satu tumbuhan yang lengkap daripada satu sel tunggal. Sifat ini dikenali sebagai sifat totipotensi. Totipotensi adalah kebolehan sel tumbuhan untuk menghasilkan satu tumbuhan atau organisme lengkap daripada satu sel tunggal (Bhojwani dan Radzan, 1983). Selain daripada biji benih orkid, bahagian tumbuhan orkid yang lain juga boleh digunakan sebagai eksplan untuk proses mikropropagasi seperti tunas, pucuk, pseudobulb dan sebagainya.



RUJUKAN

Altman, A., 1998. *Agricultural Biotechnology*. Marcel Dekker, New York.

Arditti, J., 1966. The effect of niacin, adenine, ribose and niacinamide coenzyme on germinating orchid seeds and young seedling. Amer. *Orchid Society Bulletin*. Vol 35, 892-898.

Arditti, J., 1977. *Clonal Propagation of Orchids by Means of Tissues Culture. Reviews and perspective*. Ed. 1. Cornell University Press, Ithica.

Arditti, J., 1967. Factors Affecting The Germination of Orchids Seeds. *Botanical Reviews*. Vol 33, 1-97.

Arditti, J. & Ernst, R., 1992. *Micropropagation of Orchids*. A Wiley Interscience Publication, Canada.

Arditti, J. & Ernst, R., 1976. *Micropropagation of Orchids*. A Wiley Interscience Publication, New Yorke.

Arditti, J., Michaud, J.D. & Healey, P.L., 1979. Morphometry of Orchid seeds. *American Journal of Botany*. Vol 66, 1128-1137.

- Arditti, J. & Harrison, C.R., 1978. Physiological Changes During the Germination of *Cattleya Aurantiaca* (Orchidaceae). *Bot. Gaz* Vol 139, 180-189.
- Bajaj, Y.P.S, 1991. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 17 High-Tech and Micropagation I*. Springer Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Buyun, L., Lavrentyeva, A., Kovalska, L. & Ivannikov, R., 2004. *In vitro germination of seed of some rare tropical orchids*. *Acta universitatis Latviensis, Biology*. Vol 676, 159-162.
- Bhojwani, S.S. dan Razdan, M.K., 1983. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Elsevier Science Publishers B.V., Netherlands.
- Bonga, J.M. dan Aderkas, P.V., 1992. *In Vitro Culture of Trees*. Kluwer Academic Publisher, Netherlands.
- Bradier, J.W., 1994. *Seed Dormancy and Germination*. The Ipswich Book Company Ltd., London.
- Campbell, M.K. dan Farrell, S.O., 2003. *Biochemistry*. Thomson Learning, United State of America.

- Chen, Y., Lin, S., Duguid, S., Dribnenki, P. dan Kenaschuk, 2003. Effect of sucrose concentration on elongation of shoots from flax anther culture. . *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72, 181-183.
- Chang , C., Chen, Y.C. & Yen, H.F., 2005. Protocorm or rhizome? The morphology of seed germination in *Cymbidium dayanum* Reichb. *Bot. Bull. Acad. Sin.* Vol 46, 71-74.
- De Pauw, M.A., Remphrey, W.R. & Palmer, C.E., 1996. The Cytokinin Preference for *in vitro* Germination and Protocorm Growth of *Cypripedium candidum*. *Annals of Botany*. Vol 75, 267-275.
- Dodds, J.D. dan Roberts, L.W., 1995. *Experiments in Plant Tissue Culture*. Ed. Ke-3. Cambridge University Press.
- Ernst, R., 1994. Effect of Thidiazuron on *in vitro* Propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* (Orchidaceae). *Plant cell , tissue culture and organ culture*, 39.
- Ernst, R., 1975. Studies in a symbiotic culture of orchids. *Amer. Orc. Bull.* Vol 44, 12-18.

Faria, R.T., Rodriges, F.N., Oliveira, V.R., & Muller, C., 2004. *In vitro Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentration. *Horticultura Brasileira*. Brasilia, Vol 22, 780-783.

Goh, C.J., Rao, A.N. & Loh, C.S., 1976. Clonal Propagation of Aranda hybrids through shoot meristem culture. *Singapore Natl. Acad. Science*. 27-35.

Gamborg, O.L. dan Philips, G.L., 1995. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.

Hdider, C. dan Desjardins, Y., 1994. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of in vitro cultured strawberry plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36, 27-33.

Hogson, M., Peine, R. & Anderson, N., 1991. *Letts Guide to Orchids of the world. Orchids*. Charles Letts & Co. Ltd., London.

Ibraki, Y., Matsushima, R. dan Kurata, K., 2000. Analysis of morphological changes in carrot somatic embryogenesis by serial observation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61, 9-14.

Karim, A. & Haris, H., 1989. Perambatan Orkid Melalui Kultur tisu. *Penyelidikan sains Hayat*, 151-159.

- Kumar, U., 2003. *Methods in Plant Tissue Culture*. Agrobios. India.
- Kumar, H.G.A. dan Murthy, H.N., 2004. Effect of sugars and amino acids on androgenesis of *Cucumis sativus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78, 201-208.
- Menzies, D., 1991. *Orchids*. Bison Books Ltd., London.
- Nagaraju, V. & Mani, S.K., 2005. Rapid *In vitro* Propagation of Orchids Zygopetalum intermedium, *Plant Biochemistry & Biotechnology*. Vol 14, 27-32.
- Payne, G.F., Bringi, V., Prince, C.L. dan Shuler M.L., 1992. *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid System*. John Wiley and Sons. Canada.
- Raghavendra, A.S., 1998. *Photosynthesis A Comprehensive Treatise*. Cambridge University Press, United Kingdom.
- Rao, A.N., 1977. Tissue culture in the orchids industry in Applied and Fundamental Aspect of Plant Cell, Tissues and Organ Culture. *Springer Verlag*. 44-67.
- Rao, P.S. dan Mathews, V.H., 1980. *In vitro* multiplication of *Vanda* hybrids through tissues culture technique. *Plant Science Letters*. Vol 17, 383-389.