

BAB 4

PENYEDIAAN PROTOKOL UNTUK KAJIAN MIKROPROPAGASI

BAB 4

PENYEDIAAN PROTOKOL UNTUK KAJIAN MIKROPROPAGASI

BAB 4 PENYEDIAAN PROTOKOL UNTUK KAJIAN AWAL MIKROPROPAGASI

4.1 PENGENALAN

Eksperimen ini dijalankan bertujuan untuk mendapatkan satu kaedah bagi mendapatkan sumber eksplan dan teknik pensterilan yang paling sesuai untuk memulakan kajian. Kajian ini hanya menggunakan *Z. officinale* var. *officinale* (halia) dan *K. galanga* untuk mendapatkan satu kaedah yang sesuai dan seterusnya digunakan sebagai rujukan ataupun piawai untuk lain-lain spesies bagi kajian yang seterusnya.

Sumber eksplan adalah sebahagian daripada tisu atau organ tumbuhan yang dipotong untuk memulakan kultur tisu. Kejayaan dan keupayaan sesuatu eksplan adalah dipengaruhi oleh banyak faktor yang diwarisi sesuatu eksplan itu seperti sifat genotip eksplan, saiz eksplan, umur fisiologi dan juga sumber tisu atau organ tumbuhan (Conger, 1981; Hughes, 1981). Kajian yang dilakukan oleh Takayama dan Misawa (1979) terhadap *Lilium auratum* dan *Lilium speciosum* mendapati 53% dari eksplan pedunkel, 75% dari eksplan petal dan 95% dari eksplan mata tunas bebawang menghasilkan umbisi berganda. Manakala eksplan daun dan anter pula tidak memberi sebarang respon. Tisu-tisu tumbuhan yang berlainan takson juga memberikan respon yang berbeza terhadap proses morfogenesis. Hussey (1976) melaporkan bahawa terdapat respon yang berbeza apabila beliau menggunakan

empat jenis sumber eksplan (umbisi, daun, batang infloresen, ovari) untuk medium yang sama. Respon yang berlainan juga diperolehi apabila jenis eksplan yang sama digunakan daripada 12 jenis tumbuhan monokot yang beliau kaji. Beliau mendapati kesemua eksplan bagi Liliaceae, Hyacinthus, Muscari, Ornithogalum dan Scilla menghasilkan plantlet. Bagi Iridaceae dan Amaryllidaceae hanya eksplan umbisi dan batang infloresen sahaja yang memberi respon. Manakala Tulip didapati tidak menunjukkan sebarang respon bagi kesemua eksplan. Ini menunjukkan setiap famili dan spesies berkemungkinan mempunyai respon yang berbeza.

Selain daripada jenis eksplan yang digunakan untuk memulakan kultur tisu, eksplan yang bebas daripada jangkitan mikroorganisma juga adalah diperlukan. Untuk mendapatkan eksplan yang bebas daripada jangkitan, pelbagai kaedah pensterilan boleh dilakukan. Organ dan tisu tumbuhan yang digunakan dicuci atau disterilkan terlebih dahulu dengan menggunakan berbagai jenis agen pensterilan mengikut kepekatan dan masa yang tertentu. Agen pensterilan dan kepekatan yang biasa digunakan ditunjukkan di dalam jadual 4.1.

Bahan pensterilan yang digunakan sebenarnya adalah toksik kepada tumbuhan itu sendiri. Oleh itu, kepekatan yang digunakan dalam tempoh masa olahan tertentu mesti dipilih untuk meminimumkan kematian tisu. Tetapi, sekiranya pendedahan tisu kepada agen pensterilan terlalu singkat tempohnya, mikroorganisma tidak akan terbunuh. Keberkesanan bahan pensterilan bergantung pada kebolehannya bersentuhan dengan mikroorganisma. Sentuhan permukaan dapat

ditingkatkan melalui penggunaan agen pembasah seperti Teepol, Tissanol dan Tween 20 dan sebagainya, ke dalam larutan pensterilan. Selain daripada itu, tekanan udara di dalam bekas kajian perlu dikurangkan dan sentiasa menggoncangkan larutan semasa melakukan pensterilan (Teo, 1992).

Pengubahsuaian daripada kaedah yang diperolehi daripada bab ini akan dilakukan bergantung kepada kesesuaian spesies-spesies kajian yang lain. Tujuan pemilihan spesies *Z. officinale* var. *officinale* (halia) dan *K. galanga* sebagai rujukan adalah disebabkan oleh sumber rizomnya mudah didapati dengan banyak di pasaran. Sumber eksplan yang banyak adalah penting memandangkan pada peringkat pensterilan ini, eksplan adalah diperlukan dengan jumlah yang banyak.

Jadual 4.1 : Bahan pensterilan yang biasa digunakan untuk pensterilan tumbuhan kultur tisu (Razdan,1993).

Bahan	Kepekatan	Jangkamasa pensterilan (min)
Benzalkonium klorida	0.01-0.1%	5-20
Air bromin	1-2%	2-10
Kalsium hipoklorit	9-10%	5-30
Etil alkohol	75-95%	beberapa saat/minit
Hidrogen peroksida	3-12%	5-15
Merkurik klorida	0.1-1.0%	2-10
Silver nitrat	1%	5-30
Sodium hipoklorit	0.5-5%	5-30

4.2 BAHAN DAN KAEDAH

4.2.1 Sumber eksplan

Dalam eksperimen ini, sumber-sumber eksplan yang digunakan ialah sebahagian daun yang dipotong berbentuk empat segi ($1.0-2.0 \text{ cm}^2$), bahagian dalam rizom yang dipotong $0.5-1.0 \text{ cm}^3$, mata tunas pucuk termasuk sebahagian rizom dan tunas pucuk yang aktif memanjang (lebih kurang 4-5 cm panjang) (Lampiran 12)

Kesemua bahagian tumbuhan yang dijadikan eksplan tersebut dilihat kesesuaiannya sebagai eksplan setelah dikulturkan di dalam media MS (Murashige & Skoog, 1962) tanpa hormon (MSO). Pemerhatian dilihat dari segi keupayaan tiap-tiap bahagian tumbuhan tersebut untuk terus hidup di dalam kultur. Dilihat juga tahap jangkitan yang berlaku ketika di dalam media tersebut. Untuk eksperimen ini, teknik pensterilan yang dilakukan oleh Sharma dan Singh (1997) digunakan iaitu dengan penggunaan 0.1% HgCl_2 yang dicampurkan dengan 2 titik Tween 20 selama 10 minit dan kemudiannya dibilas dengan air suling steril sebanyak 3 hingga 4 kali.

4.2.2 Teknik pensterilan

Sumber eksplan yang sesuai yang didapati daripada bahagian 4.2.1 seterusnya dipilih sebagai eksplan untuk eksperimen berikutnya. Eksplan tersebut dilakukan pensterilan semula mengikut kaedah-kaedah pensterilan yang baru berdasarkan pengubahsuaian daripada kajian-kajian yang terdahulu. Tujuannya adalah untuk mencari teknik pensterilan yang dapat mengurangkan peratusan kontaminasi ke tahap yang paling minimum serta membolehkan eksplan terus hidup.

Untuk kajian ini, sebanyak enam teknik pensterilan dilakukan (Lampiran 11). Pensterilan dilakukan berulang kali dengan hanya menggunakan eksplan rizom dan tunas pucuk untuk melihat keberkesanan teknik-teknik steril yang digunakan pada eksplan tersebut. Data-data yang diambil untuk setiap teknik pensterilan ialah bilangan eksplan yang hidup (tiada jangkitan), nekrotik dan ada jangkitan mikroorganisma pada hari pertama, keempat, kelapan dan selepas 30 hari. Jenis jangkitan yang dilihat adalah samada jangkitan disebabkan oleh kulat ataupun bakteria. Data yang diambil menjadi garis panduan dan pemilihan teknik pensterilan yang sesuai.

4.3 KEPUTUSAN

4.3.1 Sumber eksplan

Daripada pemerhatian yang dilakukan (Jadual 4.2), didapati eksplan pertama dan kedua iaitu eksplan daun dan rizom tidak memberi respon yang baik. Bahagian daun didapati bertukar daripada warna hijau ke warna kuning selepas dua hingga tiga minggu di dalam kultur dan seterusnya menjadi nekrotik. Pada eksplan rizom pula terdapat jangkitan mikrob dan ada juga nekrotik selepas sebulan di mana keadaan rizom didapati menjadi sedikit kecut dan berwarna perang dan seterusnya pucuk dan akar tidak terbentuk.

Eksplan ketiga yang digunakan ialah eksplan mata tunas pucuk termasuk sebahagian rizom, dan didapati sebanyak 66.7% ada jangkitan manakala selebihnya didapati hidup iaitu eksplan bertukar warna dari putih ke warna hijau selepas seminggu dan seterusnya mengeluarkan daun dan akar selepas 3-4 minggu di dalam kultur. Berbanding dengan sumber eksplan keempat iaitu dari tunas pucuk yang aktif berkembang, didapati hanya 25.0% sahaja yang dijangkiti manakala selebihnya didapati hidup dan mula mengeluarkan pucuk dan akar selepas 3 minggu dalam kultur.

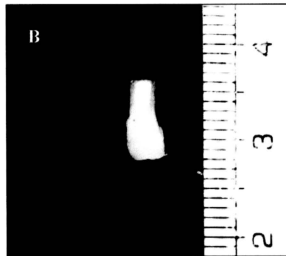
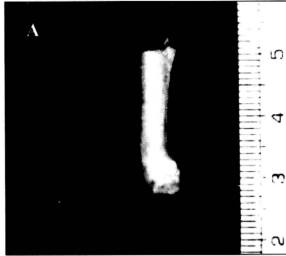
Berdasarkan keputusan yang diperolehi, daripada keempat-empat sumber eksplan yang digunakan seperti dalam jadual 4.2, didapati sumber eksplan yang

paling sesuai untuk memulakan kajian kultur tisu bagi spesies-spesies kajian ialah sumber eksplan daripada bahagian tunas pucuk yang sedang aktif berkembang (Plat 4.1) kerana peratusan jangkitan yang didapati adalah terendah selain daripada menunjukkan penghasilan pucuk dan akar yang cepat.

Plat 4.1 : Tunas pucuk *Z. officinale* var. *officinale* (halia) yang dipilih sebagai eksplan pada awal eksperimen.

A = tunas pucuk yang dipotong lebih kurang 2 sm sebelum pensterilan

B = tunas pucuk yang dipotong lebih kecil (0.8 sm) selepas pensterilan



Jadual 4.2 : Respon oleh empat jenis eksplan yang digunakan untuk melihat kesesuaiannya sebagai sumber eksplan.

Sumber eksplan ^a	Respon dalam kultur
Daun	Kesemua eksplan menjadi nekrotik setelah tiga hingga empat minggu di dalam kultur di mana daun bertukar warna daripada warna hijau kepada warna kuning.
Rizom	Sebanyak 33.3% eksplan didapati nekrotik selepas sebulan dan 66.7% eksplan lagi dijangkiti oleh bakteria.
Mata tunas dan bahagian rizom	Tiada eksplan yang nekrotik tetapi sebanyak 66.7% eksplan dijangkiti dan 33.3% eksplan terus hidup dengan pembentukan bahagian akar dan pucuk.
Tunas pucuk	Tiada eksplan yang nekrotik tetapi sebanyak 25.0% eksplan yang dijangkiti dan 75.0% eksplan lagi terus hidup dengan pembentukan bahagian akar dan pucuk.

^asebanyak 12 replikat digunakan untuk setiap jenis eksplan yang digunakan.

4.3.2 Teknik pensterilan

Teknik-teknik pensterilan yang dilakukan ke atas eksplan-eksplan yang digunakan bertujuan untuk menilai peratusan-peratusan eksplan yang hidup, nekrotik ataupun yang dijangkiti samada oleh kulat atau bakteria. Jenis-jenis jangkitan yang didapati pada eksplan ditunjukkan pada plat 4.2-4.5. Daripada keputusan yang ditunjukkan dalam jadual 4.3, teknik pensterilan yang didapati paling sesuai ialah teknik TS5 (lampiran 11) di mana ditunjukkan bahawa daripada eksplan tunas pucuk

hanya 16.7% eksplan dijangkiti, 11.1% eksplan mati dan sejumlah 72.2% eksplan adalah hidup. Punca jangkitan yang didapati daripada TS5 adalah 100.0% daripada bakteria.

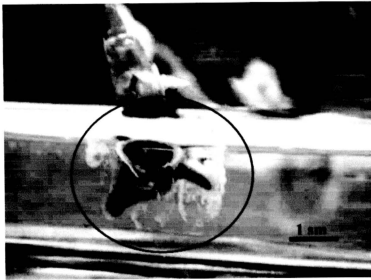
Pada teknik pensterilan TS5 didapati peratusan jangkitan pada hari keempat hanyalah 5.6% untuk eksplan tunas pucuk dan 9.1% untuk eksplan rizom. Ini menunjukkan bahawa teknik TS5 adalah paling sesuai sebagai teknik pensterilan eksplan berbanding dengan teknik pensterilan yang lain yang menunjukkan peratusan jangkitan melebihi 10% pada hari keempat pengkulturan. Begitu juga pada hari kelapan pengkulturan, didapati kedua-dua jenis eksplan menunjukkan peratusan jangkitan yang paling sedikit berbanding dengan teknik pensterilan yang lain. Teknik pensterilan yang menghasilkan eksplan tunas pucuk yang paling banyak jangkitan ialah TS1 iaitu 58.8%, manakala teknik pensterilan yang paling banyak menghasilkan eksplan tunas pucuk yang paling banyak mati ialah TS2 iaitu 60.0%. Didapati juga eksplan yang dijangkiti adalah berpunca daripada bakteria dan kulat di mana peratusan jangkitan bakteria adalah lebih banyak daripada jangkitan kulat iaitu antara 52.9% hingga 100.0% untuk bakteria dan kurang daripada 22.2% untuk kulat bagi kedua-dua jenis eksplan yang digunakan. Bagi eksplan rizom, didapati tiada eksplan yang hidup dan peratusan jangkitan yang disebabkan oleh bakteria adalah lebih tinggi daripada kulat. Bagi TS2, TS5 dan TS6, didapati jangkitan adalah berpunca daripada bakteria (100.0%), manakala bagi TS1, TS3 dan TS4 didapati jangkitan adalah berpunca daripada bakteria dan kulat.

Daripada pemerhatian di dalam kajian ini, penggunaan $HgCl_2$ pada TS3 tidak dapat menghapuskan kulat dan bakteria pada eksplan yang disterilkan. Begitu juga pada teknik pensterilan TS4, masih terdapat jangkitan bakteria dan kulat walaupun $HgCl_2$ digunakan. Peratus jangkitan pada tunas pucuk adalah melebihi 40% bagi kedua-dua teknik ini. Dengan penambahan etanol pada TS5, didapati peratusan jangkitan ini dapat dikurangkan ke tahap yang minimum. Apabila kepekatan $HgCl_2$ dikurangkan kepada hanya 0.1% pada teknik pensterilan TS6, didapati peratus jangkitan bertambah semula pada kedua-dua jenis eksplan yang digunakan. Apabila etanol tidak digunakan dalam pensterilan, contohnya teknik TS4, peratus jangkitan kulat ialah tertinggi iaitu 14.29% dan 22.22% bagi eksplan rizom dan eksplan tunas pucuk masing-masing. Manakala untuk teknik pensterilan yang menggunakan etanol, peratus jangkitan kulat didapati menurun atau tiada contohnya 10% pada TS6 dan tiada jangkitan pada TS5. Daripada keputusan ini, boleh dikatakan bahawa penggunaan etanol dalam kombinasi bahan-bahan pensterilan lain dapat mengurangkan jangkitan yang disebabkan oleh kulat. Manakala penggunaan $NaOCl$ tidak dapat mengurangkan jangkitan samada oleh bakteria ataupun kulat.

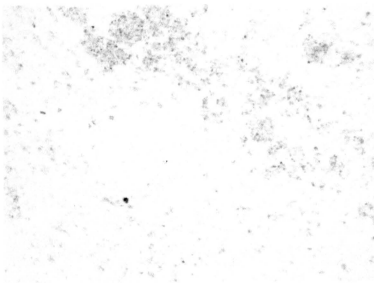
Jadual 4.3 : Peratus kontaminasi eksplan rizom dan tunas pucuk hasil daripada teknik pensterilan yang berbeza.

Teknik Pensterilan	Jenis eksplan	Kontaminasi (%) pada hari ke-4	Kontaminasi (%) pada hari ke-8	Kontaminasi (%) selepas 30 hari	Kontaminasi (% mikroorganisma)
TS1	Rizom	54.2% hidup, 45.8% dijangkiti.	12.5% hidup, 87.5% dijangkiti	0 % hidup, 100% dijangkiti	91.7% bakteria 12.5% kulat
	Tunas pucuk	82.4% hidup, 17.7% dijangkiti	41.2% hidup, 58.8% dijangkiti	23.5% hidup , 58.8% dijangkiti, 17.7% nekrotik.	52.9% bakteria 11.8% kulat
TS2	Rizom	40.0% hidup, 60.0% dijangkiti.	267% hidup, 73.3% dijangkiti.	0 % hidup, 73.3% dijangkiti, 26.7% nekrotik.	100% bakteria
	Tunas pucuk	80.0% hidup, 20.0% dijangkiti	80.0% hidup, 20.0% dijangkiti.	20.0% hidup , 200% dijangkiti, 60.0% nekrotik.	90.0% bakteria 20.0% kulat.
TS3	Rizom	72.7% hidup, 27.3% dijangkiti.	54.5% hidup, 45.5% dijangkiti.	0 % hidup, 72.7% dijangkiti, 27.3% nekrotik.	93.8% bakteria 18.8% kulat
	Tunas pucuk	60.0% hidup, 40.0% dijangkiti.	45.0% hidup, 55.0% dijangkiti.	35.0% hidup , 55.0% dijangkiti, 10.0% nekrotik	90.9% bakteria 18.2% kulat
TS4	Rizom	90.0% hidup, 10.0% dijangkiti.	80.00% hidup, 20.00% dijangkiti.	0% hidup, 35.0% dijangkiti, 65.0% nekrotik.	85.7% bakteria 14.3% kulat
	Tunas pucuk	95.3% hidup, 4.8% dijangkiti.	81.0% hidup, 19.1% dijangkiti	42.9% hidup , 42.9% dijangkiti, 14.3% nekrotik.	77.8% bakteria 22.2% kulat.
TS5	Rizom	90.9% hidup, 9.09% dijangkiti.	81.8% hidup, 18.2% dijangkiti	0 % hidup, 36.4% dijangkiti, 63.7% nekrotik.	100% bakteria
	Tunas pucuk	94.4% hidup, 5.7% dijangkiti	88.9% hidup, 11.1% dijangkiti	72.2% hidup , 16.7% dijangkiti, 11.1% nekrotik	100% bakteria
TS6	Rizom	76.0% hidup, 24.0% dijangkiti.	64.0% hidup, 36.0% dijangkiti.	0 % hidup, 68.0% dijangkiti, 32.0% nekrotik	100% bakteria
	Tunas pucuk	78.9% hidup, 21.1% dijangkiti.	57.9% hidup, 42.1% dijangkiti.	31.6% hidup , 52.6% dijangkiti, 15.8% nekrotik	90.0% bakteria 10.0% kulat

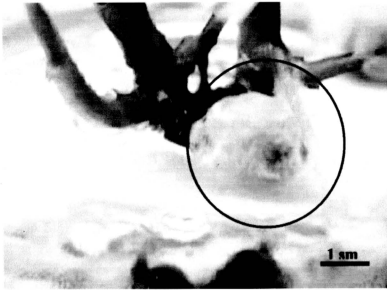
Plat 4.2 : Jangkitan bakteria (bulatan) pada bahagian eksplan tunas pucuk dalam media kultur.



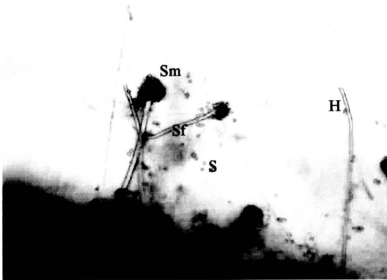
Plat 4.3 : Bakteria yang telah dipencilkan dan dilihat di bawah pembesaran 100X yang berbentuk kokus.



Plat 4.4 : Jangkitan kulit (bulatan) pada bahagian eksplan pucuk pada media kultur



Plat 4.5 : Kulit yang dipencilkan dan dilihat di bawah pembesaran 200X yang menunjukkan struktur hifa (H), sporangiofor (Sf), sporangium (Sm) dan spora (S).



4.4 PERBINCANGAN

Di dalam kajian kultur tisu, setiap eksplan atau bahagian tanaman seperti pucuk, daun, akar, batang, petiol dan sebagainya mempunyai keupayaan untuk regenerasi (Staba, 1980). Keupayaan setiap eksplan untuk membentuk satu individu lengkap banyak bergantung kepada kombinasi hormon auksin dan sitokinin yang sesuai pada media yang optima. Faktor-faktor lain seperti sumber karbon dan tenaga, formulasi media, pH media, saiz eksplan, sumber eksplan, umur fisiologi eksplan, polariti eksplan, cahaya dan suhu turut mempengaruhi kejayaan sesuatu kajian kultur tisu untuk mendapatkan regenerasi lengkap tumbuhan.

Berdasarkan kajian-kajian terdahulu, kajian kultur tisu ke atas tumbuhan daripada famili Zingiberaceae hanya menggunakan media asas Murashige dan Skoog (1962). Formulasi media ini didapati terbaik untuk kajian kultur tisu kerana mempunyai komposisi nitrat, kalium dan ammonianya yang tinggi. Sumber karbon dan tenaga yang utama digunakan di dalam media kultur adalah sukrosa. Sukrosa biasanya ditambah dengan kepekatan di antara 20-45 g/l (Dodds dan Roberts, 1982). Di dalam kajian ini sebanyak 30 g/l sukrosa digunakan. Sebanyak 2 g/l agar jenis fitagel telah digunakan kerana didapati kadar yang melebihi 2 g/l (ataupun 8 g/l bagi agar teknikal) boleh mengganggu proses osmosis dan mengurangkan keberkesanan penyerapan nutrien dan sebatian organik oleh tisu atau eksplan tumbuhan (Murashige dan Skoog, 1962; Hughes, 1981). pH media pula yang digunakan adalah antara 5.6 hingga 5.8 kerana julat ini didapati sesuai untuk penyerapan nutrien dan

menggalakkan pertumbuhan (Hughes, 1981). pH yang kurang daripada 4.5 atau lebih daripada 7.0 didapati menyebabkan pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan di dalam sistem kultur *in vitro* terencat. Ia juga menyebabkan kandungan nutrien di dalam media berada di dalam keadaan tidak boleh diserap serta menyebabkan sukrosa bertukar menjadi glukosa dan fruktosa selepas diautoklaf (Conger, 1981).

Kajian awal dilakukan terlebih dahulu untuk mendapatkan satu protokol bagi menentukan sumber eksplan dan teknik pensterilan yang paling sesuai untuk memulakan kajian. Di dalam kajian ini hanya *Z. officinale* var. *officinale* (halia) dan *K. galanga* digunakan sebagai spesies rujukan kepada spesies-spesies lain yang akan turut dikaji. Didapati sumber eksplan yang paling sesuai untuk digunakan sebagai pemula kultur tisu ialah eksplan tunas pucuk. Eksplan-eksplan lain seperti daun dan rizom didapati tidak sesuai. Ini adalah kerana eksplan-eksplan tersebut tidak memberi sebarang tindakbalas terhadap media yang digunakan. Begitu juga dengan peratusan jangkitan mikrob yang tinggi pada eksplan bahagian rizom. Ini boleh dilihat dalam jadual 4.2 yang menunjukkan respon setiap bahagian eksplan yang digunakan di dalam media MS tanpa hormon. Bahagian-bahagian eksplan tersebut tidak memberikan respon adalah berkemungkinan disebabkan oleh penggunaan media yang tidak sesuai. Pada peringkat ini ditetapkan hanya media MS tanpa penambahan hormon digunakan. Setakat ini tiada laporan penggunaan eksplan bahagian daun dan rizom digunakan untuk memulakan kajian kultur tisu untuk mendapatkan regenerasi langsung bagi spesies-spesies daripada famili Zingiberaceae. Terdapat satu laporan iaitu daripada Kackar *et al.* (1993) yang

menggunakan eksplan pucuk daun muda untuk menghasilkan kalus (regenerasi tidak langsung) dengan penggunaan hormon-hormon seperti IAA, NAA, 2,4-D dan dicamba (Banvel D bersama 40%(w/w) dicamba). Seperti yang diketahui gen-gen yang ada di dalam setiap sel iaitu di dalam bahagian organ daun adalah kekal tidak aktif di dalam tisu yang telah terbeza tersebut dan hanya boleh berkembang apabila berada di dalam keadaan media kultur yang sesuai. Dengan penggunaan media tanpa hormon mungkin menyediakan keadaan yang tidak sesuai untuk eksplan daun memberikan respon yang positif dan menyebabkan ianya menjadi nekrotik. Hormon memainkan peranan penting di dalam mengawalatur tumbesaran dan pembentukan morfogenesis di dalam kultur tisu. Sitokinin dilaporkan boleh melanjutkan proses metafasa di dalam mitosis dan diperlukan untuk mengawalatur sintesis protein yang terlibat di dalam pembentukan gelendung sel (Jouanneau dan Tandeau de Marsac, 1973; Jouanneau, 1975). Kekurangan sitokinin pula boleh menyebabkan pembahagian sel nukleus terhenti pada satu peringkat dalam kitaran sel (Jouanneau dan Tandeau de Marsac, 1973).

Eksplan tunas pucuk yang sedang berkembang yang dijadikan sumber eksplan didapati memberikan respon yang terbaik untuk mendapatkan regenerasi terus pucuk baru dan hanya 25% daripada eksplan tersebut dijangkiti oleh mikrob. Tiada eksplan tunas pucuk yang mati jika dibandingkan dengan eksplan daun dan rizom. Pertumbuhan semula yang dilihat pada eksplan tunas pucuk adalah lebih cepat daripada eksplan mata tunas. Keadaan ini mungkin disebabkan oleh eksplan mata tunas yang belum berkembang yang mungkin masih di dalam keadaan dorman

iaitu bahagian meristematiknya masih belum aktif membahagi dan tiada hormon eksogenus dibekalkan untuk menghasilkan pucuk baru. Manakala eksplan tunas pucuk yang telah berkembang mungkin sudah melepasi tempoh dorman dan kemungkinan adanya hormon endogenus sitokinin yang terlibat. Keadaan ini dapat dilihat pada pembiakan secara konvensional bagi spesies-spesies halia di mana mata tunas pada bahagian rizom mengambil masa yang lama untuk berkembang menjadi tunas pucuk baru. Apabila tunas tersebut mula berkembang dan memanjang, ia hanya mengambil masa yang singkat untuk menjadi satu tunas pucuk ('tiller') yang baru. Oleh sebab itu, apabila mata tunas digunakan sebagai sumber eksplan, dapat dilihat perkembangannya lebih lambat berbanding dengan eksplan tunas pucuk yang sudah berkembang. Eksplan tunas pucuk yang aktif memanjang yang digunakan juga mungkin sudah mempunyai hormon sitokinin endogenus yang tersedia, dengan itu apabila tunas pucuk tersebut dipotong untuk dijadikan eksplan, ia akan berkembang dengan lebih cepat dan pengeluaran tunas apikal dapat dilihat hanya dalam beberapa hari sahaja apabila diletakkan dalam media permulaan (MSO). Mengikut Teo (1992), tunas yang dipencilkan daripada tumbuhan yang berada di dalam keadaan dorman lebih susah dikulturkan secara *in vitro* daripada tunas yang dipencilkan daripada tumbuhan yang tidak dorman.

Jangkitan yang lebih tinggi iaitu 66.7% pada eksplan mata tunas pucuk bersama rizom adalah mungkin disebabkan oleh adanya bahagian rizom yang terlibat. Daripada keputusan yang diperolehi, eksplan rizom jelas memberikan peratusan jangkitan tertinggi iaitu 66.7% (Jadual 4.2) dan tidak sesuai untuk

digunakan sebagai eksplan. Peratusan jangkitan yang tinggi pada eksplan rizom berkemungkinan berpunca daripada keadaan asalnya di dalam tanah yang mengandungi banyak mikroorganisma dan pensterilan yang dilakukan adalah tidak mencukupi untuk membunuh mikroorganisma tersebut sebaliknya menyebabkan sel-sel tumbuhan itu mati. Jangkitan dalaman mungkin juga adalah penyebab utama kepada jangkitan yang berlaku pada eksplan rizom. Jangkitan ini mungkin kekal di dalam eksplan untuk satu tempoh yang singkat dan akan keluar pada bila-bila masa di dalam media kultur.

Kajian juga telah dilakukan untuk mencari teknik pesterilan yang terbaik. Secara amnya, untuk mendapatkan sumber eksplan yang steril bukannya mudah kerana dalam proses pensterilan semua aktiviti biologi sel sumber eksplan tidak boleh dirosakkan melainkan untuk menghapuskan mikroorganisma sahaja. Bahagian organ dan tisu tumbuhan sebenarnya dirawat di bahagian permukaannya sahaja oleh agen-agen pensterilan yang digunakan pada kepekatan yang sesuai dalam masa yang tertentu. Biasanya mikroorganisma ini tidak patogenik kepada tisu tumbuhan, tetapi mesti dimusnahkan sebelum organ dikultur kerana mikroorganisma tersebut dapat tumbuh di dalam medium kultur tisu dan akan bersaing dengan pertumbuhan dan perkembangan eksplan.

Dalam kajian ini, sebanyak 6 teknik pensterilan telah dicuba dan melibatkan penggunaan agen pensterilan seperti NaOCl, HgCl₂, etanol dan Tween 20 (Lampiran 11). Didapati teknik pensterilan yang dapat mengurangkan peratus jangkitan ke

tahap minima dan tidak merosakkan sel-sel tisu tumbuhan ialah dengan penggunaan teknik TS5. Penggunaan $HgCl_2$ dilihat memainkan peranan penting dalam kajian ini untuk mendapatkan sumber eksplan yang bebas daripada jangkitan mikrob. Penggunaan NaOCl sahaja didapati tidak dapat mengurangkan peratusan jangkitan bagi spesies-spesies dari famili halia. Keputusan ini adalah hampir sama dengan keputusan kajian oleh Hosoki dan Sagawa (1977) yang melaporkan bahawa peratusan jangkitan yang paling tinggi didapati di dalam kultur apabila eksplan disterilkan dengan menggunakan NaOCl selama 10 minit.

Seperti yang diketahui, spesies daripada famili halia adalah spesies yang mempunyai pembiakan vegetatif di bawah permukaan tanah. Dengan itu sumber eksplan yang diperolehi iaitu bahagian pangkal tunas pucuk yang juga adalah berasal dari bawah permukaan tanah dan ini memberikan risiko yang tinggi untuk dijangkiti bakteria apabila eksplan tersebut dikulturkan di dalam media kultur. Maka kaedah pensterilan yang sesuai adalah sangat diperlukan termasuklah terlebih dahulu membasuh bahagian tumbuhan yang hendak digunakan dengan air paip dan sabun sebelum memulakan kaedah pensterilan yang seterusnya. Air sabun dapat mengurangkan tegangan permukaan dan sentuhan permukaan dapat ditingkatkan dan membenarkan air mencuci di kawasan celah-celah bahagian eksplan yang digunakan terutamanya bahagian rizom. Balacandran *et. al.* (1990) mengatakan bahawa untuk mendapatkan kultur spesies daripada famili halia yang bebas dari jangkitan mikroorganisma adalah amat sukar. Ini disebabkan oleh sumber eksplannya yang diambil daripada bahagian rizom yang berada di dalam tanah.

Mereka melaporkan hampir 50% kontaminasi berlaku di dalam kultur untuk spesies tersebut.

Daripada laporan kajian-kajian terdahulu, hampir kesemuanya menggunakan HgCl_2 untuk mensterilkan sumber eksplan spesies-spesies famili halia. Kepekatan HgCl_2 yang digunakan ialah antara 0.1-0.5%. Penggunaan HgCl_2 ini dilaporkan dapat mengurangkan jangkitan sehingga 40% (Sharma dan Singh, 1997). Secara keseluruhannya, penggunaan kombinasi NaOCl , HgCl_2 dan etanol pada TS4, TS5 dan TS6 didapati dapat menurunkan peratus jangkitan ke tahap yang minimum. Penggunaan HgCl_2 di dalam teknik pensterilan bagi spesies daripada famili Zingiberaceae adalah kerap dilaporkan oleh penyelidik-penyelidik di dalam mensterilkan eksplan yang akan digunakan. Contohnya ialah penggunaan 0.5% HgCl_2 (Nirmal Babu *et al.*, 1992; Salvi *et al.*, 2002), 0.2% HgCl_2 (Borthakur *et al.*, 1999) dan 0.1% HgCl_2 (Sharma dan Singh, 1997). Penggunaan HgCl_2 ini dilaporkan paling sesuai untuk mendapatkan eksplan yang bebas daripada jangkitan kerana agen pensterilan tersebut merupakan bahan kimia yang lebih toksik berbanding dengan agen pensterilan yang lain. Tahap ketoksikan yang tinggi tersebut banyak membantu di dalam menghapuskan mikroorganisma dengan lebih senang. Sebenarnya HgCl_2 adalah bersifat mengkakis dan boleh memasuki dan memendakkan protein dengan bertindakbalas dengan asid-asid amino termasuklah thiol, amino, imidazole, fosfat dan kumpulan hidroksil (Woods dan Ellis, 2000). Oleh itu penggunaannya dengan cara berhati-hati adalah amat dititikberatkan. Di dalam pensterilan eksplan, kepekatan yang rendah digunakan untuk mengelakkan

tisu-tisu eksplan tersebut daripada mati. Namun, Sharma dan Singh (1997) mendapati lebih daripada 40% eksplan masih dijangkiti oleh bakteria dan kulat selepas 12 hari di dalam kultur walaupun disterilkan dengan HgCl_2 . Hosoki dan Sagawa (1977) juga melaporkan peratusan jangkitan yang paling tinggi didapati di dalam kultur apabila eksplan disterilkan dengan menggunakan 0.5% (i/i) NaOCl selama 10 minit.

Daripada keputusan kajian ini, didapati penggunaan HgCl_2 pada teknik TS5 berjaya mengurangkan jangkitan sehingga 16.67% pada eksplan tunas pucuk dan 36.36% pada eksplan rizom. Melalui teknik TS5, jangkitan eksplan masih wujud mungkin disebabkan oleh bakteria pendam di dalam sel-sel tumbuhan yang tidak dimasuki atau tidak berjaya disterilkan oleh agen pensterilan yang digunakan. Ini dapat dibuktikan dengan jangkitan yang mula berlaku apabila eksplan di dalam media kultur melebihi empat minggu dan bukan serta merta. Keadaan yang sama juga terjadi apabila eksplan disubkultur ke dalam media baru. Jangkitan bakteria yang berlaku dilihat berpunca daripada bahagian eksplan yang dipotong. Ini membuktikan bahawa masih terdapat bakteria yang pendam di dalam bahagian eksplan tumbuhan dan hanya keluar dan menjangkiti media kultur setelah dipindahkan atau disubkulturkan ke dalam media baru. Sesuatu kultur kelihatan steril hanya pada satu tempoh jangkapendek pengkulturan dan mendapat jangkitan bakteria dalam satu tempoh yang panjang. Jika kawasan jangkitan ialah tisu dalaman, jangkitan akan kelihatan apabila kawasan jangkitan bersentuhan dengan media semasa pengsubkulturan. Jangkitan dalaman tersebut biasanya diakibatkan

oleh bakteria rod atau basillus dan biasanya dirujuk sebagai 'white ghost' (Teo, 1992). Jangkitan dalaman ini tidak mudah diatasi kerana mikroorganisma hadir di dalam tisu itu sendiri. Terdapat beberapa cara yang boleh digunakan untuk mengatasi masalah ini iaitu di antaranya ialah menggunakan tisu meristem yang terencil ataupun menambahkan antibiotik ke dalam media kultur di mana penggunaannya adalah tidak semestinya berkesan dan tidak digalakkan penggunaannya. Mengikut laporan yang lain (Knaus dan Miller, 1978), kebanyakan jangkitan (*Pseudomonas* sp., *Erwina* sp. and *Bacillus* sp.) mungkin berterusan tanpa diketahui untuk beberapa generasi dan boleh menyebabkan tumbuhan tidak sihat ataupun klorosis berlaku ke atas plantlet kultur tisu. Sharma dan Singh (1997) pula melaporkan bahawa apabila berjaya memperolehi satu eksplan kultur yang bebas daripada kontaminasi, maka keadaan menjadi lebih senang untuk mengekalkan plantlet apabila disubkulturkan ke dalam media baru.