



UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA

**KAJIAN PERCAMBAHAN DAN KULTUR *IN VITRO*
ENAU (*ARENKA PINNATA*)**

JAMILAH BT ISMAIL

FH 1994 5

KAJIAN PERCAMBAHAN DAN KULTUR *IN VITRO*
ENAU (*Arenga pinnata*)

Oleh

JAMILAH BT ISMAIL

Tesis ini dikemukakan untuk memenuhi syarat keperluan
Ijazah Master Sains Pertanian di Fakulti Pertanian
Universiti Pertanian Malaysia

Jun 1994



Dedikasi Untuk:

Suami tercinta dan Nabilah tersayang...

Kaulah segalanya bagiku

Emak dan Abah...

Pengorbanan kalian tetap tersemat disudut hati

Kak Long dan Angah...

Dikau tetap di dalam ingatan

Cokman, Ros dan Ani...

Senda gurau kalian tetap segar di sanubari

PENGHARGAAN

Dengan nama Allah yang Maha Pemurah Lagi Maha Penyayang. Alhamdulillah setinggi-tinggi kesyukuran dipanjatkan kepada Allah s.w.t kerana dengan keizinan dan kurniaanNya penulis telah berjaya menyiapkan tesis ini.

Penulis ingin mengucapkan jutaan terima kasih yang tidak terhingga kepada yang dihormati Dr. Saleh Kadzimin dari Jabatan Agronomi dan Hortikultur, Fakulti Pertanian sebagai ketua penyelia, Prof. Madya Dr. Zaliha Christine Alang dari Jabatan Bioteknologi, Fakulti Sains Makanan dan Bioteknologi dan En. Azmi Abd. Rashid dari Jabatan Agronomi dan Hortikultur, Fakulti Pertanian, Universiti Pertanian Malaysia sebagai penyelia-penyelia projek yang telah memberi segala nasihat, teguran, tunjukajar dan dorongan yang sangat berfaedah disepanjang pelaksanaan projek ini. Ucapan ini juga ditujukan kepada Cokman, Ros dan Ani serta suami tersayang di atas segala kerjasama dan pertolongan yang telah diberikan. Semoga Allah jua yang membalas budi baik mereka.

Akhir sekali penulis ingin memohon keampunan dari Allah s.w.t dan meminta kemaafan dari semua yang terlibat jika terdapat sebarang kesilapan disepanjang pelaksanaan dan penulisan projek ini.



SENARAI KANDUNGAN

Mukasurat

PENGHARGAAN	iii
SENARAI JADUAL	ix
SENARAI PLAT	xii
SENARAI SINGKATAN	xvii
ABSTRAK	xix
ABSTRACT	xxii
BAB	
I PENGENALAN	1
2 SOROTAN LITERATUR	3
Taburan geografi	3
Botani dan taksonomi	4
Kepentingan ekonomi enau	6
Makanan	6
Minuman	7
Serabut	9
Perubatan	9
Kegunaan lain	10
Penyimpanan germplasma melalui kultur tisu	10
Kultur <i>in vitro</i> palma	11



Percambahan embrio secara <i>in vitro</i>	12
Kelapa sawit	12
Kelapa	15
Kurma	17
Sagu	18
Pengeluaran kalus daripada embrio dan bahagian vegetatif	18
Kelapa sawit	18
Kelapa	20
Kurma	21
Sagu	22
Peach palm	23
Pemilihan eksplan	24
Mercu pucuk dan tunas sisi	24
Apeks batang	24
Akar	25
Embrio dan anak benih	26
Pensterilan eksplan	27
Apeks batang	27
Akar	27
Daun/tisu bunga	28
3 BAHAN DAN KAEDAH	29
Am	
Bahan	29
Lokasi kajian	29
Bahan kaca dan pembersihan	32
Penyediaan larutan stok dan medium	32
Keadaan pengeraman	33



Kajian percambahan	34
Penyediaan biji benih	34
Percambahan biji benih	34
Percambahan di rumah kaca	34
Percambahan biji benih secara steril(di makmal)	36
Kultur embrio	38
Pengeluaran embrio	38
Pemilihan dan pensterilan embrio	38
Penyediaan stok pengawalatur pertumbuhan	39
Kesan 2,4-D/2iP pada kepekatan rendah ke atas pembentukan anak benih	39
Kesan pelbagai auksin pada kepekatan tinggi dengan kinetin ke atas pembentukan anak benih	40
Kesan 2,4-D/2iP dan 2,4-D/BAP ke atas pembentukan anak benih	40
Kesan NAA/2iP dan NAA/BAP ke atas pembentukan anak benih	41
Pembiakan melalui kultur tisu	41
Penyediaan eksplan untuk kultur tisu	41
Pensterilan eksplan	43
Penyediaan dan pensterilan medium	44
Kesan pelbagai auksin dengan kinetin ke atas perkembangan eksplan	44
Kesan 2,4-D/2iP dan 2,4-D/BAP ke atas penghasilan kalus daripada embrio	44
Kultur kalus untuk pembentukan embrio soma	45
Analisis statistik	46



4	KEPUTUSAN	47
	Kajian percambahan biji benih	47
	Kajian percambahan biji benih di rumahkaca	47
	Kajian percambahan biji benih secara steril di makmal	51
	Kultur embrio	54
	Kesan 2,4-D/2iP pada kepekatan rendah ke atas pembentukan anak benih	54
	Kesan pelbagai auksin pada kepekatan tinggi dengan kinetin ke atas pembentukan anak benih	61
	Kesan 2,4-D / kinetin	61
	Kesan IBA / kinetin	63
	Kesan IAA / kinetin	65
	Kesan NAA / kinetin	68
	Kesan Dicamba / kinetin	72
	Kesan Picloram / kinetin	72
	Kesan 2,4-D / 2iP ke atas pembentukan anak benih	75
	Kesan 2,4-D / BAP ke atas pembentukan anak benih	80
	Kesan NAA/2iP ke atas pembentukan anak benih	82
	Kesan NAA/BAP ke atas pembentukan anak benih	85
	Kultur tisu	88
	Kesan pelbagai auksin dengan kinetin ke atas perkembangan tisu	88
	Kesan 2,4-D / kinetin	88
	Kesan NAA / kinetin	91
	Kesan Picloram / kinetin	91
	Kultur embrio untuk penghasilan kalus	96
	Kultur kalus untuk pembentukan embrio soma	104



5	PERBINCANGAN	107
	Kultur embrio	107
	Kultur tisu	111
6	KESIMPULAN	114
	BIBLIOGRAFI	116
	LAMPIRAN	125
	VITA	127



SENARAI JADUAL

JADUAL	MUKASURAT
1	Kawasan kepelbagaian tanaman. Semenanjung Malaysia 1986. Laporan tahunan Kementerian Pertanian . . . 3
2	Kesan beberapa perlakuan ke atas min peratus percambahan biji benih enau di rumah kaca selepas 16 minggu disemai 48
3	Kesan penggoresan di lapisan endorkapa biji benih enau di mana embrionya jelas kelihatan ke atas min peratus percambahan biji benih enau di makmal selepas 16 minggu disemai 52
4	Min peratus bagi tindakbalas embrio enau terhadap medium berkombinasi 2,4-D/2iP (kepekatan rendah) selepas 6 bulan dikultur 56
5	Min peratus bagi tindakbalas embrio enau terhadap medium berkombinasi 2,4-D/kinetin (kepekatan tinggi) selepas 6 bulan dikultur 62
6	Min peratus bagi tindakbalas embrio enau terhadap medium berkombinasi IBA/kinetin selepas 6 bulan dikultur 64
7	Min peratus bagi tindakbalas embrio enau terhadap medium berkombinasi IAA/kinetin selepas 6 bulan dikultur 66



8	Min peratus bagi tindakbalas embrio enau terhadap medium berkombinasi NAA/kinetin selepas 6 bulan dikultur	70
9	Min peratus bagi tindakbalas embrio enau terhadap medium berkombinasi Dicamba, Picloram/kinetin selepas 6 bulan eksplan dikultur	73
10	Min peratus bagi tindakbalas embrio enau terhadap medium berkombinasi 2,4-D/2iP (kepekatan tinggi) selepas 3 bulan dikultur	77
11	Min peratus bagi tindakbalas embrio enau terhadap medium berkombinasi 2,4-D/BAP selepas 3 bulan dikultur	81
12	Min peratus bagi tindakbalas embrio enau terhadap medium berkombinasi NAA/2iP selepas 3 bulan dikultur	83
13	Min peratus bagi tindakbalas embrio enau terhadap medium berkombinasi NAA/BAP selepas 3 bulan dikultur	86
14	Tindakbalas eksplan enau pada medium yang mengandungi 2,4-D/kinetin selepas 6 bulan dikultur	89
15	Tindakbalas eksplan enau pada medium yang mengandungi NAA/kinetin selepas 6 bulan dikultur	92
16	Tindakbalas eksplan enau pada medium yang mengandungi Picloram/kinetin selepas 6 bulan dikultur	94



17	Kesan beberapa paras kombinasi pengawalatur pertumbuhan pada medium yang mengandungi 2,4-D /BAP terhadap perkembangan kalus enau selepas 3 bulan dikultur	98
18	Kesan beberapa paras kombinasi pengawalatur pertumbuhan pada medium yang mengandungi 2,4-D/2iP terhadap perkembangan kalus enau selepas 3 bulan dikultur	99
19	Medium formulasi Murashige dan Skoog (MS),(1962) . .	125
20	Medium formulasi Tisserat dan DeMason (1980)	126



SENARAI PLAT

PLAT	MUKASURAT
1	(A) Pokok enau yang sedang berbuah; (B) Tandan buah 30
2	(A) Keratan memanjang dan (B) Keratan melintang buah enau 31
3	(A) Biji benih enau yang matang berwarna hitam dan keras. (B) Penggoresan di lapisan atas endokarpa biji benih di mana embrionya (e) jelas kelihatan. (C) Embrio matang daripada biji benih yang digunakan di dalam kajian 35
4	(A) Anak benih enau. (B) Akar primer dan (C) Daun termuda daripada anak benih enau yang digunakan sebagai eksplan untuk dikulturkan ke atas medium Tisserat dan De Mason. (Garispusat piring petri 9.0 cm). 42
5	Peringkat percambahan biji benih enau bagi perlakuan (A) T1 (kawalan), (B) T2 (biji benih dipotong bahagian hujungnya) dan (C) T5 (biji benih direndam dalam H ₂ SO ₄ selama 10 minit) selepas (a) 10 minggu, (b) 13 minggu dan (c) 16 minggu disemai. 49



6	Peringkat percambahan biji benih enau bagi perlakuan (A) T6 (biji benih direndam dalam H ₂ SO ₄ selama 30 minit dan (B) T7 (penggoresan di lapisan endokarpa di mana embrionya jelas kelihatan) selepas (a) 10, (b) 13 dan (c) 16 minggu disemai.	50
7	Percambahan biji benih enau secara steril di makmal selepas 13 minggu disemai.	53
8	Perkembangan embrio enau setelah (A) 4 bulan, (B) 6 bulan dan (C) 8 bulan dikultur dalam terang pada medium Tisserat dan De Mason yang mengandungi 22.5 µM 2,4-D dengan 9.8 µM 2iP (Garispusat kelalang kon 5 cm)	58
9	Pembentukan kalus pada embrio enau pada medium Tisserat dan De Mason yang mengandungi 67.5 µM 2,4-D dengan 9.8 µM 2iP selepas (A) 5 bulan dan (B) 7 bulan dikultur dalam terang (Garispusat kelalang kon 5 cm)	59
10	Perkembangan kalus daripada embrio enau selepas 7 bulan dikultur pada medium Tisserat dan De Mason yang mengandungi 45.0 µM 2,4-D dengan 4.9 µM 2iP dalam terang (Garispusat kelalang kon 5 cm)	60
11	Penghasilan pucuk (sahaja) daripada embrio enau pada medium Tisserat dan De Mason yang mengandungi 50 µM IAA dengan 10 µM kinetin setelah 6 bulan dikultur dalam terang (Garispusat kelalang kon 5 cm)	67



12	Penghasilan kalus daripada embrio enau pada medium Tisserat dan De Mason yang mengandungi 50 μM NAA dengan 10 μM kinetin selepas 7 bulan dikultur dalam terang. (Garispusat kelalang kon 5 cm)	71
13	Penghasilan akar (sahaja) daripada embrio enau pada medium Tisserat dan De Mason yang mengandungi 200 μM Picloram dengan 10 μM kinetin selepas 6 bulan dikultur dalam terang.(Garispusat kelalang kon 5 cm)	74
14	Penghasilan anak benih normal daripada embrio enau pada medium Tisserat dan De Mason yang mengandungi 50 μM 2,4-D dengan 10 μM kinetin selepas 3 bulan dikultur dalam terang (Garispusat kelalang kon 5 cm)	78
15	Penghasilan akar (sahaja) daripada embrio enau pada medium Tisserat dan De Mason yang mengandungi 100 μM 2,4-D dengan 10 μM 2iP selepas 3 bulan dikultur dalam terang (Garispusat kelalang kon 5 cm)	79
16	Penghasilan pucuk (sahaja) daripada embrio enau pada medium Tisserat dan De mason yang mengandungi 100 μM NAA dengan 10 μM 2iP selepas 3 bulan dikultur dalam terang (Garispusat kelalang kon 5 cm)	84
17	Pemanjangan apokol daripada embrio enau pada medium Tisserat dan De mason yang mengandungi 100 μM NAA dengan 10 μM BAP selepas 3 bulan dikultur dalam terang (Garispusat kelalang kon 5 cm).	87



- 18 Perkembangan eksplan (A) Daun dan (B) Akar yang dikultur pada peringkat-peringkat berikut:(a) permulaan kultur (b) selepas 4 bulan (c) selepas 5 bulan (d) selepas 6 bulan dikultur (tisu menjadi perang) 90
- 19 Penghasilan pucuk pada tisu batang enau pada medium Tisserat dan De Mason yang mengandungi 100 μM NAA dengan 10 μM kinetin selepas 6 bulan dikultur didalam keadaan (A) terang dan (B) gelap. (Garispusat "vial" 25 mm) 93
- 20 Penghasilan pucuk pada tisu batang enau pada medium Tisserat dan De Mason yang mengandungi 200 μM Picloram dengan 10 μM kinetin selepas 6 bulan eksplan dikultur (A) dalam terang dan (B) dalam gelap. (Garis pusat "vial" 25 mm). 95
- 21 Penghasilan kalus yang bernodul, berwarna putih dan kering pada medium Tisserat dan De Mason yang mengandungi 400 μM 2,4-D dengan 10 μM 2iP selepas embrio enau dikultur selama 3 bulan di dalam gelap. (Garispusat kelalang kon 5 cm) 100
- 22 Penghasilan kalus yang berwarna putih kehijauan dan lembap pada medium Tisserat dan De Mason yang mengandungi 400 μM 2,4-D dengan 10 μM BAP selepas embrio enau dikultur selama 2 bulan di dalam gelap (Garispusat kelalang kon 5 cm) 101



23	Pemanjangan apokol pada medium Tisserat dan De Mason yang mengandung 200 μM 2,4-D tanpa BAP selepas 2 bulan embrio dikultur di dalam gelap (Garispusat kelalang kon 5 cm)	102
24	Penghasilan akar pada medium Tisserat dan De Mason yang mengandung 400 μM 2,4-D tanpa BAP selepas 3 bulan embrio enau dikultur di dalam gelap. (Garispusat kelalang kon 5 cm)	103
25	Penghasilan akar daripada kalus enau pada medium Tisserat dan De Mason yang mengandung 100 μM 2,4-D selepas 1 bulan dikultur di dalam gelap. (Garispusat kelalang kon 5 cm)	105
26	Perkembangan kalus enau (A) diperingkat awal dan (B) selepas 1 bulan dikultur di dalam gelap pada medium Tisserat dan De Mason tanpa pengawalatur pertumbuhan. (Garispusat kelalang kon 5 cm)	106



SENARAI SINGKATAN

ANOVA	analisis varian
BAP	benzylamino purine
2,4-D	asid 2,4 - diklorofenoksiasetik
Dicamba	asid 3,6 dikloro metoksi benzoik
DNMRT	Duncan's New Multiple Range Test
EtOH	etil alkohol
Fe-EDTA	asid ferusetilenadiaminatetraasetik
g ^l ⁻¹	gram per liter
HCl	asid hidroklorid
HgCl ₂	merkuri klorid
H ₂ SO ₄	asid sulfurik
IAA	asid indola - 3 -asetik
IBA	asid indola - 3 - butyric
2iP	N ⁶ - (2 - isopentenil) adenina
KH ₂ PO ₄	kalium dihidrogen fosfat
M	molar
μM	mikro molar
mM	milimolar
mg ^l ⁻¹	miligram per liter



MS	medium formulasi Murashige dan Skoog(1962)
NAA	asid naftalena asetik
NaH ₂ PO ₄	natrium dihidrogen fosfat
Picloram	asid 4 - amino -3,5,6 trikloro - 2 - pyride karboksilik
2,4,5-T	asid 2,4,5 - triklorofenoksiasetik
Y ₃	medium formulasi (Eeuwens, 1976)
%	peratus

Abstrak tesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti Pertanian Malaysia bagi memenuhi syarat untuk memperolehi Ijazah Master Sains Pertanian.

**KAJIAN PERCAMBAHAN DAN KULTUR *IN VITRO* ENAU
(*Arenga pinnata*)**

Oleh

JAMILAH BT ISMAIL

Pengerusi : Dr. Saleh b. Kadzimin

Fakulti : Pertanian

Kajian ke arah mengekalkan germplasma enau (*Arenga pinnata*) melalui kaedah *in vitro* telah dijalankan memandangkan tumbuhan yang berpotensi ini semakin pupus akibat penerokaan tanah.

Penyelidikan yang telah dijalankan meliputi kaedah pra-perlakuan percambahan biji benih bagi mendapatkan sumber eksplan untuk kajian selanjutnya, penentuan kombinasi pengawalatur pertumbuhan yang sesuai untuk memperolehi anak benih, pembentukan kalus daripada pengkulturan berbagai jenis eksplan dan pembentukan embrio soma daripada kalus yang terbentuk daripada pengkulturan embrio.



Bagi kajian pra-perlakuan percambahan biji benih, kajian telah dijalankan di rumah kaca dan di makmal. Perlakuan termasuklah pemotongan biji benih di bahagian hujungnya, biji benih direndam di dalam air panas (100°C) selama 10 dan 30 minit, biji benih direndam di dalam H₂SO₄ pekat selama 10 dan 30 minit dan penggoresan di lapisan endokarpa biji benih di bahagian berhampiran embrio. Penggoresan di lapisan endokarpa biji benih didapati memberikan peratus percambahan biji benih yang tertinggi iaitu sebanyak 84% (di rumah kaca) dan 80% (di makmal).

Untuk memperolehi anak benih yang normal daripada pengkulturan embrio, berbagai kombinasi auksin dan sitokinin telah dilakukan. Di antara auksin yang digunakan termasuklah 2,4-D, IBA, IAA, NAA, Picloram dan Dicamba manakala sitokinin yang digunakan ialah 2iP dan BAP. Peratus pembentukan anak benih yang normal yang tertinggi telah diperolehi apabila embrio dikulturkan di dalam medium Tisserat dan De Mason (1980) yang mengandungi beberapa kombinasi seperti 22.5 µM 2,4-D bersama 9.8 µM 2iP (86.7%), 50 µM 2,4-D bersama 10 µM kinetin (80%), 100 µM IAA bersama 10 µM kinetin (80%) dan 100 µM NAA bersama 10 µM kinetin (82%).

Akar-akar primer, daun muda, keratan batang dan embrio telah digunakan untuk penghasilan kalus. Berbagai kombinasi auksin dan sitokinin telah dijalankan. Di antara kombinasi yang dijalankan ialah 2,4-D, NAA dan Picloram

bersama kinetin (untuk eksplan akar, daun muda dan keratan batang). Kombinasi 2,4-D dengan 2iP dan BAP pula digunakan bagi eksplan embrio. Dalam kajian-kajian ini, hanya eksplan embrio sahaja menghasilkan kalus dan peratus pembentukan yang tertinggi telah diperolehi pada medium yang mengandungi kombinasi 400 μM 2,4-D bersama 10 μM BAP dan 400 μM 2,4-D bersama 10 μM 2iP dengan kehadiran arang teraktif dengan peratus penghasilan kalus yang bernodul, putih dan lembap yang tertinggi 56% dan 53.3% dan kalus yang tidak bernodul 44% dan 33.3%.

Bagi kajian embrio soma, kalus yang terbentuk daripada pengkulturan embrio telah dikultur ke atas medium tanpa pengawalatur pertumbuhan, medium yang mengandungi 2,4-D dan kombinasi 2,4-D bersama 2iP atau BAP. Kalus yang dikultur di dalam kesemua perlakuan tidak membentuk embrio soma. Walau bagaimanapun, medium yang mengandungi 100 μM 2,4-D menghasilkan kalus yang berakar.

Abstract of the thesis presented to the Senate of Universiti Pertanian Malaysia in fulfilment of the requirements for the Degree of Master of Science.

**GERMINATION AND *IN VITRO* CULTURE STUDIES OF ENAU
(*Arenga pinnata*)**

By

JAMILAH ISMAIL

Chairman : Dr. Saleh b. Kadzimin
Faculty : Agriculture

Studies towards germplasm preservation of enau (*Arenga pinnata*) through *in vitro* technique was carried out owing to the fact that land clearing has to a certain extent reduced the population of this plant species.

The studies include pre-treatment in seed germination to produce source of plant material for further studies, and determination of suitable hormone combinations for formation of plantlets, callus formation from several explants and somatic embryogenesis from callus derived from embryos.

For pre-treatment in seed germination, the studies were carried out in the glasshouse and laboratory. Treatments carried out included excising the ends of seeds, hot water (100°C) treatment for 10 and 30 minutes, H₂SO₄ treatment for



10 and 30 minutes and finally excising the endocarp of the seed where the embryo can be clearly seen. Excision of the endocarp where the embryo was clearly seen gave the highest percentage of germination of 84% (glasshouse) and 80% (laboratory).

For normal development plants from the culture of embryos, various combinations of auxins and cytokinins were attempted. The auxins used were 2,4-D, IBA, IAA, NAA, Picloram and Dicamba while the cytokinins used were 2iP and BAP. Normal shoot and root development of excised embryo was obtained on Tisserat and De Mason (1980) medium containing various combinations including 22 μM 2,4-D and 9.8 μM 2iP (86.7%), 50 μM 2,4-D and 10 μM kinetin (80%), 100 μM IAA and 10 μM kinetin (80%) and, 100 μM NAA and 10 μM kinetin (82%).

Primary roots, young leaves, stem tissues and embryo were used to initiate callus formation. Various combinations of auxins and cytokinins were carried out. The combination include 2,4-D, NAA and Picloram with kinetin (for roots, leaves and stem explants) and other combinations of 2,4-D with 2iP and BAP for embryo explant. In these studies, only embryos formed callus and the highest percentage was obtained on medium containing 400 μM 2,4-D with 10 μM BAP or on medium containing 400 μM 2,4-D combined with 10 μM 2iP in



the presence of activated charcoal and the percentages of nodular callus formed were 56% and 53.3% respectively while non-nodular callus were 44% and 33.3% respectively.

For somatic embryogenesis study, callus derived from the culture of embryos were cultured on medium without any hormone, medium with 2,4-D and combination of 2,4-D with BAP or 2iP. No formation of somatic embryogenesis were observed in all treatments. However, treatment containing 100 μ M 2,4-D formed callus with roots.

