

BAB 1

PENGENALAN

BAB 1

PENGENALAN

Sel merupakan unit asas bagi semua organisma hidup. Sesuatu organisma mungkin terdiri dari satu sel (unisel) atau berbilang sel (multisel). Sel-sel yang berbilang akan membentuk tisu, kemudian tisu-tisu akan membentuk organ dan seterusnya menghasilkan satu sistem dalam organisma iaitu haiwan atau tumbuhan. Ciri asas organisma hidup ini ialah kebolehan untuk tumbesaran dan boleh dikaitkan dengan pertambahan dalam saiznya. Menurut Sinnott (1960), tumbesaran sentiasa berkadar terus dengan pertambahan bilangan sel melalui pembahagian sel. Wareing dan Philips (1981) pula, merumuskan tumbesaran sebagai perubahan saiz sel, organ atau seluruh organisma. Perkataan 'tumbesaran' digunakan merujuk kepada perubahan kuantitatif yang melibatkan pertambahan bilangan sel yang dicapai melalui pembahagian sel dan ianya adalah satu proses yang berterusan.

Dalam tumbuhan, pembahagian dan pembezaan sel berlaku secara intensif di bahagian meristem apeks akar dan pucuk. Pembezaan adalah suatu penyataan mengenai pembahagian secara giat di dalam sel atau koloni sel untuk membentuk organ yang lebih spesifik dari segi fungsinya dan sifat ini merupakan satu ciri spesifik bagi organisma hidup (Sinnott, 1960).

Dalam tumbuhan strukturnya lebih ringkas berbanding dengan haiwan, di mana ia terdiri dari empat jenis tisu utama iaitu tisu meristem, tisu vaskular, tisu epidermis dan tisu asas. Tisu-tisu ini membentuk bahagian vegetatif tumbuhan seperti daun, batang dan akar. Kawasan tisu meristem adalah satu lingkungan di mana berlakunya pembahagian dan tumbesaran sel .

Tisu asas terdiri daripada tiga jenis sel iaitu sel parenkima, kolenkima dan sklerenkima. Sel parenkima merupakan sel yang terbanyak di dalam tumbuhan dan mempunyai jenis-jenis yang khusus bergantung kepada fungsinya. Contohnya sel klorenkima adalah sel parenkima yang mempunyai kloroplas dan berfungsi untuk fotosintesis, manakala sel aerenkima penting untuk pertukaran gas dalam interselular. Sel kolenkima berdinding tebal yang terdiri dari selulosa dan hemiselulosa, di mana ia berfungsi untuk memberi sokongan. Sel sklerenkima pula terdiri dari dua jenis iaitu sel sabut dan sel batu.

Tisu epidermis adalah tisu yang menyelitupi tumbuhan. Ia mempunyai berbagai fungsi, termasuklah untuk serapan, perlindungan, kawalan pertukaran gas dan rembesan. Berdasarkan kepada fungsi-fungsi yang berlainan ini, tisu epidermis membentuk struktur seperti stomata untuk pertukaran gas di antara alam sekitar dan bahagian dalaman tumbuhan. Selain daripada itu, trikom yang terbentuk samada unisel atau multisel juga merupakan salah satu pengubahsuaian tisu epidermis.

Tisu vaskular atau tisu penyalur adalah khusus untuk pengangkutan air dan bahan terlarut. Ia terdiri dari floem dan zilem yang dihasilkan dari kambium vaskular. Ada dua jenis sel penyalur pada zilem iaitu trakeid dan vesel. Trakeid mempunyai dinding tepi berliang dan vesel adalah struktur berliang pada hujungnya untuk mengalirkan air.

Satu kawasan di mana sel-selnya giat membahagi dipanggil meristem. Ada tiga jenis meristem dalam tumbuhan iaitu meristem apeks, meristem lateral dan meristem interkalari. Meristem apeks terletak pada hujung akar dan pucuk, menghasilkan tisu primer. Meristem ini penting untuk tumbesaran primer, iaitu pemanjangan pucuk dan akar. Meristem apikal pucuk dilindungi oleh daun muda manakala meristem apikal akar dilindungi oleh jidal akar. Meristem lateral terletak pada kawasan subapikal akar dan pucuk tumbuhan berkayu. Ia menghasilkan tumbesaran sekunder dalam tumbuhan. Meristem interkalari biasanya didapati pada bahagian buku dalam tumbuhan rumput.

Pemanjangan akar dan pucuk berlaku di bahagian hujung di mana terdapatnya meristem apeks. Pusat kuisen adalah satu kawasan di mana bilangan sel-selnya adalah tinggi (Clowes,1958). Sel-sel pada kawasan kuisen adalah berbeza dengan sel meristem akar yang lain di mana dinding selnya tebal, kandungan ribosomnya tinggi dalam sitoplasma, mitokondria dan jasad Golgi yang kecil, kadar sintesis DNA rendah, kurang kandungan DNA per sel, nukleus yang kecil dengan kandungan RNAnya rendah, serta kadar sintesis RNA dan

protein juga rendah. Nukleus sel kuisen adalah sangat sensitif dan mudah mengalami kerosakan. Oleh itu, sel-sel dalam kawasan kuisen ini mempunyai totipotensi yang tinggi.

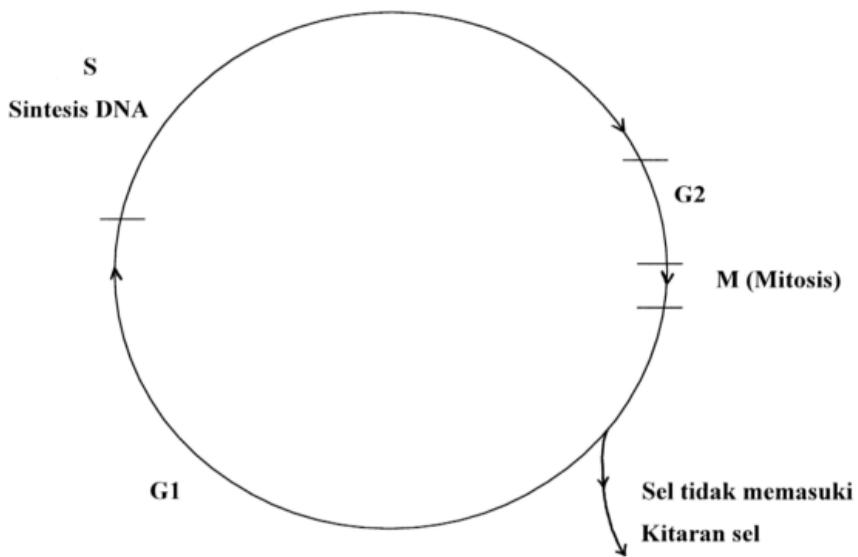
Kajian mengenai pembahagian sel juga telah banyak dilakukan menggunakan akar berbanding pucuk (Bertaud *et al.*, 1986). Sel-sel di meristem apeks adalah berdinding nipis dan mempunyai vakuol yang kecil. Sel yang berada di zon yang berbeza pada meristem apeks menunjukkan perubahan struktur yang berlainan, bergantung kepada fungsi meristem tersebut. Sel-sel yang giat membahagi dipanggil sel meristematisik.

Tumbuhan bermula dari satu sel yang giat membahagi secara berulang-ulang dan sel yang giat membahagi adalah sel yang terdapat pada batang, hujung akar dan pucuk. Di kawasan ini perkembangan dan pembahagian selular berlaku secara serentak supaya tumbesaran sentiasa berlaku dalam tumbuhan. Pembahagian sel atau mitosis penting untuk semua proses perkembangan sel. Melalui proses mitosis, sel induk dan sel anak mempunyai komposisi genetik yang sama. Setiap maklumat genetik di dalam kromosom diwarisi dari induk diturunkan kepada zigot yang diwariskan ke dalam sel melalui proses pembahagian mitosis. Kromosom terdiri daripada rantai DNA yang mengandungi gen dan protein yang berbeza. Gen inilah yang menentukan semua aspek pembentukan sesuatu hidupan. Jenis protein yang disintesiskan oleh

tumbuhan, bergantung kepada gen yang diwarisi dari induk tumbuhan berkenaan.

Pengukuran kadar relatif pembahagian sel pada masa tertentu dan penentuan frekuensi mitosis sel dipanggil indeks mitosis (MI). Walau bagaimanapun telah dikenal pasti bahawa terdapat fasa perantaraan yang panjang di antara proses mitosis iaitu interfasa. Interfasa terbahagi kepada 3 fasa iaitu G₁, G₂ dan S. Fasa ini melibatkan siri proses metabolismik yang sangat penting dalam proses pembahagian sel. Turutan aktiviti metabolismik yang teratur yang dilalui oleh sel dipanggil kitaran sel atau edaran sel seperti ditunjukkan dalam Rajah 1 (Baserga, 1965).

Rajah 1 menunjukkan sel anak mungkin memasuki kitaran sel seterusnya (G₁, S dan G₂) atau tidak terus membahagi. Sel-sel yang keluar dari edaran sel ini mungkin mati atau menjadi sel yang tidak membahagi seperti sel-sel dalam lumen yang tidak mengalami pembahagian mitosis. Peredaran atau kitaran sel-sel dari satu fasa ke fasa berikutnya, bermula dengan mitosis, seterusnya ke G₁, S dan G₂ kemudian memasuki mitosis semula dinamakan kitaran sel atau edaran sel (Howard dan Pelc, 1953).



Rajah 1 : Kitaran Sel dan Fasa-Fasa Komponen G1, G2, S dan M

Kajian mengenai edaran sel penting untuk mengawal dan memahami tumbesaran, regenerasi, perkembangan embrio, pembezaan sel, ekologi mikrobial dan patologi. Pembahagian sel yang tidak terkawal boleh menimbulkan masalah seperti terjadinya kanser di mana kadar pembahagian sel adalah lebih cepat dan di luar kawalan berbanding dengan kadar yang diperlukan untuk mengekalkan saiz tisu normal.

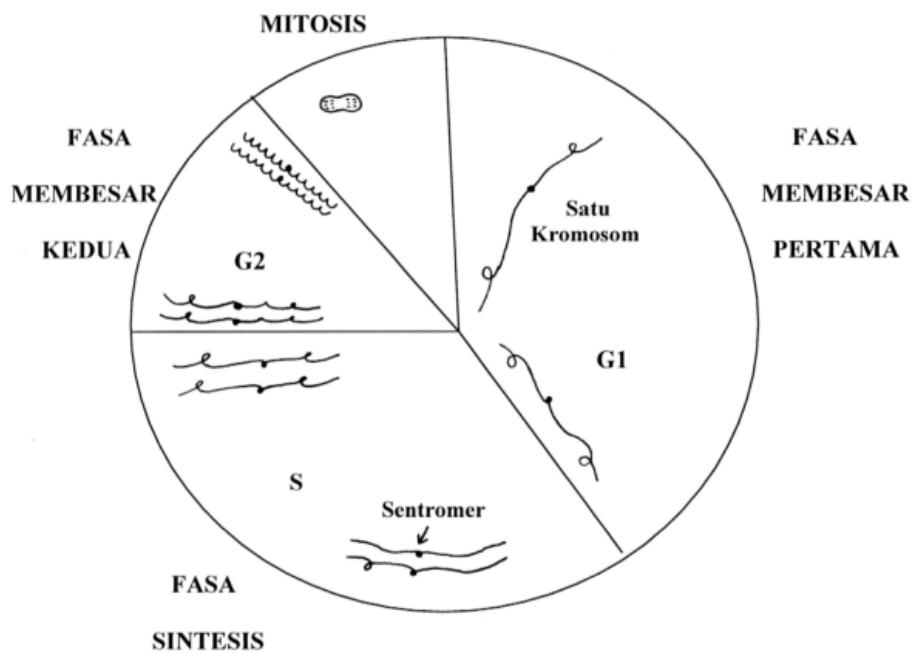
Berbagai-bagai teknik digunakan untuk mengukur tempoh edaran sel. Tempoh edaran sel dianggarkan dengan menggunakan beberapa kaedah seperti 'continuous labelling', 'Pulse labelling' dan 'double labelling'. Ketiga-tiga kaedah tersebut menggunakan bahan radioaktif untuk menandakan DNA sel dan teknik autoradiografi. 'Pulse labelling' merupakan teknik yang biasa digunakan dan kaedah ini membolehkan tempoh keseluruhan edaran sel dan setiap fasa komponen edaran sel diukur. Semasa penandaan DNA ini, sel-sel akar yang berada pada fasa S akan menyerap Metil-³H-timidin dan seterusnya bergabung dengan DNA. Pertalian antara peratus mitosis yang bertanda dan masa selepas bahan radioaktif diberi, membolehkan tempoh edaran sel dan fasa-fasa komponennya dianggarkan. Prinsip yang digunakan adalah untuk menghalang berlakunya edaran sel pada suatu peringkat tertentu dengan menambahkan nutrien atau pengubahsuaian persekitaran fizikalnya.

Kajian mengenai kitaran sel adalah satu cara untuk memahami jangka masa dan peringkat pembahagian dan pembezaan sel. Kitaran sel terdiri dari

dua fasa, iaitu fasa tumbesaran sel (interfasa) dan fasa pembahagian atau pemisahan sel (mitosis dan sitokinesis). Jangka masa yang diambil untuk satu edaran sel adalah berbeza bagi jenis sel yang berlainan. Dalam sel yang mempunyai tempoh kitaran yang panjang, DNA digandakan dengan kadar yang lebih rendah (Hamdan, 1986); berbanding dengan sel yang mempunyai edaran hidup yang singkat. Semasa fasa S, DNA digandakan dan jika masa penggandaan ini panjang, maka ini akan mempengaruhi jangka masa edaran sel secara keseluruhannya.

Interfasa terdiri dari tiga fasa iaitu fasa G₁, fasa S dan fasa G₂ (Rajah 2)(D'Amato, 1990). Semasa fasa G₁, sel yang terhasil dari pembahagian mitosis akan mengalami tumbesaran. Kromosom dalam nukleus sel giat mengutus maklumat gen supaya protein dapat disintesiskan untuk membentuk protoplasma dan enzim-enzim bagi menjalankan aktiviti sel. Aktiviti sel yang berjalan dengan lancar membolehkan sel membesar. Fasa S adalah fasa di mana kromosom menjalani proses replikasi bahan genetiknya. Pada peringkat ini proses tumbesaran dan aktiviti metabolisme sel menjadi perlahan disebabkan mRNA tidak boleh dihasilkan dalam peringkat ini. Walau bagaimanapun, proses replikasi tidak berlaku sekaligus bagi semua kromosom. Oleh itu proses metabolisme masih boleh berlaku.

Pada akhir peringkat S, setiap kromosom telah lengkap berganda tetapi pasangan kromosom ini masih tercantum pada sentromer. Setiap satu daripada



Rajah 2 : Edaran sel yang menunjukkan fasa tumbesaran sel dan fasa pembahagian sel.

pasangan kromosom ini disebut kromatid. Apabila sel diploid memasuki fasa S, kandungan DNanya adalah 2C dan kandungan DNA menjadi 4C apabila ia menamatkan fasa S (Howard dan Pelc, 1953; Van't Hof, 1985). 1C ditakrifkan sebagai kuantiti DNA dalam genom haploid yang belum mengalami replikasi. Dalam fasa G2, gen boleh menjalankan fungsinya dengan aktif di mana mRNA dihasilkan dan aktiviti metabolisme sel berjalan dengan lancar. Sel terus membesar dan bersedia untuk membahagi. Kromosom yang panjang dan berjalin-jalin mula melingkar dan menjadi padat dan pendek. Fasa ini adalah fasa pertengahan di antara sintesis DNA dan mitosis dengan kandungan DNanya menjadi 4C.

Dari segi struktur, gen ialah jujukan nukleotida dalam DNA yang terdiri daripada dua utas rantai asid nukleik yang berpilin secara heliks. Jujukan bes dalam nukleotida ini merupakan maklumat yang diperlukan untuk menentukan jujukan asid amino dalam sesuatu rantai polipeptida. Satu gen menyediakan maklumat untuk pembentukan sejenis protein. Pasangan bes dalam rantai DNA ini teratur dalam jujukan yang tertentu untuk membentuk gen-gen yang berlainan. Jujukan triplet dalam rantai DNA ini bertindak sebagai kod yang menentukan jujukan asid amino dalam protein. Oleh itu gen merupakan jujukan kod tiga bes atau triplet dalam rantai DNA yang menentukan struktur sistem protein. Setiap kod yang terdiri daripada tiga bes itu bertanggungjawab ke atas sejenis asid amino. Berdasarkan kepada analogi tersebut, bes boleh diandaikan sebagai huruf, kod sebagai perkataan, gen sebagai ayat, molekul DNA sebagai

perenggan dan keseluruhan maklumat gen atau genom dalam semua molekul DNA sebagai sebuah karangan.

Suatu asid amino boleh ditentukan oleh lebih daripada satu kod di mana kod genetik ialah bahasa sejagat yang digunakan oleh semua jenis sel hidupan. Walaupun begitu, terdapat perbezaan dalam jujukan kod yang menentukan jujukan asid amino dalam beberapa jenis protein antara spesies. Oleh itu spesies yang berlainan mempunyai beberapa jenis protein yang berbeza dan inilah yang menyebabkan perbezaan struktur dan fungsi antara spesies (Hamdan, 1986).

Peringkat mitosis atau peringkat pembelahan sel adalah peringkat terakhir bagi satu kitaran sel (Hamdan, 1986). Pertambahan DNA, RNA dan protein dalam sel berlaku pada peringkat-peringkat tertentu dan peringkat tersebut ialah profasa, metafasa, anafasa dan telofasa. Semasa profasa, setiap kromatid bersedia untuk berpisah dari pasangannya bagi membentuk nukleus anak yang bakal dihasilkan. Pada mulanya, kromosom berlingkar dan menjadi lebih padat dan pendek. Membran nukleus dan nukleolus mula merosot. Kedua-dua kromatid dalam satu kromosom masih tercantum di sentromer. Pada akhir profasa, kromosom mula beratur di satah khatulistiwa. Gelendong mula terbentuk di antara sentriol yang mula bergerak mengarah ke pinggir yang bertentangan. Kawasan pinggir di mana sentriol berada disebut kutub.

Pada peringkat metafasa pula, membran nukleus dan nukleolus telah merosot. Gelendong telah pun terbentuk dengan sempurna merentasi kromosom yang beratur di satah khatulistiwa. Gelendong ini menyambungkan sentromer dengan sentriol. Semasa fasa ini, bilangan kromosom boleh dikira, saiz dan bentuknya juga boleh ditentukan. Metafasa berakhir apabila sentromer berpecah, iaitu dua kromatid yang membentuk satu kromosom berantai dubel, menjadi kromosom berantai tunggal. Oleh itu, bilangan kromosom telah berganda dua. Fasa anafasa bermula dua set kromosom yang lengkap mula berpisah, setiap set menuju ke kutub (sentriol) yang berasingan. Pemisahan ini dibantu oleh gelendong yang menyambungkan sentromer dengan sentriol. Apabila gelendong ini mengecut, setiap satu daripada pasangan kromosom bergerak ke

kutub yang bertentangan. Pada akhir anafasa, dua kumpulan kromosom dapat dilihat di mana setiap kumpulan hampir-hampir sampai ke destinasi iaitu di kutub.

Telofasa bermula apabila kromosom sampai ke kutub. Gelendong mula merosot, kromosom membuka lingkaran dan memanjang, nukleus terbentuk semula dan membran nukleus mula menyelaputi kedua-dua nukleus yang telah terhasil. Pada akhir telofasa, sel mula membentuk dinding selulosa di antara nukleus-nukleus yang terhasil. Hasil daripada proses mitosis ini sepasang sel anak terbentuk dan setiap sel mengandungi bahan baka (gen) yang lengkap. Sel-sel ini seterusnya memasuki edaran baru dan proses mitosis akan berulang.

Hujung akar adalah sumber utama untuk kajian kinetik sel. Berbagai kaedah digunakan untuk mengukur kadar mitosis, contohnya mengukur edaran sel selepas perlabelan DNA atau menghalang kitaran sel. Kajian awal yang melibatkan pengukuran pemanjangan akar dan bilangan sel dalam meristem menggunakan kaedah pemeriksaan bahagian akar (Gray dan Scholes, 1951) atau menggunakan haemositometer (Brown dan Richless, 1949). Kedua-dua kaedah ini memberikan gambaran yang jelas tentang mitosis dalam sel-sel apeks. Kaedah yang sering digunakan ialah ‘Pulse-labelling’ menggunakan Metil-³H-timidin, sejenis bahan radioaktif untuk menandakan sel yang sedang melakukan sintesis DNA. Kaedah ini dicipta oleh Quastler dan Sherman (1959) di mana akar dimasukkan ke dalam larutan Metil-³H-timidin untuk suatu tempoh yang

tertentu, kemudian diletakkan dalam larutan timidin tanpa radioaktif. Sel-sel yang berada pada fasa S dalam edaran sel akan menyerap bahan radioaktif dan seterusnya akan terus memasuki fasa G2 dan kemudian tiba ke fasa pembahagian sel iaitu mitosis. Selain daripada itu, terdapat kaedah lain untuk menganggar tempoh edaran sel, iaitu menggunakan kolkisina sebagai perencat pemisahan kromatid semasa anafasa. Kaedah ini adalah untuk mendapatkan masa penggandaan sel (Cdt). Dalam kaedah ini sel-sel akan kekal dalam fasa metaphase. Prinsip yang digunakan ialah kolkisina tidak akan mengganggu kemasukan sel dalam mitosis. Pada masa yang sama peratus sel dalam profasa ditentukan untuk mempastikan kemasukan sel dalam mitosis adalah konstan dan tidak terganggu oleh bahan kolkisina yang digunakan.

Masa penggandaan sel (Cdt) ialah masa yang diperlukan untuk sesuatu populasi sel berganda menjadi dua kali populasi asalnya. Tempoh edaran sel atau tempoh edaran mitosis (T) didapati dari purata kesemua sel pada masa penggandaan sel (Clowes, 1961).

Masa penggandaan sel boleh ditentukan dengan menggunakan formula,

$$Cdt = \frac{\ln 2}{m}$$

[Penyesuaian dari kaedah Evans *et al.*, 1957]

di mana m ialah kadar pengumpulan sel pada metaphase, di mana ini adalah bersamaan dengan kadar kemasukan sel ke dalam mitosis per jam, selepas

pendedahan kepada kolkisina, di mana tiada sel yang keluar dari metafasa dan bilangan sel dalam profasa adalah konstan. Cdt mengukur semua sel yang terdapat tanpa mengambil kira samada sel-sel tersebut terlibat dalam edaran sel atau tidak. Apabila semua sel terlibat dalam edaran sel nilai Cdt menjadi sama dengan tempoh edaran sel. Selalunya tidak semua sel terlibat dalam edaran sel, oleh itu biasanya tempoh penggandaan sel (Cdt) adalah lebih panjang daripada tempoh edaran sel.

Kitaran atau edaran sel dipengaruhi oleh faktor alam sekeliling seperti suhu, cahaya (Wimber, 1966; Francis dan Barlow, 1988) dan faktor genetik pada sumber biji benih yang digunakan. Wimber (1966) melaporkan, edaran sel bagi *Tradescantia* adalah lebih lama jika dikenakan suhu yang rendah iaitu 51 jam pada 13°C berbanding dengan hanya 16 jam pada 30°C. Tumbuhan tetraploid pula mempunyai tempoh edaran sel yang lebih panjang dari tumbuhan diploid. Ini dibuktikan oleh Skult (1969) pada tanaman *Hordeum vulgare*. Menurut Van't Hof (1965) pula, kandungan DNA yang tinggi menyebabkan tempoh edaran sel lebih lama. Kini, kajian mengenai edaran sel tumbuhan secara *in vitro* sedang giat dilakukan (Francis, 1995; Francis *et al.*, 1995; Kinsman *et al.*, 1996; Moses *et al.*, 1997).

Kajian-kajian pada peringkat sel dalam tumbuhan semasa mitosis dan meosis boleh dijalankan menggunakan teknik kultur tisu. Penghasilan tumbuhan haploid(n); diploid(2n) ; triploid(3n); tetraploid(4n); adalah lebih mudah dengan

kawalan aktiviti kromosom seperti penggunaan bahan kolkisina. Kajian ke atas embrio somatik hipokotil *Camellia japonica* L. yang diperlakukan dengan kolkisina selama seminggu, didapati embrio poliploid sekunder terbentuk dari embrio primer (Kato, 1989).

Kultur tisu tumbuhan memainkan peranan penting dalam penghasilan bahan metabolit sekunder dari sumber-sumber semulajadi di bawah keadaan aseptik (Constabel *et al.*, 1974). Dua puluh tahun yang lampau, kajian kultur tisu tertumpu kepada kultur kalus sahaja. Walau bagaimanapun pada hari ini, kultur tisu adalah penting untuk mendapatkan regenerasi tumbuhan, kajian-kajian mengenai fisiologi tumbuhan, morfologi, penghasilan bahan-bahan metabolit sekunder, morfogenesis *in vitro* dan kajian sitologi.

Sejarah awal kultur tisu telah diperkenalkan oleh Gautheret (1983), Krikorian dan Steward (1969). Prinsip-prinsip dalam kultur tisu adalah berdasarkan kepada Teori Sel yang dikemukakan oleh Schleiden dan Schwann (1838-1839), iaitu satu sel berkebolehan untuk menjadi tumbuhan lengkap. Idea ini merupakan asas kepada konsep totipotensi. Sel-sel tunggal yang diasingkan dari kultur kalus mempunyai kebolehan sepertimana zigot iaitu berupaya menghasilkan regenerasi tumbuhan lengkap. Untuk menguji keupayaan regenerasi sel tunggal, sel perlu dikultur dalam keadaan yang menggalakkannya melakukan pembahagian berulang kali di mana kalus akan dihasilkan. Struktur kalus ini disubkultur berulang kali dan tisu klon ini akan mempunyai baka tulin

seperti mana sel induk. Terdapat 2 jenis pembezaan dalam kultur tisu iaitu pembezaan histogenetik dan organogenetik. Pembezaan histogenetik adalah berperanan untuk membentuk tisu-tisu baru di mana setengah-setengahnya mempengaruhi pembentukan bahan simpanan seperti kanji atau kompaun spesifik seperti alkaloid dan tannin. Selain daripada itu, pembezaan histogenetik juga berperanan untuk membentuk ciri-ciri sekunder dalam tumbuhan seperti fiber, tiub tapis dan vesel. Manakala pembezaan organogenetik akan menghasilkan organ-organ baru seperti akar, pucuk dan bunga.

Leistner (1973) telah melakukan kajian ke atas *Morinda citrifolia* dan mendapati penghasilan bahan metabolit iaitu antraquinones dari kultur tisu tumbuhan tersebut adalah sepuluh kali lebih banyak berbanding dengan penghasilannya dari tumbuhan ‘intact’. Selain daripada itu, penghasilan bahan metabolit sekunder seperti antosianin dari kalus *Haplopappus gracilis*, telah diperhatikan. Antosianin merupakan satu pigmen berwarna merah, ungu dan biru yang terdapat pada berkas vaskular tumbuhan. Menurut Stuart *et al.*, (1988) pula, kandungan protein dalam embrio somatik *alfalfa* adalah sepuluh kali ganda lebih banyak dari jumlah protein dalam bijinya.

Regenerasi tanaman hiasan juga telah banyak diperolehi melalui sistem *in vitro* ini seperti orkid, *Begonia*, kekwa dan ros (Bajaj, 1979). Penghasilan regenerasi melalui teknik ini adalah lebih baik kerana eksplan yang digunakan adalah hujung pucuk, petiol dan kotiledon. Cara pembiakan vegetatif dalam

kultur tisu boleh menghapuskan penyakit dari tumbuhan induk. Contohnya penghasilan orkid secara pesat dan bebas penyakit telah berjaya dilakukan di Indonesia dengan menggunakan anter sebagai eksplan (Bajaj, 1979).

Kultur haploid digunakan untuk analisis genetik dan memperbaiki mutu genetik tanaman di mana dalam analisis genetik ia membantu menunjukkan sifat-sifat yang dibawa oleh gen resesif dan pemetaan gen. Kultur haploid juga digunakan untuk menghasilkan tumbuhan homozigus diploid dan mendapatkan hibrid somatik dari pertaungan protoplas haploid (Bonga dan Durzan., 1988). Bagi spesies angiosperma, tumbuhan haploid boleh didapati dari mikrospora atau kultur anter, kultur ovul yang tidak subur dan dengan cara menginduksikan haploid partenogenesis dalam embrio. Kadangkala embroid akan terhasil secara langsung dari mikrospora tunggal. Selain daripada itu, mikrospora juga boleh membentuk kalus haploid di mana seterusnya akan membentuk pucuk adventitus atau embroid.

Kultur triploid pula penting untuk menghasilkan tanaman triploid. Pokok buah-buahan triploid akan menghasilkan buah tanpa biji (Laksmi Sita, 1987). Kultur tisu boleh membantu mengawal penyakit tumbuhan dan berguna untuk kajian mengenai perhubungan di antara perumah dan parasit (Risser dan White, 1964). Patogen sukar untuk dikenal pasti dalam tumbuhan. Morel dan Martin (1952) telah berjaya menghasilkan regenerasi pokok dahlia yang bebas

dari virus apabila mereka menggunakan meristem terminal sebagai sumber eksplan.

Pengetahuan yang mendalam mengenai keupayaan bahagian-bahagian vegetatif seperti batang, daun, akar dan pucuk untuk menghasilkan regenerasi tumbuhan terutamanya tanaman makanan seperti sayur-sayuran adalah hasil dari kajian mengenai teknik penanaman *in vitro* atau kultur tisu. Sayur-sayuran merupakan sumber makanan yang penting dalam hidangan seharian manusia di mana ia membekalkan nutrien serta vitamin yang diperlukan untuk kesihatan badan. Seperti mana yang telah diketahui umum, sayur-sayuran merupakan sumber selulosa dan vitamin yang penting terutamanya vitamin A, B dan C. Selain daripada dimakan secara langsung, hasil-hasil bahan metabolit sekunder daripada sayur-sayuran seperti lobak merah, timun, pegaga dan peria juga penting dalam industri, perubatan dan kosmetik. Kesedaran masyarakat Malaysia mengenai kesihatan dan kepentingan makanan seimbang dalam diet mereka, menyebabkan permintaan sayur-sayuran semakin meningkat. Berdasarkan kepada kepentingan sayur-sayuran inilah, maka kerajaan Malaysia telah melancarkan kempen penanaman sayur-sayuran samada untuk keperluan sendiri atau perniagaan. Ini adalah berikutan dengan kegawatan ekonomi yang melanda rantau Asia kini, di mana kos mengimpor sayur-sayuran di Malaysia mencapai kira-kira RM 700 juta setahun akan dapat dikurangkan melalui program ini. Oleh itu, berbagai langkah telah dilakukan untuk mempertingkatkan produktiviti pertanian, seperti membuka atau memajukan

kawasan-kawasan terbiar, mengaktifkan semula persatuan-persatuan peladang dan memperkenalkan cara penanaman atau pertanian moden dan produktif seperti penanaman secara hidroponik dan penghasilan regenerasi tumbuhan dari bahagian-bahagian vegetatif.

Memandangkan permintaan sayur-sayuran yang semakin meningkat, usaha-usaha yang sebegini haruslah dipergiatkan agar pengeluaran hasil tanaman terutamanya sayur-sayuran boleh dilipat gandakan. Oleh kerana faktor-faktor inilah, maka salah satu objektif kajian ini adalah untuk mengubah arah pandangan masyarakat iaitu bukan hanya mengharapkan biji benih sebagai sumber eksplan sahaja tetapi bahagian-bahagian vegetatif lain juga boleh menghasilkan regenerasi tumbuhan baru.

Sayur-sayuran boleh dibahagikan kepada empat kumpulan iaitu daun, buah, bunga dan akar. Sayur-sayuran jenis akar ialah lobak, ubi kayu dan ubi keledek. Jenis ini banyak membekalkan vitamin terutamanya vitamin A dan mineral. Kumpulan yang kedua terdiri daripada sayur-sayuran jenis bunga seperti kobis bunga dan brokoli. Manakala sayur-sayuran jenis daun pula adalah seperti bayam, pucuk manis dan sawi membekalkan mineral seperti besi dan kalsium, vitamin A serta vitamin C. Sayur-sayuran jenis buah pula terdiri daripada cili, petola, labu dan pelbagai jenis kekacang (Idris, 1990). Cili adalah jenis sayur-sayuran yang telah dipilih dalam kajian ini.

Capsicum annuum dari famili Solanaceae atau lebih dikenali sebagai cili merupakan sayuran yang berkepentingan ekonomi di seluruh dunia. Cili tersebar ke Asia dan Afrika semenjak dari abad ke-15 lagi (Andrews, 1984). Perkataan ‘chilli’ berasal dari bahasa Nahuatl, iaitu bahasa orang-orang Indian Aztecs di Mexico. Perkataan Sepanyol bagi cili iaitu ‘aji’ masih lagi digunakan di Caribbean dan di Amerika Selatan. Kemungkinan cili telah dibawa ke Indonesia dan India oleh saudagar-saudagar Portugis pada abad ke-17 dan kemudian ke Malaysia (Chew, 1992).

Cili dikelaskan atau dinamakan dengan nama yang berbeza berdasarkan kepada saiz, bentuk, rasa dan warna buahnya (Smith *et al.*, 1987). Tanaman ini diperlukan untuk penghasilan rempah, pewarnaan, aroma dan perasa. Rasa pedas dari buah cili adalah disebabkan oleh kehadiran kapsaisin iaitu kandungan asid isodesilamik yang didapati pada bahagian plasentanya. Kandungan nutrisi dalam cili adalah tinggi dan ia merupakan sumber vitamin A dan C (Schreiber, 1976). Cili boleh digunakan secara segar, untuk diproses menjadi sos dan puri. Manakala cili muda boleh dibuat jeruk, cili kering pula diproses menjadi serbuk cili, cili boh dan sos. Selain daripada itu di Mexico, cili digunakan dalam upacara keagamaan sebagai hadiah kepada pemerintah zaman silam (Long-Solis, 1986). Di setengah negara seperti Filipina, Korea dan Indonesia, pucuk cili dimakan sebagai ulam atau sayur. Kultivar cili yang berdaun ungu boleh dijadikan sebagai tanaman hiasan.

Cili tergolong dalam genus *Capsicum* yang mempunyai 20 - 30 spesies. Walau bagaimanapun, cuma lima spesies yang ditanam iaitu *C. baccatum* (*pendulum*), *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. pubescens* dan *C. chinensis*. Kawasan utama bagi spesies *C. annuum* ialah Mexico, manakala bagi *C. chinensis* dan *C. frutescens* ialah Amazon. Spesies *C. pendulum* dan *C. pubescens* pula berasal dari kawasan Peru dan Bolivia. *C. annuum* merupakan spesies yang utama ditanam secara meluas ketika ini dan penting dari segi ekonomi. Cili memerlukan suhu di antara 18°C dan 27°C pada waktu siang dan 15°C hingga 18°C pada waktu malam untuk tumbesaran yang pesat. Suhu yang rendah pada waktu malam menggalakkan penghasilan bunga dan cabang. Tanaman ini juga memerlukan jumlah taburan hujan sederhana iaitu 600 mm hingga 1250 mm setahun kerana curahan hujan yang terlalu lebat akan menyebabkan bunga mudah gugur dan seterusnya mengurangkan pengeluaran buah. Jenis tanah yang paling sesuai untuk tanaman sayuran ini ialah tanah gambut berpasir yang mempunyai pH di antara 5.5 hingga 6.8.

Empat puluh peratus daripada hasil cili dunia diperolehi dari Asia. India merupakan pengeluar cili yang utama (Christopher dan Rajam, 1994). Di Malaysia lebih daripada 1,000 hektar kawasan digunakan untuk penanaman cili di mana varieti yang biasanya ditanam adalah varieti tempatan iaitu varieti Kulai dan Langkap. MARDI (Malaysian Agriculture Research and Development Institute) telah memperkenalkan beberapa varieti cili yang mempunyai daya penghasilan yang tinggi berdasarkan kepada varieti tempatan contohnya MC 4,

MC 5, MC 6, MC 7, MC 10, MC 11 dan MC 12. Sungguhpun begitu, hanya dua varieti sahaja yang dipilih dalam kajian ini iaitu MC 4 dan MC 5. Secara amnya varieti MC 4 mempunyai ketinggian di antara 60-70 cm, panjang buahnya di antara 7-10 cm, sederhana pedas dan mudah diserang atau dijangkiti antraknos dan virus. Bagi varieti MC 5 pula pokoknya lebih tinggi iaitu 100-200 cm, buah lebih panjang iaitu 10-15 cm, pedas dan mudah dijangkiti antraknos dan virus.

Hasil pengeluaran cili Malaysia kebanyakannya dari negeri Perak terutamanya dari kawasan Lembah Kinta dan Langkap. Cili ditanam secara monokultur atau polikultur, tetapi monokultur adalah lebih popular. Ia ditanam di antara pokok kelapa yang telah matang, getah, kelapa sawit dan nanas. Selain daripada itu ia juga ditanam secara bergilir selepas penanaman kobis atau sayuran berdaun yang lain (Leong, 1985). Kini, pengeluaran cili tempatan hanya untuk kegunaan segar sahaja, manakala cili kering semuanya diimpot terutamanya dari India. Penggunaan cili setiap tahun bernilai lebih daripada RM 90 juta dan kebanyakan dari nilai ini diimpot (MARDI, 1994).

Berdasarkan kepada laporan Shukor *et al.*, (1988), pendapatan bersih dari pengeluaran cili adalah US\$ 4,100 per hektar. Walaupun begitu, kos penanaman dan penjagaannya juga tinggi iaitu US\$ 2,140 per hektar di mana kebanyakan dari kos ini digunakan untuk kawalan serangan penyakit (Leong, 1985). Laporan terbaru yang dikeluarkan oleh Jabatan Pertanian Malaysia 1997 menunjukkan pendapatan bersih cili Malaysia ialah US\$ 3,688 per hektar dan

kos penghasilan cili yang digunakan ialah US\$ 2,312 per hektar. Selain daripada itu, bekalan biji benih yang berkurangan juga menghadkan pengeluaran cili. Memandangkan masaalah ini semakin serius, maka teknik penanaman secara *in vitro* perlu diperluaskan untuk meningkatkan kualiti tanaman cili ini.

Kultur pucuk *C. annuum* cv. California Wonder telah digunakan sebagai sumber untuk pengasingan protoplas dari sel mesofil (Saxena *et al.*, 1981). Dalam kajian ini, mereka telah mendapati protoplas menghasilkan kalus di atas media NT (Nagata dan Takebe, 1971) yang dibekalkan dengan 2,4-D, NAA dan BAP di mana setiap satunya dengan kepekatan 1 mg/l. Kalus ini seterusnya membentuk tumbuhan lengkap dan berbunga dalam keadaan *in vitro*.

Kultur anter digunakan untuk menghasilkan tumbuhan haploid *C. annuum* seperti mana yang telah dilapurkan oleh George dan Narayanaswamy (1973), Wang *et al.*, (1973), Sibi *et al.*, (1979). Walau bagaimanapun, peratusan regenerasi tumbuhan yang diperolehi adalah rendah iaitu di antara 3-50%. Derivatif atau terbitan asid vanilik, kapsaisin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide) adalah komponen kepedasan yang utama di dalam cili (Bennett dan Kirby, 1968). Penghasilan kapsaisin di dalam kultur sel cili telah digunakan sebagai model untuk kajian ke atas sintesis bahan metabolit sekunder (Lindsey dan Yeoman, 1984a, b; Lindsey, 1985; Hall *et al.*, 1987). Sel-sel dalam media cecair bagi *C. frutescens* (Lindsey dan Yeoman, 1984a; Hall *et al.*, 1987) dan

C. annum (Salgado-Garciglia dan Ochoa-Alejo, 1990) merupakan sumber penghasilan kapsaisin. Pengumpulan kapsaisin di dalam cili berlaku dalam jangkamasa yang singkat pada peringkat akhir perkembangan buah (Iwai *et al.*, 1979).

Salah satu tujuan utama kultur tisu ialah untuk mendapatkan tanaman baka baik iaitu bebas daripada penyakit. Penyakit yang selalu menyerang cili adalah serangan virus, antraknos pada buah dan layu pucuk (Mah dan Rubiah, 1992). Antraknos pada cili adalah disebabkan oleh *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. capsici*, *C. acutatum* dan *C. coccodes*. Walaupun begitu *C. gloeosporioides* dan *C. capsici* merupakan pembawa masalah yang utama (Hadden dan Black, 1992). Serangan *Colletotrichum* spp. dapat dikurangkan sekiranya biji benih yang steril dan resisten digunakan serta ditanam di tapak semaian dan ladang yang bersih . Oleh itu teknik kultur tisu amat sesuai digunakan untuk mengurangkan risiko ini kerana melalui teknik ini hanya sebahagian kecil tumbuhan yang steril digunakan.

Di Korea, banyak kajian telah dilakukan mengenai serangan kulat ini terhadap cili seperti Kim *et al.*,(1992), Chang dan Chung (1985), Choi dan Pae (1987) dan Kim *et al.*, (1986). Kim telah melakukan kajian mengenai serangan antraknos (*Colletotrichum gloeosporioides* dan *C. dematum*) terhadap cili hijau dan cili merah. Manakala Chang dan Chung pula mengkaji ketahanan dan kesan kepekatan nutrien beberapa varieti cili terhadap *C. dematum*.

Masalah-masalah penghasilan cili di Malaysia ialah serangan penyakit dan serangga, kekurangan nutrien dan lain-lain. Serangan virus merupakan masalah utama. Antara virus-virus yang sering dikaitkan dengan masalah ini ialah chili veinal mottle virus (CVMV), cucumber mosaic virus (CMV), tomato spotted wilt virus (TSWV) dan tobacco mosaic virus (TMV). Ancaman bakteria pula adalah dari *Pseudomonas solanacearum*, *Colletotrichum capsici* dan *Cercospora capsici*. Serangan bakteria ini menjadi serius jika cili ditanam di ladang yang sama (Ong, 1984).

Kekurangan nutrien seperti ferum, mangganum dan boron dihadapi apabila cili ditanam di kawasan tanah gambut, tanah lombong dan tanah berpasir (Vimala dan Kho, 1985). Masalah kurang keupayaan menyimpan air juga dihadapi apabila cili ditanam di tanah lombong dan pasir. Oleh kerana cili merupakan tanaman sayuran utama di Malaysia, berbagai usaha dan kajian yang telah dilakukan untuk menambahkan hasil pengeluarannya. Contohnya kajian yang dilakukan oleh Melor (1992) mengenai penghasilan varieti-varieti baru cili Malaysia dan program penanaman cili yang baik. Selain daripada itu ramai lagi saintis seperti Ahmad dan Saifuluddin (1992,), Chew (1992), Ong (1984) dan Mak dan Maheswary (1992), yang turut menjalankan kajian yang melibatkan *C. annuum*.

Chew (1992) telah melaporkan bahawa serangan serangga dan kulat adalah masalah utama dalam penanaman cili di Malaysia. *Colletotrichum*

capsici merupakan patogen yang serius bagi cili, manakala lalat buah iaitu *Heliothis* sp. dan *Dacus dorsalis* adalah serangga penyerang cili yang utama. Mak dan Maheswary (1992) telah melakukan kultur anter bagi sepuluh varieti cili dan satu hibrid F di atas media Dumax de Vaulx *et al.*, (1981) untuk meninggikan mutu penanaman cili. Mereka telah mendapati, peratus pembentukan plantlet adalah 9.5% apabila kultur diletakkan pada suhu 29°C selepas dikenakan perlakuan pada suhu rendah iaitu 4°C selama satu hari diikuti dengan suhu 35°C selama 8 hari. Ahmad dan Saifulddin (1992) pula telah melakukan kajian awal mengenai transformasi eksplan cili menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* yang bertujuan untuk mendapatkan strain yang sesuai bagi transformasi cili.

OBJEKTIF KAJIAN

Kajian sitologi terhadap cili, terutamanya varieti tempatan masih belum dilakukan secara meluas. Berdasarkan kepada kepentingan ekonomi spesies ini, maka kajian yang lebih mendalam sehingga ke peringkat sel perlu dilakukan untuk memahami kelakuan atau aktiviti sel dalam *Capsicum annuum*. Parameter-parameter yang telah dikaji adalah indeks mitosis (MI), bilangan kromosom, masa penggandaan sel (Cdt), kandungan DNA nukleus, tahap ploidi, purata luas sel dan nukleus bagi sel akar primer cili dalam keadaan *in vivo* (intact). Data-data ini digunakan sebagai data asas untuk perbandingan dengan kelakuan sel dalam sistem *in vitro*.

Sebarang perubahan yang berlaku pada peringkat kromosom atau nukleus berkemungkinan besar membayangkan perubahan-perubahan yang akan berlaku pada peringkat morfologi. Abnormaliti pada kromosom boleh menyebabkan variasi somaklonal berlaku. Pemecahan nukleus dan diikuti dengan mitosis pada peringkat awal dalam kultur akan mengubah tahap ploidi sel (D'Amato, 1952). Melalui kaedah *in vitro*, penyelidikan mengenai sel adalah lebih mudah kerana melalui kaedah ini, tisu meristik sering digunakan seperti hujung akar dan hujung pucuk. Menurut Buvat (1944; 1945), pembezaan sel dalam keadaan *in vitro* melibatkan dua peringkat iaitu regresi (kemerosotan) pada peringkat kambium diikuti dengan pembentukan semula struktur-struktur kromosom pada sel meristik primer. Dengan memahami status nuklear sesuatu spesies, kemungkinan sebarang variasi yang berlaku akan dapat ditangani dengan baik dan tepat. Sebagai contoh, dalam penghasilan tumbuhan cili yang tidak normal

mungkin berlaku disebabkan variasi dalam status nukleusnya. Oleh itu kajian sitologi sangat penting untuk menghubungkaitkannya dengan kebolehan spesies untuk terus hidup. Kelakuan sel juga boleh dikaitkan dengan potensi regenerasi apabila sel-sel 'intact' dipindahkan ke dalam sistem kultur tisu.

Kelakuan sel-sel meristematis akar primer daripada plantlet yang diregenerasikan dari kaedah kultur tisu dibandingkan dengan kelakuan sel-sel dalam akar yang diperolehi dari struktur yang tiada bentuk tertentu (kalus). Ini bertujuan untuk melihat samaada terdapat perhubungan di antara kelakuan sel *in vitro* dengan keupayaan regeneratif spesies yang dikaji. Hasil daripada kultur tisu, poliploidi dan aneuploidi juga boleh berlaku. Dalam setengah spesies sel-sel aneuploidi dan poliploidi tidak mempengaruhi regenerasi, sebaliknya dalam sebahagian tumbuhan lagi, akan menghasilkan regenerasi hanya bila semua selnya berada dalam keadaan diploid ($2n$).

Selain daripada itu kajian kultur tisu juga dilakukan untuk mengkaji kesan jenis dan kepekatan hormon terhadap morfogenesis spesies ini dan untuk mendapatkan sumber eksplan yang paling regeneratif. Berbagai bahagian vegetatif tumbuhan cili seperti daun, batang, akar dan petiol digunakan untuk tujuan propagasi pesat.

Sekiranya propagasi pesat berjaya diperolehi, tumbuhan yang sama dengan induk ('true to type') dapat dihasilkan. Oleh itu besar kemungkinan pada masa akan datang kita boleh menghasilkan regenerasi tumbuhan yang serupa dengan tumbuhan induk secara pesat dan tidak perlu lagi bergantung kepada biji benih

semata-mata untuk pembiakan cili. Bilangan anak pokok yang dihasilkan juga dapat digandakan disamping mendapat tumbuhan baru yang sihat serta bebas dari penyakit.