

PERCAMBahan BIJI BENIH DAN PROPAGASI ORKID *PHALAENOPSIS GIGANTEA* (TELINGA GAJAH) SECARA *IN VITRO*

ROSMAH BINTI MURDAD

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

**TESIS INI DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI
SEBAHAGIAN DARIPADA SYARAT
MEMPEROLEH IJAZAH SARJANA SAINS**

**SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH
2008**

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS

JUDUL : PERCAMBahan BIJI BENIH DAN PROPAGASI ORKID
PHALAENOPSIS GIGANTEA (TELINGA GAJAH)
SECARA *IN VITRO*

IJAZAH : SARJANA SAINS (BIOTEKNOLOGI TUMBUHAN)

SESI PENGAJIAN : 2003-2008

Saya ROSMAH BINTI MURDAD mengaku membenarkan tesis sarjana ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:

1. Tesis adalah hakmilik Universiti Malaysia Sabah
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian saya.
3. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi
4. TIDAK TERHAD



PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH
Disahkan oleh
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

ANITA BINTI ARSAD
PUSTAKAWAN KANAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

(Penulis: ROSMAH BINTI MURDAD)

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

(Penyelia: Prof. Madya Datin Dr. Hjh.
Mariam Abd Latif)

(Ko-Penyelia: Dr. Zaleha Abd. Aziz)

Tarikh: 2 Julai 2008

Tarikh: 8 JULAI 2008

PENGAKUAN

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

1 Februari 2008



Rosmah Binti Murdad
PS03-001-015



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGESAHAN

TAJUK : PERCAMBABAAN BIJI BENIH DAN PROPAGASI ORKID
PHALAENOPSIS GIGANTEA (TELINGA GAJAH) SECARA *IN VITRO*

IJAZAH : SARJANA SAINS

TARIKH VIVA : 1 FEBRUARI 2008

DISAHKAN OLEH

1. PENYELIA

Prof. Madya. Datin. Dr. Hjh. Mariam Abd. Latip

.....
Tandatangan

2. PENYELIA BERSAMA

Dr. Zaleha A. Aziz


.....
Tandatangan

3. PEMERIKSA DALAMAN

Prof. Madya. Dr. Jualang Azlan Gansau

.....
Tandatangan

4. DEKAN

Prof. Dr. Mohd. Harun Abdullah

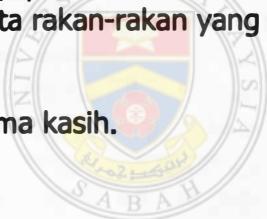
.....
Tandatangan

PENGHARGAAN

Bismillahirahmanirahim,

Alhamdullilah, bersyukur saya ke hadrat Ilahi kerana dengan izinya disertasi ini dapat disiapkan dengan jayanya. Sepanjang menyiapkan penulisan ini, banyak masa dan tenaga telah dicurahkan dan saya berasa amat berbangga kerana dapat menyiapkannya. Disebalik pencapaian ini saya ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada penyelia saya Prof. Madya Datin Dr. Hjh. Mariam Abd Latif dan Dr. Zaleha A. Aziz diatas segala bimbingan dan tunjuk ajar yang diberikan. Mereka lah yang banyak membantu dan mencerahkan idea yang tidak putus-putus dalam menyiapkan tesis ini. Selain itu, sekalung ucapan terima kasih diberi kepada kedua ibu bapa saya yang telah banyak memberi dorongan, menyuntik semangat dan memahami saya sepanjang menyiapkan penulisan ini. Penghargaan ini juga didedikasikan kepada suami tercinta, Samsudin Hj. Bennu di atas sokongan moral dan bantuan teknikal sepanjang tempoh menyiapkan penulisan ini. Tidak dilupakan pembantu makmal (Cik Rokiah Hj. Ibrahim, Christina Kugin dan Doren Johan), pelajar sarjana di makmal tisu kultur (Abidah Abdullah, Ainul Mardziah Mohamed, Hartinie Marbawi, Roslina Jawan, Devina David dan Cyril Misong) di atas segala tunjuk ajar, pertukaran idea dan sokongan moral sepanjang menjalankan kerja makmal serta rakan-rakan yang sentiasa berada di sisi di kala suka dan duka.

Sekian, terima kasih.



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

ABSTRAK

PERCAMBahan BIJI BENIH DAN PROPAGASI ORKID *Phalaenopsis gigantea* (TELINGA GAJAH) SECARA *IN VITRO*

Percambahan biji benih dan propagasi *in vitro* orkid endemik Borneo, *Phalaenopsis gigantea* telah dikaji. Kajian meliputi kesan terhadap faktor seperti kematangan eksplan, perlakuan terhadap eksplan, media asas (KC, $\frac{1}{2}$ MS, XER dan NDM) pengawalatur pertumbuhan (NAA dan BAP), kompleks tabii iaitu air kelapa (AK), jus tomato (JT), homogenat ubi kentang (HUK) dan homogenat pisang (HP), arang teraktif (AT) dan sumber karbon (sukrosa, fruktosa dan glukosa) terhadap percambahan biji benih, penggandaan protokorm serta pertumbuhan dan perkembangan protokorm yang mempengaruhi pembentukan anak benih. Hasil kajian ke atas percambahan biji benih mendapati bahawa lebih kurang 90% biji benih dari kapsul 170 hari selepas polinasi (HSP) bercambah, manakala hanya lebih kurang 40% percambahan pada biji benih dari kapsul 130 HSP dan tiada percambahan pada biji benih 100 HSP selepas 70 hari tempoh pengkulturan. Penggunaan media asas NDM dan XER dapat meningkatkan kadar percambahan biji benih berbanding dengan media Knudson C dan $\frac{1}{2}$ MS. Selepas 70 hari tempoh pengkulturan, sebanyak 92.62% dan 95.66% percambahan dicerap masing-masing dalam media asas NDM dan XER. Sementara itu, pada media KC dan $\frac{1}{2}$ MS masing-masing mencatatkan sebanyak 30.08% dan 88.09%. Penambahan HUK dapat meningkatkan kadar percambahan (91.38-100%) tanpa mengira kepekatan (10, 15 dan 20%) dalam media NDM dan XER. Manakala, penambahan HP dalam media asas XER menunjukkan kesan perencutan terhadap percambahan biji benih. Kajian ke atas penggandaan protokorm pula mendapati bahawa media asas NDM lebih baik berbanding dengan XER. Penambahan 0.05 mgL^{-1} NAA atau 1 mgL^{-1} BAP bersendirian dan kombinasi 0.5 mgL^{-1} NAA + 1 mgL^{-1} BAP memberi hasil yang baik ke atas protokorm yang mengganda (sehingga 60.80%) selepas 98 hari tempoh pengkulturan. Hasil kajian juga menunjukkan bahawa protokorm yang berusia 50 hari selepas pengkulturan (HSK) dalam media percambahan adalah peringkat kematangan yang optima untuk penggandaan protokorm, manakala protokorm 100 dan 150 HSK lebih cenderung membentuk pucuk, daun dan akar. Penambahan AK pada kepekatan 10-15% (v/v) dan AT 2.0 atau 2.5 gL^{-1} dalam media dapat meningkatkan penggandaan dan kadar mandiri protokorm yang dipotong dan tidak dipotong pada bahagian dasarnya. Dalam semua media yang digunakan, protokorm yang dipotong dasarnya menunjukkan peratus penggandaan yang terbaik (sehingga 56.82%) dan bilangan protokorm baru yang berhasil (sehingga 70 per protokorm) selepas 112 hari tempoh pengkulturan. Kajian ke atas pertumbuhan dan perkembangan protokorm *P. gigantea* telah dijalankan menggunakan media yang ditambah dengan 0.11 mol gula dengan kombinasi 0, 10, 15 dan 20% (v/v) HUK. Selepas 150 hari tempoh pengkulturan, protokorm bertumbuh dengan baik dalam media yang mengandungi gula atau HUK secara bersendirian. Protokorm yang dikultur dalam media yang mengandungi fruktosa memberikan indeks pertumbuhan (IP) tertinggi (537.4) berbanding glukosa atau sukrosa. Media yang mengandungi HUK sahaja memberikan IP sebanyak 466.60 - 494.4. Sebaliknya, media yang mengandungi kombinasi gula dan HUK memberikan IP yang sangat rendah iaitu 310.0 - 397.0. Sistem yang dikaji untuk percambahan biji benih dan propagasi *in vitro* *P. gigantea* merintis pengetahuan kepada kajian yang lebih luas dan mendalam ke atas spesies orkid ini.

ABSTRACT

The seed germination and in vitro propagation of Borneo endemic orchid, *Phalaenopsis gigantea* was studied. The study involved various factors such as explant maturity, explant treated (trimmed bases protocorms), basal media (KC, $\frac{1}{2}$ MS, XER and NDM), plant growth regulators (NAA and BAP), complex additives (coconut water, tomato juice, potato homogenate and banana homogenate), activated charcoal (AC) and carbon source (sucrose, fructose and glucose) on seed germination, protocorm proliferation and growth and development of the seedling. The results from the seed germination study showed that stage of seed maturity and types of basal media had significant effects on seed germination of *P. gigantea*. As much as 90% seed from the 170 days after pollination (DAP) capsule germinated however, only 40% and 0% of germination was achieved for seeds from 130 and 100 DAP capsules, respectively after 70 days of culture. The use of NDM and XER basal media improved seed germination compared to KC and $\frac{1}{2}$ MS media. Up to 92.62% and 95.66% of germination was observed after 70 days of culture on NDM and XER basal media, respectively. Whereas, KC and $\frac{1}{2}$ MS media showed 30.08% and 88.09% germination, respectively. The addition of potato homogenate (PH) at various concentrations (10, 15 and 20%, w/v) enhanced of germination (91.38-100%) on NDM and XER basal media. However, the addition of banana homogenate (BH) in XER basal media showed inhibitory effect on seed germination. The NDM basal media was better than XER at causing protocorm proliferation. Supplementation with 0.05 mgL^{-1} NAA or 1.0 mgL^{-1} BAP alone and $0.5 \text{ mgL}^{-1} + 1.0 \text{ mgL}^{-1}$ BAP combination was excellent as it result in. That is up to 60.80% protocorm proliferation after 98 days of culture. Results also showed that 50 days after cultured (DAC) of protocorm on germination media was the most suitable stage for protocorm proliferation, whereas 100 and 150 DAI protocorm tend to form shoot, leaves and root. The addition of coconut water (10-15%, v/v) and AC (2.0 or 2.5 gL^{-1}) enhanced protocorm proliferation and survival on both trimmed and untrimmed protocorms. When cultured on all media, trimmed protocorms showed the greater percentage of proliferation (up to 56.82%) and produced a higher number of new protocorms (up to 70 per protocorm) after 112 days of culture. Media supplemented with 0.11moles sugar (fructose, sucrose or glucose) in combination with 0, 10, 15, 20 or 25% (v/v) PH was used to study growth and development of *P. gigantea* protocorms. After 150 days of culture, protocorms that were cultured on media containing either sugar or potato extract alone grew very well. Protocorms cultured on medium with fructose showed a higher growth index value (537.4) than those on glucose and sucrose (495.0 and 493.3 respectively). The growth index was 466.6 to 494.4 on media containing any concentration of potato extract without sugar. In contrast, on medium containing both sugar and potato extract, the growth index values were much lower (310.0 to 397.0). The expected results on seed germination and in vitro propagation for *P. gigantea* using various culture techniques provide some knowledge might encourage a wide of investigation on this species.

SENARAI KANDUNGAN

	HALAMAN
PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
SENARAI KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	xi
SENARAI RAJAH	xiii
SENARAI SIMBOL	xv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
BAB 2 ULASAN LITERATUR	4
2.1 Genus <i>Phalaenopsis</i>	4
2.2 <i>Phalaenopsis gigantea</i>	5
2.3 Propagasi Orkid	6
2.3.1 Propagasi Vegetatif Secara <i>In vivo</i>	6
2.3.2 Percambahan Biji Benih Secara <i>In vitro</i>	7
2.3.3 Propagasi Orkid Secara <i>In vitro</i>	9
2.4 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Kejayaan Teknik Kultur Tisu	11
2.4.1 Kesan Media Asas	11
2.4.2 Kesan Penambahan Kompleks Tabii	12
2.4.3 Kesan Eksplan	16
2.4.4 Kesan Gula Sebagai Sumber Karbon	19
2.4.5 Penggunaan Arang Teraktif	21
2.5 Pengawalatur Pertumbuhan (Hormon) dalam Kultur Tisu	22
2.5.1 Auksin	22
2.5.2 Sitokinin	22
2.5.3 Peranan Hormon Dalam Kultur Tisu Orkid	23

BAB 3 PERCAMBAHAN BIJI BENIH	26
3.1 Pengenalan	26
3.2 Bahan dan Kaedah	27
3.2.1 Biji benih <i>Phalaenopsis gigantea</i>	27
3.2.2 Pensterilan Biji Benih	27
3.2.3 Pengkulturan	28
3.2.4 Cerapan Dan Analisis Data	30
3.3 Keputusan	31
3.3.1 Kesan Kematangan Biji Benih Ke Atas Percambahan Biji Benih <i>P. gigantea</i>	31
3.3.2 Kesan Media Asas Ke Atas Percambahan Biji Benih <i>P. gigantea</i>	35
3.3.3 Kesan Interaksi Kompleks Tabii Ke Atas Percambahan Biji Benih <i>P. gigantea</i>	39
3.4 Perbincangan	46
3.4.1 Kesan Kematangan Biji Benih (Umur Kapsul)	46
3.4.2 Kesan Media Asas	49
3.4.3 Kesan Interaksi Kompleks Tabii Dengan Media Asas	52
3.5 Kesimpulan	56
BAB 4 PENGGANDAAN PROTOKORM	58
4.1 Pengenalan	58
4.2 Bahan Dan Kaedah	59
4.2.1 Sumber Eksplan	59
4.2.2 Pengkulturan	59
4.2.3 Kesan Media Asas	59
4.2.4 kesan Umum Protokorm	59
4.2.5 Kesan Hormon <i>Napthalenaacetic Acid (NAA)</i> dan <i>Benzylaminopurine (BAP)</i>	60
4.2.6 Kesan Air Kelapa Dan Arang Teraktif Pada Protokorm Yang Dipotong Dasarnya	60
4.2.7 Cerapan Dan Analisis Data	61
4.3 Keputusan	61
4.3.1 Kesan Media Asas Ke Atas Penggandaan Protokorm	61

4.3.2	Kesan Umur Protokorm Ke Atas Penggandaan Protokorm	66
4.3.3	Kesan Hormon <i>Napthalenaacetic Acid</i> (NAA) dan <i>Benzylaminopurine</i> (BAP) Ke Atas Penggandaan Protokorm	71
4.3.4	Kesan Air Kelapa Dan Arang Teraktif Pada Protokorm Yang Dipotong Dasarnya Dan Yang Tidak Dipotong Bahagian Dasarnya	77
4.4	Perbincangan	85
4.4.1	Kesan Media Asas	85
4.4.2	Kesan Umur Protokorm	88
4.4.3	Kesan Hormon <i>Napthalenaacetic Acid</i> (NAA) dan <i>Benzylaminopurine</i> (BAP)	89
4.4.4	Kesan Air Kelapa Dan Arang Teraktif Pada Protokorm Yang Dipotong Dasarnya	90
4.5	Kesimpulan	93
BAB 5	PERTUMBUHAN DAN PERKEMBANGAN PROTOKORM	95
5.1	Pengenalan	95
5.2	Bahan dan Kaedah	96
5.2.1	Sumber Eksplan	96
5.2.2	Penyediaan Media	96
5.2.3	Pengkulturan	96
5.2.4	Cerapan Dan Analisis Data	97
5.3	Keputusan	99
5.3.1	Pertumbuhan Dan Perkembangan Protokorm <i>P. gigantea</i>	99
5.3.2	Kesan Gula (Sumber Karbon) Dan Homogenat Ubi Kentang Terhadapa Purata IP Protokorm <i>P. gigantea</i>	100
5.3.3	Kesan Gula (Sumber Karbon) Dan Homogenat Ubi Kentang Terhadap Pembentukkan Daun	105
5.3.4	Kesan Gula (Sumber Karbon) Dan Homogenat Ubi Kentang Terhadap Pembentukkan Akar	108
5.3.5	Kesan Gula (Sumber Karbon) Dan Homogenat Ubi Kentang Terhadap Pembentukkan Proliferasi Dan Kematian Protokorm	111
5.4	Perbincangan	112
5.5	Kesimpulan	115

BAB 6 PERBINCANGAN DAN KESIMPULAN UMUM

117

RUJUKAN

124

LAMPIRAN

153



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

SENARAI JADUAL

HALAMAN

Jadual 2.1	Hormon yang biasa digunakan dalam kultur tisu orkid, adaptasi daripada Arditti & Ernst (1993)	25
Jadual 3.1	Rawatan untuk menguji kesan kematangan biji benih (umur kapsul) terhadap percambahan biji benih <i>P. gigantea</i>	28
Jadual 3.2	Rawatan untuk menguji kesan kompleks tabii terhadap percambahan biji benih <i>P. gigantea</i>	29
Jadual 3.3	Kesan kematangan biji benih (umur kapsul) terhadap peratus percambahan biji benih <i>P. gigantea</i>	32
Jadual 3.4	Kesan media asas terhadap percambahan biji benih <i>P. gigantea</i>	36
Jadual 3.5	Kesan interaksi penggunaan kompleks tabii dengan media asas terhadap peratus percambahan biji benih <i>P. gigantea</i> selama 90 hari pengkulturan	40
Jadual 4.1	Kesan media asas ke atas penggandaan protokorm <i>P. gigantea</i> sepanjang 98 hari selepas pengkulturan	63
Jadual 4.2	Kesan umur protokorm terhadap penggandaan protokom <i>P. gigantea</i> selama 98 hari pengkulturan	68
Jadual 4.3	Kesan hormon terhadap penggandaan protokom <i>P. gigantea</i>	72
Jadual 4.4	Kesan hormon NAA dan BAP ke atas penggandaan protokom <i>P. gigantea</i> 98 hari selepas tempoh pengkulturan	75
Jadual 4.5	Kesan air kelapa dan arang teraktif ke atas protokorm <i>P. gigantea</i> selepas 112 hari pengkulturan	83
Jadual 5.1	Rawatan menggunakan tiga jenis gula dan penggunaan homogenat ubi kentang ke atas pertumbuhan dan perkembangan anak benih <i>P. gigantea</i>	97
Jadual 5.2	Contoh pengiraan indeks pertumbuhan <i>P. gigantea</i> pada hari ke-90 selepas pengkulturan dalam media pertumbuhan	99
Jadual 5.3	Kesan gula (sumber karbon) dan penggunaan homogenat ubi kentang ke atas pembentukan daun pada protokorm <i>P. gigantea</i>	107

Jadual 5.4	Kesan gula (sumber karbon) dan penggunaan homogenat ubi kentang ke atas saiz daun anak benih <i>P. gigantea</i> 150 hari selepas pengkulturan	108
Jadual 5.5	Kesan gula (sumber karbon) dan penggunaan homogenat ubi kentang ke atas pembentukkan akar pada protokorm <i>P. gigantea</i> .	110
Jadual 5.6	Kesan gula (sumber karbon) dan penggunaan homogenat ubi kentang ke atas panjang akar anak benih <i>P. gigantea</i> 150 hari selepas pengkulturan	111
Jadual 5.7	Kesan gula (sumber karbon) dan penggunaan homogenat ubi kentang ke atas protokorm proliferasi dan kadar kematian protokorm <i>P. gigantea</i> 150 hari selepas pengkulturan	112



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

SENARAI RAJAH

HALAMAN

Rajah 2.1	Phalaenopsis <i>gigantea</i> yang melekat pada batang pokok	6
Rajah 2.2	Kesan kombinasi auksin dan sitokinin	24
Rajah 3.1	Kapsul dan biji benih <i>P.gigantea</i>	27
Rajah 3.2	Kawasan persampelan pada piring Petri	30
Rajah 3.3	Indeks pertumbuhan <i>Cattleya sp.</i> (Arditti, 1967)	31
Rajah 3.4	Kesan kematangan biji benih ke atas percambahan <i>P. gigantea</i> 10 dan 110 hari selepas tempoh pengkulturan	33
Rajah 3.5	Kesan media asas ke atas percambahan biji benih <i>P. gigantea</i> sepanjang 150 hari tempoh pengkulturan	37
Rajah 3.6	Kesan interaksi penggunaan kompleks tabii (additif) dengan media asas ke atas percambahan biji benih <i>P. gigantea</i> 30 hari selepas pengkulturan	44
Rajah 3.7	Kesan interaksi penggunaan Homogenat ubi kentang dengan media asas ke atas percambahan biji benih <i>P. gigantea</i> sepanjang 150 hari tempoh pengkulturan	45
Rajah 4.1	Protokorm <i>P. gigantea</i> 150 hari selepas percambahan digunakan sebagai eksplan	61
Rajah 4.2	Kesan media asas ke atas penggandaan protokorm <i>P. gigantea</i>	64
Rajah 4.3	Kesan umur protokorm ke atas penggandaan protokorm <i>P. gigantea</i>	70
Rajah 4.4	Kesan hormon NAA dan BAP ke atas penggandaan protokorm <i>P. gigantea</i> 84 hari selepas pengkulturan	74
Rajah 4.5	Kesan media ke atas protokorm <i>P. gigantea</i> yang dipotong dasarnya selepas 14 hari pengkulturan	77
Rajah 4.6	Pembentukkan protokorm baru dari permukaan protokorm <i>P. gigantea</i> yang telah dipotong dasarnya di sepanjang tempoh pengkulturan	78
Rajah 4.7	Kesan air kelapa dan arang teraktif ke atas penggandaan protokorm <i>P. gigantea</i> yang tidak dipotong dasarnya	79

HALAMAN

Rajah 4.8	Kesan air kelapa dan arang teraktif ke atas penggandaan protokorm <i>P. gigantea</i> yang dipotong dasarnya	80
Rajah 4.9	Pembentukkan protokorm baru pada protokorm yang dipotong dan tidak dipotong dasarnya selepas 77 hari pengkulturan	85
Rajah 5.1	Pertumbuhan dan perkembangan protokorm <i>P. gigantea</i> .	100
Rajah 5.2	Graf plot purata indeks pertumbuhan protokorm <i>P. gigantea</i> sepanjang tempoh 150 hari pengkulturan. (A) 0% homogenat ubi kentang	102
Rajah 5.3	Kesan gula dan kepekatan homogenat ubi kentang terhadap pertumbuhan dan perkembangan anak benih <i>P. gigantea</i> 150 hari selepas pengkulturan	104



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

SENARAI SIMBOL DAN SINGKATAN

-	Hingga
%	Peratus
$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	mikromol per meterpersegi per saat
,	Koma
.	Perpuluhan
/	Per
~	Lebih kurang
+	Tambah
<	Kurang daripada
=	Sama dengan
\pm	Tambah tolak
$1/2$	Setengah
2,4-D	2,4- dichlorophenoxyacetic acid
Al	Aluminium
ANOVA	Analisis of Varians
B	Boron
BAP	Benzylaminopurine
Ca	Kalsium
Cl	Klorin
cm	Sentimeter
Co	Kobalt
CRD	Completely Randomized Design
Cu	Kuprum
F	F-value/ nilai F statistik
Fe	Ferum
g	Gram
gL^{-1}	Gram per liter
HCl	Asid Hidroklorik
I	Iron/besi
JSP	Jasad seperti protokom
K	Kalium
KC	Media Knudson C
kg	Kilogram
KOH	Kalium Hidroksida
kPa	Kilopascal
l	Liter
m	Meter
M	Molar
MARDI	Institut Penyelidikan dan Kemajuan Pertanian Malaysia
Mg	Magnesium
mg	Miligram
mL^{-1}	Mililiter per liter
ml	Mililiter
Mn	Mangan
Mo	Molibdenum
MS	Media Murashige & Skoog

N	Nitrogen
NaOH	Natrium Hidroksida
Ni	Nikel
°C	Darjah Celcius
P	Fosfat (PO_4)
S	Sulfur
Sig.	Signifikan
SPSS	Statistical Package for Social Science
TDZ	Thidiazuron
v/v	Volume / volume (Isipadu per isipadu)
VW	Media Vacin & Went
w/v	Weight / volume (Berat per isipadu)
x	Kali
XER	Experimental Ernst Robert
α	Alfa
β	Beta
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BAB 1

PENDAHULUAN

Pulau Borneo mempunyai 2500-3000 spesies orkid iaitu 10% daripada orkid dunia dan sebanyak 34.4% daripadanya adalah endemik (Chan *et al.*, 1994). Terdapat 290 spesies orkid yang dijumpai di Pulau Borneo didapati berada dalam kategori terancam (Rao, 1992). Keadaan ini disebabkan oleh aktiviti manusia seperti pembukaan hutan untuk pertanian, pembangunan, pembalakkan dan pemungutan secara haram yang berleluasa (Sprott & Mazzotti, 2001; Lo *et al.*, 2004b; Znaniecka *et al.*, 2005b). Justeru itu, usaha pemuliharaan atau propagasi yang efektif dan kolektif perlu dilakukan untuk mengelakkan kepupusan spesies-spesies orkid yang berada dalam kategori terancam.

Antara spesies orkid yang dikelaskan dalam Appandeks II CITES (*Convention in Trade on Endangered Species of Flora and Fauna*) sebagai terancam ialah *Phaleonopsis gigantea* atau lebih dikenali sebagai Telinga Gajah. Spesies ini adalah endemik di Sabah dan Kalimantan dan diletakkan di bawah pengawalan *ex-situ* (Lamb, 1991). Keistimewaan orkid ini ialah mempunyai daun yang sangat lebar dengan nilai hortikultur yang tinggi (Chan *et al.*, 1994).

Teknik kultur *in vitro* merupakan cara pertumbuhan yang dilakukan dalam keadaan steril di mana beberapa faktor biotik (sumber, jenis dan kematangan eksplan) dan abiotik (komponen dalam media dan persekitaran) yang boleh mempengaruhi kultur adalah dikawal. Teknik ini meliputi percambahan biji benih dan propagasi vegetatif merangkumi kultur organ, tisu atau sel. Orkid adalah antara tanaman yang berjaya diklonkan menggunakan teknik ini. Teknik percambahan *in vitro* orkid dipelopori oleh Knudson (1946) dan mikropropagasi oleh Morel (1960). Teknik kultur *in vitro* penting untuk tujuan komersial dengan penghasilan bahan tanaman yang banyak dalam masa yang singkat dan pemuliharaan spesies orkid

endemik dan terancam. Antara penyelidik yang telah menjalankan kajian ke atas kultur *in vitro* orkid ialah Nayak *et al.* (1997a); Sheelavantmath *et al.* (2000); Bhadra & Hossain (2003); Lo *et al.* (2004b); Yan *et al.* (2006); Divakaran *et al.* (2006).

Mikropropagasi genus *Phalaenopsis* telah lama dibangunkan dan digunakan di kebanyakan pusat orkid dunia. Eksplan yang biasa digunakan ialah tunas tangkai bunga (Chowdhury *et al.*, 2003; Košir *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006), daun (Ishii *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2002) dan akar (Park *et al.*, 2003). Walau bagaimanapun, spesies ini sukar dipropagasikan secara vegetatif kerana tahap fenolik yang tinggi dirembeskan oleh tisu boleh menjadi toksik terhadap kadar pertumbuhan kultur (Park *et al.*, 2000). Selain itu, penggunaan eksplan tersebut juga memerlukan teknik pensterilan secara langsung yang lebih sukar, mendedahkan eksplan kepada bahan kimia pensterilan yang boleh menyebabkan kematian pada kultur; memerlukan kepekatan pengawalatur tumbesaran yang lebih tinggi (Ishii *et al.*, 1998); dan memusnahkan pokok induknya.

Sehingga kini, belum ada kajian secara menyeluruh mengenai percambahan dan propagasi *in vitro* orkid *P. gigantea* ini. Seperti spesies lain, biji benih *P. gigantea* tidak dapat bercambah dalam persekitaran semulajadi. Justeru, aplikasi teknik percambahan *in vitro* mampu merealisasikan objektif pemeliharaan dan pemuliharaan spesies ini, kerana anak benih yang terhasil mempunyai tahap heterozigot (Vij & Pathak, 1990) dan segregasi (Park *et al.*, 2000) yang tinggi dan seterusnya boleh membawa kepada variasi genetik (Seen & Latha, 2000) yang lebih luas. Kajian dan pengamatan ke atas faktor-faktor yang boleh mempengaruhi kejayaan pengkulturan di setiap peringkat tersebut dapat meningkatkan kualiti dan kuantiti anak benih yang terhasil. Justeru, objektif kajian ini ialah:

- i. Mengkaji kesan media asas, kematangan biji benih (umur kapsul) dan interaksi penggunaan kompleks semulajadi dengan media asas terhadap percambahan *in vitro* biji benih *P. gigantea*.
- ii. Mengkaji kesan peringkat kematangan protokorm; pemilihan media asas; pengawalatur tumbesaran; bahan semulajadi dan arang teraktif serta

perlakuan terhadap eksplan (pemotongan protokorm) terhadap penggandaan protokorm.

- iii. Mengkaji kesan penggunaan gula sebagai sumber karbon bersama dengan homogenat ubi kentang ke atas perkembangan dan pertumbuhan protokorm *P. gigantea* yang membentuk anak benih.



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BAB 2

ULASAN LITERATUR

2.1 GENUS *PHALAEENOPSIS*

Phalaenopsis merujuk kepada kesenian yang halus dan jelmaan rama-rama seperti bunga putih (Hodgson *et al.*, 1991). *Phalaenopsis* berasal dari perkataan Greek iaitu *Phalaina* yang bermaksud 'kupu-kupu' dan *opsis* bermaksud 'kemunculan' (Chan *et al.*, 1994). Ia mula-mula dijumpai oleh Rumphius pada tahun 1750 di kepulauan Amboina, pada masa itu beliau menganggap orkid ini sebagai tumbuhan famili *Agraecum*. Pada tahun 1825, Blume memperkenalkan genus ini secara rasmi yang merupakan pelopor kepada kajian ahli-ahli botani untuk menentukan kesahihannya (Tom & Marion, 1994).

Phalaenopsis tergolong dalam kumpulan orkid monopodial yang memiliki ciri-ciri pertumbuhan yang perlahan. Batangnya yang pendek, saiz bunga yang pelbagai, berwarna putih, merah jambu dan ungu dengan tanda kuning atau merah keperangan. Sepal dan kelopak bunga berselerak dan berada berasingan (Hodgson *et al.*, 1991). Struktur daunnya tebal dan berlilin.

Di habitat semulajadi, *Phalaenopsis* tumbuh dengan baik pada kelembapan udara relatif 50-80%, pada suhu 16°C di waktu malam dan 31°C di siang hari. Biasanya orkid ini dijumpai menjalar pada batang-batang pokok berkanopi dan di celah-celah batu yang sesuai dengan pertumbuhannya. *Phalaenopsis* tumbuh dan berbunga dengan baik dalam persekitaran cahaya $73\text{-}146 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dan didedahkan di bawah cahaya lampu kalimantan selama 14 jam sehari. Ia memerlukan bekalan air yang berpanjangan atau media yang boleh menyimpan kandungan air kerana pokok orkid yang matang tidak mampu menyimpan air (Hodgson *et al.*, 1991).

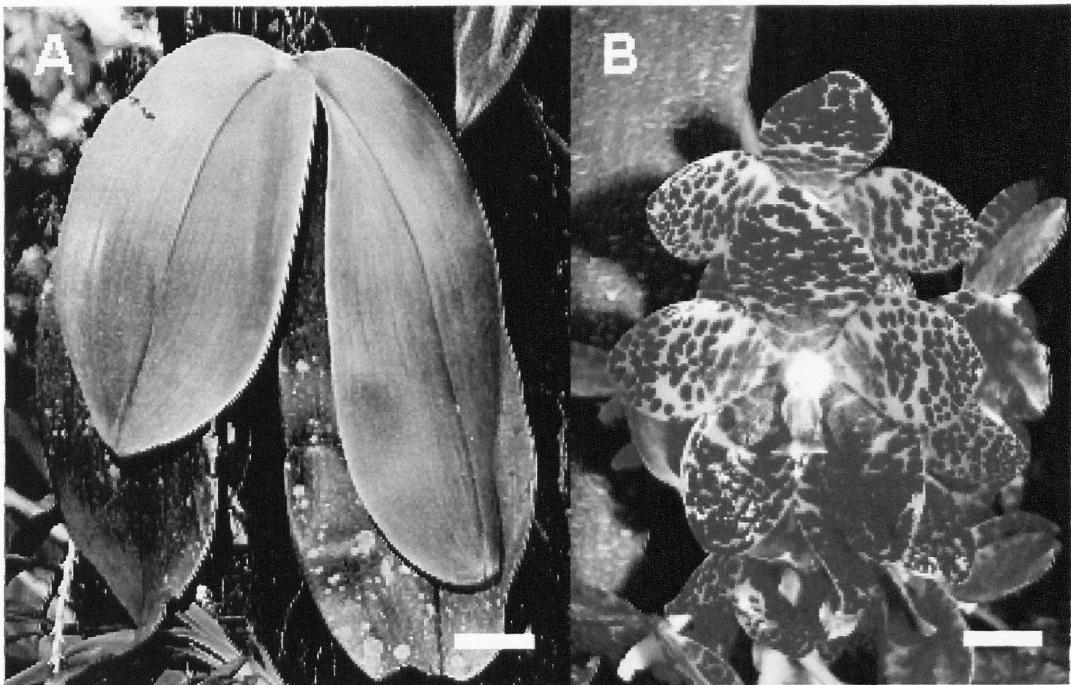
Genus *Phalaenopsis* dikenali dengan pelbagai nama. Di Filipina misalnya, *Phalaenopsis* dikenali sebagai Mariposa iaitu rama-rama, manakala di Indonesia pula ia dikenali sebagai Anggerik Bulan kerana kecantikan bunganya disamakan dengan kecantikan bulan purnama. Di Sarawak, *P. violacea*, dikenali sebagai orkid Lundu yang merujuk kepada habitatnya yang hampir pupus. *Phalaenopsis pantherina*, *P. sumatrana* dan *P. corningiana* adalah antara spesies yang sangat terancam (Chan et al., 1994).

Phalaenopsis mempunyai kira-kira 70 spesies yang tersebar secara meluas merangkumi Malaysia, Thailand, Indonesia, Filipina, New Guinea dan Australia (Teo, 1995). Di negeri Sabah, terdapat enam spesies *Phalaenopsis* iaitu *P. amabilis*, *P. cumu-cervi*, *P. fuscata*, *P. maculata*, *P. modesta* dan *P. gigantea*, di mana dua daripadanya adalah orkid endemik kepada Sabah iaitu *P. modesta* dan *P. gigantea* (Lamb, 1991).

2.2 ***PHALAENOPSIS GIGANTEA***

Gigantea berasal dari perkataan Latin, *giganteus* iaitu gigantik atau besar merujuk kepada saiz daunnya yang sangat besar (Chan et al., 1994). Spesies ini endemik kepada Borneo (Lamb, 1991). Habitat semulajadinya adalah di kawasan Merotai, Tawau dan Bukit Tiger. Ia disenaraikan sebagai orkid terancam (hampir pupus) (Teo, 1995) dan di bawah akta perlindungan *ex-situ* dalam Appendiks II CITIES.

Phalaenopsis gigantea merupakan orkid epifit monopodial, berakar serabut menjalar pada permukaan batang pokok, saiz daun mencapai 56-91 cm panjang, tebal, berlilin dan berkilat. Bilangan daunnya 2-6 helai setiap pokok (Rajah 2.1A). Beratnya boleh mencapai sehingga 11.8 kg, bunganya mempunyai 8 jambak yang mengandungi 34 kuntum (Rajah 2.1B) (Lamb, 1978). *Phalaenopsis gigantea* memerlukan keadaan yang teduh seperti di batang pokok yang berkanopi. Habitat semulajadinya ialah di kawasan hutan tanah rendah dan kawasan hutan berbukit pada ketinggian 400 m dari paras laut. Ia mengeluarkan bunga secara bermusim iaitu pada bulan Julai-Ogos dan Februari (Chan et al., 1994).



Rajah 2.1: *Phalaenopsis gigantea* yang melekat pada batang pokok. (A) Pokok, Bar=7 cm. (B) Kuntuman bunga, Bar= 1 cm.

2.3 PROPAGASI ORKID

Terdapat dua kaedah propagasi orkid yang biasa digunakan iaitu propagasi secara konvensional dan secara *in vitro*. Kaedah konvensional iaitu kaedah propagasi vegetatif seperti keratan batang, pembahagian tunas aksil dan perlakuan bebwang semu. Kaedah *in vitro* pula merangkumi percambahan biji benih dan kultur organ, tisu atau sel (Zaharah & Rozlaily, 1991).

2.3.1 Propagasi Vegetatif Secara *In vivo*

Kaedah pembiakan tampang digunakan berdasarkan kesesuaian ciri pada orkid tersebut seperti pembahagian rizom untuk spesies orkid yang mempunyai *psuedobulb* (*Cymbidium*), kaedah keratan batang (*Dendrobium*). Kaedah pemisahan cabang aksil muda dari pokok induk digunakan untuk menghasilkan pokok baru bagi spesies *Vanda* (Rao, 1980).

2.3.2 Percambahan Biji Benih Secara *In vitro*

Menurut Haper (1979), setiap kapsul orkid biasanya menghasilkan 1×10^9 sehingga 1×10^{10} biji benih. Arditti & Abdul Karim (2000) pula, menyatakan bahawa orkid mampu menghasilkan 20 biji sehingga empat juta biji benih pada setiap kapsul bergantung kepada saiz kapsul dan spesies orkid. Saiz biji benih sangat kecil dan kelihatan seperti habuk (Chan *et al.*, 1994; Buyun *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2005; Znaniecka *et al.*, 2005b; Whigam *et al.*, 2006). Biji benih mempunyai embrio yang belum berkembang (Rasmussen, 1995), mengandungi sangat sedikit atau tiada endosperm dan kotiledon. Bahan simpanan yang terdapat dalam embrio yang sempurna berbentuk lipid dalam jumlah yang sangat sedikit (Arditti & Ernst, 1984; Smereciu & Currah, 1989). Lipid ini akan digunakan semasa percambahan biji benih (Manning & Van Staden, 1987).

Secara semulajadi, biji benih orkid bercambah dengan unik melalui hubungan simbiosis dengan mikoriza kulat (Mitchell, 1989; Whigam *et al.*, 2006). Noel Bernard merupakan orang yang pertama mencerap situasi ini pada tahun 1899 (Arditti, 1967). Kejayaan simbiosis membentuk tumbuhan matang adalah sangat rendah, ini mendatangkan masalah pada evolusi orkid (Harrison & Arditti, 1978). Fenomena ini berlaku dengan penyatuan embrio dengan mikoriza kulat tertentu. Kulat mencerna bahan organik tanah seperti selulosa menjadi gula ringkas untuk menyokong percambahan biji benih dan pertumbuhan embrio. Kajian Knudson (1922) menunjukkan bahawa kulat mendorong percambahan dengan menurunkan kanji, pentosa dan nitrogen untuk membentuk bahan penggalak pertumbuhan (Arditti, 1967). Bahan penggalak tersebut adalah sitokinin yang digunakan untuk mobilisasi lipid semasa percambahan (Manning & Van Staden, 1987; Shiao *et al.*, 2005).

Walaupun orkid dapat menghasilkan bilangan biji benih yang sangat banyak, ia jarang sekali dapat bercambah pada habitat semulajadi. Philip & Nainar (1988) melaporkan bahawa percambahan biji benih orkid adalah 1-2% walaupun selepas tempoh kedormanan. Rao (1995) pula melaporkan bahawa percambahan biji benih orkid secara semulajadi adalah kurang daripada 5%.