

## **BAB 6**

***PERBANDINGAN DI ANTARA  
TISU REGENERATIF DAN TISU  
BUKAN REGENERATIF***

## BAB 6

### PERBANDINGAN DI ANTARA TISU REGENERATIF DAN TISU BUKAN REGENERATIF

#### 6.1 TUJUAN EKSPERIMEN

Tisu morfogenetik atau tisu regeneratif ialah tisu yang berpotensi menjalani proses pembahagian mitosis untuk membentuk tumbuhan lengkap. Proses ini berlaku mengikut corak atau aturan yang tertentu; pengumpulan sel-sel, tisu dan organ dalam struktur tumbuhan dengan fungsi yang spesifik dan bentuk yang sama sepetimana di dalam tumbuhan induk. Menurut Tran Thanh Van (1981), terdapat 5 corak morfogenetik iaitu bunga, pucuk, akar, struktur embrio dan kalus. Kalus dianggap sebagai tisu tidak morfogenetik jika tiada potensi pembezaan untuk membentuk organ tertentu.

Perubahan boleh berlaku pada setiap bahagian kumpulan sel, di mana akan menyebabkan susunan yang berbeza dan seterusnya menghasilkan tisu baru atau menyebabkan kehilangan potensi morfogenetik. Kehilangan potensi morfogenetik boleh berlaku secara beransur-ansur dalam kultur kalus, bergantung kepada faktor genetik dan epigenetik. Perubahan epigenetik merujuk kepada perubahan yang disebabkan oleh faktor-faktor fizikal yang mempengaruhi sifat-sifat genetik sesuatu tisu atau sel (Harris dan James, 1969). Contohnya, apabila sel-sel kalus diletakkan terlalu lama di dalam kultur, keperluan hormon sitokinin terhadap pembahagian sel boleh berkurang atau tidak diperlukan langsung. Ini adalah kerana persekitaran kultur seperti pH dan suhu media

telah mengubah sifat-sifat sel iaitu dari sifat memerlukan sitokinin kepada menolak kehadiran sitokinin. Ini akan memberi kesan kepada perubahan herediti sel.

Nisbah auksin dan sitokinin merupakan salah satu faktor utama yang mengawal morfogenesis dalam tumbuhan. Tran Thanh Van (1981) melaporkan bahawa kepelbagaiannya jenis hormon dan penggalak tumbesaran boleh mengatasi masalah kesukaran pembentukan organ tumbuhan pada kes-kes tertentu. Komponen bahan-bahan kimia yang lain seperti perubahan nisbah makronutrien dan mikronutrien dan penambahan komponen organik seperti arang juga boleh mempengaruhi morfogenesis. Selain daripada itu, faktor-faktor fizikal seperti pH media, suhu, keamatan cahaya dan keadaan media samada pepejal atau cecair, peringkat perkembangan dan histologi tisu yang digunakan juga merupakan faktor-faktor yang mempengaruhi morfogenesis.

Jangkamasa atau tempoh pengkulturan boleh mengubah aktiviti nukleus sel seperti berlakunya 'endoreduplication' kromosom, fragmentasi nukleus dan mitosis tidak normal. Perubahan-perubahan ini berlaku dalam populasi sel heterogenous dengan mempengaruhi tahap ploidi. Keadaan persekitaran kultur boleh mempengaruhi aktiviti nuklear dan kesannya ditunjukkan pada tisu regeneratif atau bukan regeneratif. Dalam kajian ini tisu bukan regeneratif adalah merujuk kepada eksplan daun, batang, petiol dan pucuk yang tidak menghasilkan regenerasi tetapi dapat menghasilkan akar sahaja. Seterusnya akar dari eksplan-eksplan tersebut digunakan untuk kajian sitologi. Manakala tisu regeneratif adalah sel-sel akar yang diambil dari regenerasi tumbuhan samada melalui pembentukan pucuk berganda atau plantlet lengkap.

Dalam bab ini, kajian sitologi dilakukan untuk melihat aktiviti sel di dalam tisu regeneratif dan tisu bukan regeneratif melalui penentuan indeks mitosis (MI), bilangan kromosom, kandungan DNA nukleus, tahap ploidi, purata luas sel dan nukleus serta masa penggandaan sel (Cdt). Berdasarkan kepada parameter-parameter ini, andaian atau kesimpulan boleh dilakukan samada tisu regeneratif dan bukan regeneratif menunjukkan aktiviti sel yang sama atau tidak. Sekiranya terdapat variasi di dalam komposisi nukleus dan sel *in vitro*, ini menunjukkan kemungkinan berlakunya variasi somaklonal. Jika komposisi sel di dalam kultur adalah stabil, kemungkinan morfologi regenerasi menyerupai induk adalah tinggi. Ini bermakna, corak khusus aktiviti sel menentukan samada tisu atau sel boleh tumbesar menjadi plantlet atau hanya membentuk struktur yang tidak khusus seperti kalus sahaja atau hanya mampu membentuk akar sahaja.

## **6.2 BAHAN DAN KAEADAH**

### **6.2.1 Persediaan dan Pensterilan Eksplan**

Biji benih *C. annuum* var. MC 5 dicambahkan seperti mana diterangkan pada bahagian 2.2 di atas media MS tanpa hormon. Dalam bab ini, tumpuan hanya dilakukan pada satu varieti sahaja iaitu var. MC 5 kerana kedua-dua varieti ini menunjukkan respons yang sama apabila dikultur dalam keadaan *in vitro* (Jadual 1). Anak cambah berumur 2 minggu digunakan untuk mendapatkan sumber eksplan seperti batang, daun, petiol dan pucuk untuk menghasilkan regenerasi. Eksplan-eksplan ini dikultur di atas media MS yang dibekalkan dengan pelbagai kombinasi hormon. Media yang boleh menginduksikan plantlet ialah media MS yang ditambah dengan 0.2 mg/l IAA, media MS yang ditambah dengan 0.3 mg/l IAA, media MS ditambah 1.0mg/l IAA bersama 4.0 mg/l BA dan media MS yang ditambah 1.5 mg/l IAA bersama 6.0 mg/l BA. Eksplan-eksplan yang berlainan menunjukkan respons yang berbeza apabila dikultur di atas media MS dengan komposisi hormon berlainan (Bahagian 5.3).

### **6.2.2 Pengukuran Nilai Indeks Mitotik (MI) bagi *C. annuum* yang ditanam secara *in vitro*.**

Akar dari plantlet yang diinduksikan dari eksplan batang, daun, petiol dan pucuk diambil selepas 3 bulan. Bagi setiap sampel, enam akar diawet dalam 3:1 (v/v) alkohol:glasial asid asetik. Perlakuan yang sama dilakukan terhadap akar yang dihasilkan

oleh eksplan-eksplan tersebut tanpa penghasilan plantlet. Akar-akar ini digunakan untuk menyediakan slaid tetap dengan pewarnaan Feulgen sepetimana diterangkan pada bahagian 3.2.1. Bagi setiap sampel, nilai MI (jumlah sel yang membahagi dikira sebagai peratusan sel) diperolehi. Sebanyak seribu sel per slaid bagi setiap penyampelan telah digunakan.

### **6.3.2 Bilangan kromosom**

Akar yang diinduksikan dari eksplan batang, daun, petiol dan pucuk diawet dalam 3:1(v/v) alkohol:glasial asid asetik. Penyediaan slaid tetap dilakukan sebagaimana diterangkan di bahagian 3.2.1. Pengiraan bilangan kromosom dilakukan pada slaid yang mempunyai taburan kromosom yang sesuai sahaja. Sekurang-kurangnya 20 sel pada peringkat metafaza dikira bagi setiap masa penyampelan.

### **6.2.4 Pengukuran Kandungan DNA Nukleus**

Kaedah yang digunakan adalah seperti yang diterangkan dalam bahagian 3.2.4. Akar yang didapati dari eksplan-eksplan batang, daun, petiol dan daun diperlakukan dengan pewarnaan Feulgen untuk dijadikan slaid tetap. Kemudian slaid-slaid ini dikaji di bawah mikroskop cahaya dan dianalisa dengan sistem analisis imej VIDAS 21 oleh Kontron Elektronik ( Bahagian 3.2.4).

### **6.2.5 Pengukuran Purata Luas Sel dan Nukleus**

Akar dari kultur eksplan batang, daun, petiol dan pucuk ( tisu bukan regeneratif) dan akar dari plantlet diperlakukan dengan pewarna Feulgen untuk dijadikan slaid tetap. Slaid-slaid ini direndam dalam 0.2% 'light green' yang telah dilarutkan dalam etanol (99.9%) selama 6 minit dan direndam semula dalam larutan etanol (99.9%) selama 10 minit. Seterusnya slaid-slaid ini diperiksa di bawah mikroskop cahaya dengan sistem analisis imej ( Bahagian 3.2.5).

### **6.2.6 Penentuan Masa Penggandaan Sel ( Cdt )**

Biji benih *C. annuum* var. MC 5 dicambahkan seperti diterangkan pada bahagian 2.1. Eksplan batang, daun, petiol dan pucuk diambil dari anak cambah berusia 2 minggu dan dikultur di atas media MS yang dibekalkan dengan pelbagai kombinasi hormon (Jadual 7). Akar berumur 3 minggu yang diinduksikan dari eksplan-eksplan tersebut didedahkan kepada 0.025% (w/v) larutan kolkisina selama 7 jam. Pada setiap jam, sekurang-kurangnya 6 akar diawet dalam 3:1 (v/v) alkohol:glasial asid asetik. Slaid tetap disediakan seperti pada bahagian 3.2.1 dan diperiksa di bawah mikroskop. Peratusan sel yang sedang menjalani profasa dan metafasa ditentukan. Sebagai kawalan, 6 akar juga diawetkan pada 0 jam.

Untuk menentukan masa penggandaan sel bagi tisu regeneratif pula, akar dari plantlet yang berumur 3 bulan didedahkan kepada 0.025% (w/v) larutan kolkisina selama

7 jam. Pada setiap jam, sekurang-kurangnya 6 akar diawetkan dalam 3:1 (v/v) alkohol:glasial asid asetik. Akar-akar ini dijadikan slaid tetap menggunakan pewarnaan Feulgen. Sebanyak 6 akar diawetkan pada 0 jam sebagai kawalan. Slaid tetap dari tisu regeneratif dan bukan regeneratif diperiksa di bawah mikroskop cahaya dan peratusan sel profasa dan metafasa ditentukan pada setiap waktu penyampelan ( 0 hingga 7 jam ). Perhubungan di antara pengumpulan metafasa dan masa diplotkan. Kadar sel yang memasuki metafasa digunakan untuk mengira purata masa penggandaan sel menggunakan formula Clowes (1961) sebagaimana dalam bahagian 3.2.6.

### **6.3 KEPUTUSAN**

Eksplan batang, petiol dan pucuk bagi *C. annuum* var. MC 5 yang dikultur di atas media MS yang dibekalkan dengan 0.2 mg/l IAA menghasilkan plantlet. Sementara eksplan daun hanya membentuk kalus di atas media yang sama. Apabila eksplan batang, daun, petiol dan pucuk dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 0.3 mg/l IAA, plantlet hanya berjaya dihasilkan dari eksplan petiol sahaja. Eksplan batang, daun dan pucuk hanya menghasilkan kalus. Regenerasi tumbuhan lengkap diperolehi dari eksplan batang dan daun apabila 0.5 mg/l IAA bersama 5.0 mg/l BA ditambah kepada media MS. Media MS yang ditambah dengan 1.0 mg/l IAA dan 4.0 mg/l BA hanya menginduksikan kalus dari eksplan batang, pucuk dan petiol. Sungguhpun begitu, regenerasi *C. annuum* diperolehi dari eksplan daun. Apabila 1.5 mg/l IAA dan 6.0 mg/l BA ditambah kepada media MS, regenerasi tumbuhan diperolehi dari eksplan batang dan daun tetapi eksplan pucuk dan petiol hanya menghasilkan kalus ( Jadual 7 ).

#### **6.3.1 Indeks Mitosis (MI)**

##### a) Tisu Bukan Regeneratif

Merujuk kepada Jadual 8, nilai indeks mitosis (MI) dari akar eksplan daun yang dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 0.2 mg/l IAA selepas 3 bulan menunjukkan nilai yang rendah berbanding dengan MI bagi tisu regeneratif. iaitu  $18.14 \pm 0.24\%$ , berbanding dengan nilai-nilai MI dari akar eksplan batang ( $74.8 \pm 1.3\%$ ), akar

**Jadual 7 : Kesan kombinasi hormon yang berbeza ke atas *C. annuum* var. MC 5 yang dikultur pada suhu  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  serta diberi 16 jam cahaya dan 8 jam gelap.**

Media MS + hormon (mg/l)	Eksplan	Respon	Peratus (%)
0.2 NAA	Batang	Kalus	15
	Daun	Kalus	15
	Petiol	Kalus	15
	Pucuk	Kalus	10
0.2 NAA 1.0 BA	Batang	Tiada	0
	Daun	Tiada	0
	Petiol	Tiada	0
	Pucuk	Tiada	0
0.2 NAA 1.5 BA	Batang	Tiada	0
	Daun	Tiada	0
	Petiol	Tiada	0
	Pucuk	Tiada	0
0.5 2,4-D	Batang	Kalus	5
	Daun	Kalus	8
	Petiol	Kalus	5
	Pucuk	Kalus	10
0.5 2,4-D 1.0 BA	Batang	Kalus	6
	Daun	Kalus	8
	Petiol	Kalus	5
	Pucuk	Kalus	10
1.0 2,4-D 0.5 BA	Batang	Kalus	5
	Daun	Kalus	5
	Petiol	Kalus	8
	Pucuk	Kalus	10

**Jadual 8 : Nilai MI  $\pm$  SE dan bilangan kromosom bagi tisu tidak regeneratif dan tisu regeneratif *Cannuum* var. MC 5 selepas 3 bulan di dalam kultur di atas media MS yang dibekalkan dengan pelbagai kombinasi hormon IAA dan BA di bawah keadaan  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  dan 16 jam cahaya dan 8 jam gelap.**

Media / Eksplan	Indeks mitosis (%)	Julat	Purata Bil. kromosom
1. Media MS + 0.2 mg/l IAA			
a) Tisu tidak regeneratif			
Daun	$18.14 \pm 0.2$	20-24	24
b) Tisu regeneratif			
Batang	$74.8 \pm 1.3$	20-24	24
Petiol	$71.3 \pm 1.2$	21-24	24
Pucuk	$54.9 \pm 0.7$	19-24	24
2. Media MS + 0.3 mg/l IAA			
a) Tisu tidak regeneratif			
Batang	$23.1 \pm 1.3$	20-24	24
Daun	$30.3 \pm 1.3$	20-24	24
Pucuk	$15.7 \pm 0.9$	19-24	24
b) Tisu regeneratif			
Petiol	$43.2 \pm 0.7$	21-24	24
3. Media MS + 0.5mg/l IAA +5.0 mg/l BA			
a) Tisu tidak regeneratif			
Petiol	$21.5 \pm 1.1$	21-24	24
Pucuk	$18.4 \pm 1.2$	19-24	24
b) Tisu regeneratif			
Batang	$44.3 \pm 0.6$	20-24	24
Daun	$50.6 \pm 1.3$	20-24	24

Media / Eksplan	Indeks mitosis (%)	Julat	Bil.kromosom
4. Media MS + 1.0 mg/l IAA + 4.0 mg/l BA			
a) Tisu tidak regeneratif			
Batang	22.1 ± 1.3	20-24	24
Petiol	16.2 ± 1.1	21-24	24
Pucuk	19.3 ± 1.5	19-24	24
b) Tisu regeneratif			
Daun	50.5 ± 3.6	20-24	24
5. Media MS + 1.5 mg/l IAA + 6.0 mg/l BA			
a) Tisu tidak regeneratif			
Pucuk	19.7 ± 0.7	19-23	24
Petiol	21.4 ± 1.1	20-24	24
b) Tisu regeneratif			
Batang	45.3 ± 0.6	20-24	24
Daun	54.1 ± 2.6	20-24	24

eksplan petiol ( $71.3 \pm 1.2\%$ ) dan akar eksplan pucuk ( $54.9 \pm 0.7\%$ ). Peratus nilai MI bagi akar eksplan-eksplan batang, daun dan pucuk yang dikultur di atas media MS yang ditambah  $0.3 \text{ mg/l}$  IAA juga rendah berbanding dengan nilai MI bagi tisu regeneratif di dalam media yang sama (eksplan petiol) iaitu  $23.1 \pm 1.32\%$  (eksplan batang),  $30.3 \pm 1.33\%$  (eksplan daun) dan  $15.7 \pm 0.9\%$  (eksplan pucuk). Tisu-tisu bukan regeneratif yang dikultur di atas media MS yang ditambah  $0.5 \text{ mg/l}$  IAA bersama dengan  $5.0 \text{ mg/l}$  BA menunjukkan nilai  $18.4 \pm 1.2\%$  bagi eksplan pucuk dan  $21.5 \pm 1.1\%$  bagi eksplan petiol. Manakala nilai MI bagi eksplan batang ialah  $22.1 \pm 1.26\%$ , eksplan pucuk adalah  $19.3 \pm 1.5\%$  dan eksplan petiol adalah  $16.2 \pm 1.1\%$  apabila eksplan-eksplan tersebut dikultur di atas media MS yang dicampurkan dengan  $1.0 \text{ mg/l}$  IAA dan  $4.0 \text{ mg/l}$  BA. Eksplan pucuk dan petiol merupakan tisu bukan regeneratif di atas media MS yang ditambah  $1.5 \text{ mg/l}$  IAA bersama  $6.0 \text{ mg/l}$  BA di mana nilai mitosisnya juga rendah iaitu  $19.71 \pm 0.73\%$  bagi eksplan pucuk dan  $21.4 \pm 1.1\%$  bagi eksplan petiol.

b) Tisu Regeneratif

Apabila eksplan batang, petiol dan pucuk dikultur di atas media MS yang ditambah dengan  $0.2 \text{ mg/l}$  IAA, regenerasi tumbuhan lengkap diperolehi di mana akar dari setiap plantlet tersebut diambil selepas 3 bulan untuk menentukan nilai indeks mitosis (MI). Akar dari eksplan batang menunjukkan nilai MI yang paling tinggi iaitu  $74.8 \pm 1.26\%$ , diikuti dengan  $71.3 \pm 1.23\%$  bagi eksplan petiol dan  $54.9 \pm 0.73\%$  bagi eksplan pucuk. Walaupun begitu, hanya eksplan petiol merupakan tisu regeneratif di atas media MS yang ditambah  $0.3 \text{ mg/l}$  IAA di mana nilai MI adalah  $43.2 \pm 0.71\%$ . Nilai MI

bagi eksplan batang yang dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 0.5 mg/l IAA bersama 5.0 mg/l BA adalah  $44.3 \pm 0.6$  % iaitu tidak berbeza dengan bererti ( $p > 0.05$ ) dengan nilai MI eksplan petiol di atas media MS yang ditambah 0.3 mg/l IAA. Nilai MI bagi eksplan daun di atas media yang sama ialah  $50.6 \pm 1.3$  %. Eksplan daun yang dikultur di atas media MS yang dibekalkan dengan 0.5 mg/l IAA bersama 5.0 mg/l BA dan media MS yang ditambah dengan 1.0 mg/l IAA bersama 4.0 mg/l BA telah berjaya menghasilkan regenerasi di mana nilai MI masing-masing adalah  $50.6 \pm 1.3$  % dan  $50.5 \pm 3.6$  % (Jadual 8). Kedua-dua nilai ini tidak berbeza dengan bererti ( $p > 0.05$ ).

Eksplan batang dan daun adalah merupakan tisu yang regeneratif di atas media MS yang ditambah dengan 1.5 mg/l IAA bersama 6.0 mg/l BA di mana nilai MI bagi eksplan batang ialah  $45.3 \pm 0.6$  % dan eksplan daun ialah  $54.1 \pm 2.6$  %. Perbezaan nilai MI tisu regeneratif dan bukan regeneratif adalah berbeza dengan berertinya pada semua eksplan ( $p < 0.05$  ).

### **6.3.2 Bilangan Kromosom**

#### a) Tisu Bukan Regeneratif

Purata bilangan kromosom dari sel-sel akar yang didapati dari kultur eksplan daun di atas media MS yang ditambah dengan 0.2 mg/l IAA adalah 24 pada julat 20 - 24. Bagi eksplan batang, daun dan pucuk yang dikultur di atas media MS dengan 0.3 mg/l IAA juga menunjukkan julat yang hampir sama iaitu 20 - 24 ( eksplan batang dan daun ) dan

19 - 24 ( eksplan pucuk ). Pada keseluruhannya, bilangan kromosom bagi tisu-tisu regeneratif tidak berbeza dengan bererti ( $p > 0.05$ ) di antara eksplan berlainan dan kombinasi hormon yang berbeza (Jadual 8).

b) Tisu Regeneratif

Bilangan kromosom dari akar tisu regeneratif iaitu eksplan batang, petiol dan pucuk yang dikultur di atas media MS yang ditambah dengan pelbagai kombinasi hormon adalah 24 dengan julat 19 - 24.

### **6.3.3 Pengukuran Kandungan DNA Nukleus**

#### **1. Media MS yang ditambah dengan 0.2 mg/l IAA**

Media ini dipilih kerana terdapat peratus penghasilan regenerasi yang tinggi iaitu 80% (eksplan batang), 50% (eksplan petiol) dan 80% (eksplan pucuk). Oleh itu media ini dianggap media yang berkeupayaan untuk menghasilkan regenerasi tumbuhan lengkap.

a) Tisu Bukan Regeneratif

Taburan kandungan DNA dari sel-sel akar eksplan daun selepas 3 bulan di dalam kultur adalah di antara  $2.2\text{C}$  hingga  $8.0\text{C}$ . Ini menunjukkan tiada sel yang berada dalam

fasa G1 di mana 32 % sel terdapat dalam fasa S, 34.7 % pada fasa G2 dan 33.3 % sel adalah poliploidi (Jadual 9, Rajah 46) dan (Rajah 26, Apendediks II).

b) Tisu Regeneratif

Kandungan DNA dalam sel-sel tisu regeneratif iaitu akar yang terhasil dari eksplan batang, petiol dan pucuk yang telah membentuk plantlet ditentukan selepas 3 bulan di dalam kultur. Taburan kandungan DNA bagi sel-sel akar eksplan pucuk adalah di antara  $6.1\text{C}$  hingga  $22.5\text{C}$  di mana tiada sel pada fasa G1, S dan G2. Kesemua sel adalah poliploidi (Rajah 27, Apendediks II dan Rajah 25). Manakala taburan kandungan DNA bagi sel-sel akar eksplan petiol pula (Rajah 28, Apendediks II) ialah di antara  $2.4\text{C}$  hingga  $10.3\text{C}$ . Tiada sel pada fasa G1, 8.0% sel pada fasa S, 21.3% sel pada fasa G2 dan kebanyakannya sel (70.7%) adalah poliploid.

Bagi eksplan batang pula, tiada sel yang berada pada fasa G1; hanya 2.0% sel pada fasa S, 2.7% sel pada fasa G2 dan kebanyakannya sel adalah poliploidi (95.3%) (Rajah 29, Apendediks II).

## 2. Media MS yang ditambah dengan 0.3 mg/l IAA

Media ini dipilih untuk mendapatkan regenerasi kerana regenerasi tumbuhan lengkap telah diperolehi dari eksplan petiol (30%), manakala eksplan batang, daun dan pucuk hanya menghasilkan kalus sahaja. Perbezaan respons eksplan-eksplan tersebut di

atas media ini menggambarkan kemungkinan terdapat perbezaan keupayaan regenerasi di antara eksplan yang berlainan.

a) Tisu Bukan Regeneratif

Eksplan batang, daun dan pucuk merupakan tisu bukan regeneratif setelah 3 bulan dikultur di atas media ini, iaitu tiada pembentukan plantlet lengkap atau pucuk berganda. Taburan kandungan DNA dalam sel-sel eksplan batang ialah 32.5% sel pada fasa S, 35% pada fasa G2 dan 32.5% adalah sel poliploidi (Rajah 30, Apendiks II). Peratusan sel yang hampir sama diperolehi dari eksplan daun iaitu tiada sel pada fasa G1, 32% fasa S, 34% fasa G2 dan 34% sel adalah poliploidi (Rajah 31, Apendiks II). Nilai yang berbeza diperolehi dari eksplan pucuk iaitu tiada sel pada fasa G1 dan S. Hanya 4.7 % sel pada fasa G2 dan 95.3 % sel adalah poliploidi (Rajah 32, Apendiks II) dan (Rajah 47).

b) Tisu Regeneratif

Eksplan petiol merupakan satu-satunya tisu yang berjaya menghasilkan regenerasi apabila dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 0.3 mg/l IAA. Rajah 33 (Apendiks II) menunjukkan kebanyakan sel adalah poliploidi (70.3%), 21.7% sel dalam fasa G2 dan selebihnya (8 %) adalah dalam fasa S.

### **3. Media MS yang ditambah dengan 0.5 mg/l IAA bersama 5.0 mg/l BA**

Media ini dipilih kerana terdapat penghasilan regenerasi melalui pembentukan pucuk berganda dari eksplan batang (30%) dan eksplan daun (25%).

#### a) Tisu Bukan Regeneratif

Apabila eksplan pucuk dan petiol dikultur di atas media MS yang dibekalkan dengan 0.2 mg/l IAA dan 5.0 mg/l BA, kebanyakan sel dalam eksplan pucuk adalah sel poliploidi iaitu 97.7% dan 2.3% sel adalah dalam fasa G2 (Rajah 35, Apendiks II). Manakala eksplan petiol mengandungi 30% sel pada fasa S, 36.7% sel dalam fasa G2 dan 33.3% adalah poliploidi (Rajah 34, Apendiks II) selepas 3 bulan di dalam kultur . (Rujuk Rajah 48).

#### b) Tisu Regeneratif

Kandungan DNA bagi kebanyakan sel-sel eksplan batang yang dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 0.5 mg/l IAA dan 5.0 mg/l BA adalah melebihi 4.8C iaitu 96.0%, 2.0% sel adalah di antara 3.6C hingga 4.8C dan 2.0% sel ialah di antara 2.4C hingga 3.6C(Rajah 36, Apendiks II). Bagi eksplan daun, 8 % sel pada fasa S, 21.0 % sel pada fasa G2 dan 71% sel adalah poliploidi (Rajah 37, Apendiks II).

#### **4. Media MS yang ditambah dengan 1.0 mg/l IAA bersama 4.0 mg/l BA**

Media ini dipilih berdasarkan kepada peratus regenerasi yang tinggi (80%) dari eksplan daun. Manakala eksplan lain (eksplan batang, pucuk dan petiol) hanya menghasilkan kalus.

##### a) Tisu Bukan Regeneratif

Eksplan batang, pucuk dan petiol tidak berpotensi menghasilkan regenerasi di atas media ini. 32.5% sel pada fasa S, 37% sel pada fasa G2 dan 30.5% adalah sel poliploidi (eksplan batang) (Rajah 38, Apendiks II). Kebanyakan sel dalam eksplan pucuk adalah poliploidi (96.0%) dan 4 % sel berada pada fasa G2. Manakala peratus sel poliploidi dalam eksplan petiol adalah lebih rendah iaitu 34%, peratus sel-sel dalam fasa G2 juga 34% dan 32% sel pada fasa S (Rajah 39, Apendiks II), (Rajah 49).

##### b) Tisu Regeneratif

Eksplan daun adalah tisu regeneratif apabila dikultur di atas media MS yang dibekalkan dengan 1.0 mg/l IAA bersama 4.0 mg/l BA. Kebanyakan sel adalah pada fasa G2 (36%), diikuti dengan 34% adalah sel poliploidi dan 30% sel dalam fasa S (Rajah 41, Apendiks II).

## **5. Media MS yang dibekalkan 1.5 mg/l IAA bersama 6.0 mg/l BA**

Media ini juga dipilih berdasarkan keupayaannya menginduksikan pucuk berganda dari eksplan batang (35%) dan eksplan daun (40%).

### a) Tisu Bukan Regeneratif

Tisu-tisu dari eksplan pucuk dan petiol tidak berpotensi menghasilkan regenerasi walaupun dibiarkan di dalam kultur selama 3 bulan. Peratus kandungan DNA sel bagi eksplan pucuk ialah 2% dalam fasa S, 2.3% dalam fasa G2 dan 95.7% adalah sel poliploidi. Bagi eksplan petiol pula, tiada sel pada fasa G1, sebanyak 30.3% sel adalah dalam fasa S, 36.4% sel pada fasa G2 dan 33.3% adalah poliploidi (Rajah 42 dan 43, Apendiks II), (Rajah 50).

### a) Tisu Regeneratif

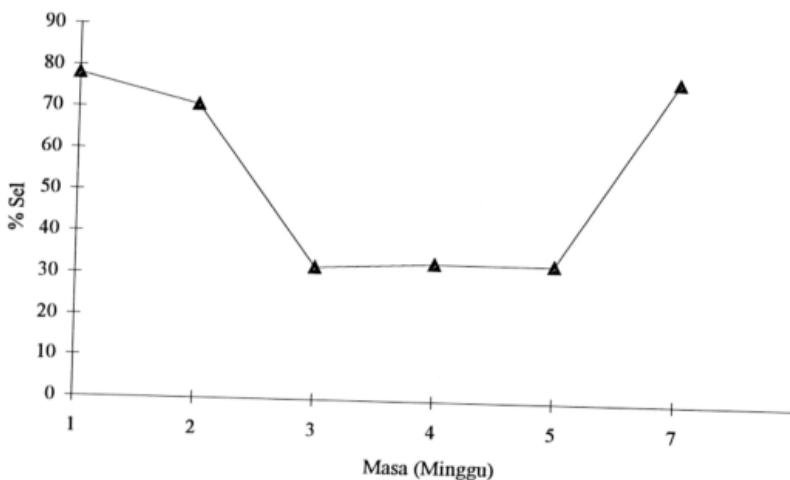
Eksplan batang dan daun mempunyai potensi untuk menghasilkan regenerasi tumbuhan lengkap dalam media ini. Sebanyak 2.5% sel dari eksplan batang berada dalam fasa S, 2.2% sel dalam fasa G2 dan 95.3% adalah sel poliploidi. Bagi eksplan daun pula, 8.3% sel pada fasa G1, 21.0% sel pada fasa G2 dan kebanyakan sel (70.7%) adalah poliploidi (Rajah 44 dan 45, Apendiks II).

**Jadual 9 : Peratus sel *C. annuum* var MC 5 pada fasa G1, S, G2 dan poliploidi bagi tisu tidak regeneratif dan tisu regeneratif yang dikultur di atas media MS dengan pelbagai kombinasi hormon IAA dan BA di bawah keadaan  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; 16 jam cahaya dan 8 jam gelap.**

Media / Eksplan	Peratus sel (%)			Poliploidi
	G1	S	G2	
1. Media MS + 0.2mg/l IAA				
a) Tisu tidak regeneratif				
Daun	0	32.0	34.7	33.3
b) Tisu regeneratif				
Batang	0	2.0	2.7	95.3
Petiol	0	8.0	21.3	70.7
Pucuk	0	0	0	100.0
2. Media MS + 0.3 mg/l IAA				
a) Tisu tidak regeneratif				
Batang	0	32.5	35.0	32.5
Daun	0	32.0	34.0	34.0
Pucuk	0	0	4.7	95.3
b) Tisu regeneratif				
Petiol	0	8.0	21.0	70.3
3. Media MS + 0.5 mg/l IAA + 5.0 mg/l BA				
a) Tisu tidak regeneratif				
Pucuk	0	0	2.3	97.7
Petiol	0	30.0	36.7	33.3
b) Tisu regeneratif				
Batang	0	2.0	2.0	96.0
Daun	0	8.0	21.0	71.0

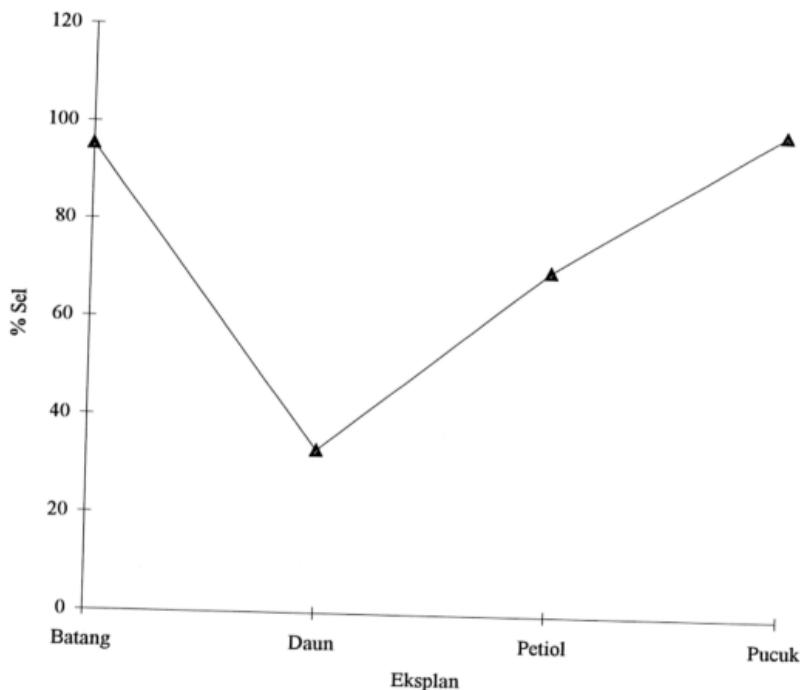
Rajah 25 :

Peratus sel *in vitro* *C. annuum* var. MC 5 pada peringkat poliploidi yang dikultur di atas media MS dengan 0.2 mg/l IAA di bawah keadaan  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  dan diberi 16 jam cahaya dan 8 jam gelap.



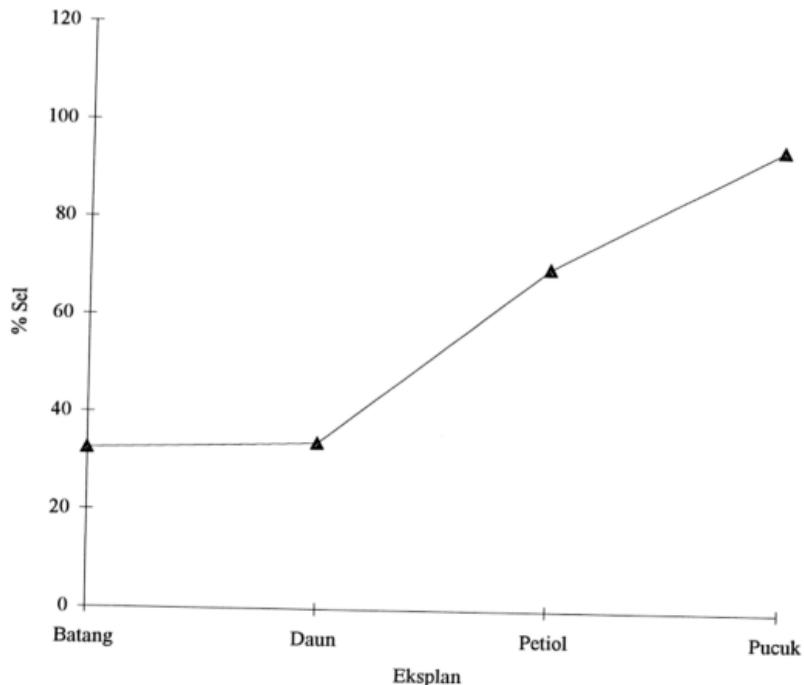
Rajah 46 :

Graf nilai peratus sel *C. annuum* var. MC 5 pada peringkat poliploid bagi eksplan batang, daun, petiol dan pucuk di atas media MS yang dibekalkan dengan 0.2 mg/l IAA di bawah keadaan  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; 16 jam cahaya dan 8 jam gelap.



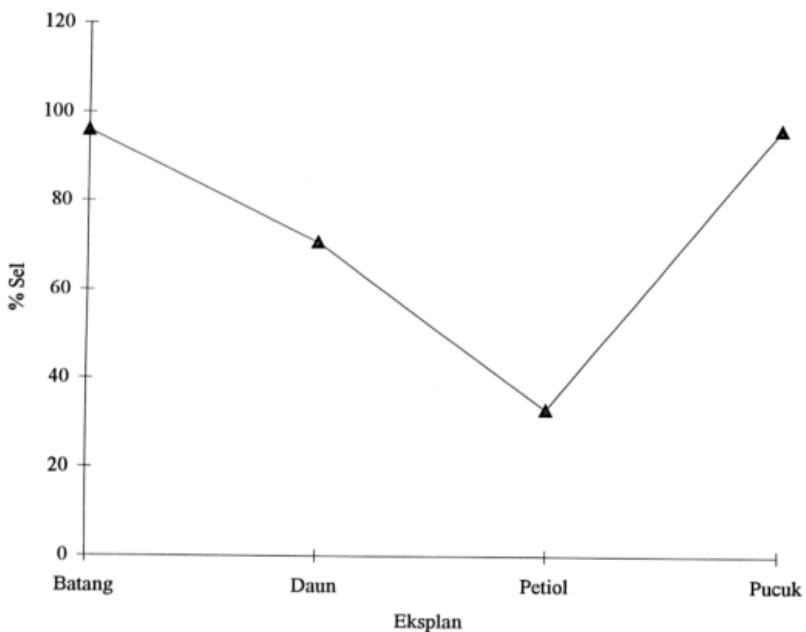
Rajah 4.7 :

Graf nilai peratus sel *C. annuum* var. MC 5 pada peringkat poliploid bagi eksplan batang, daun, petiol dan pucuk di atas media MS yang dibekalkan dengan 0.3 mg/l IAA di bawah keadaan  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 16 jam cahaya dan 8 jam gelap.



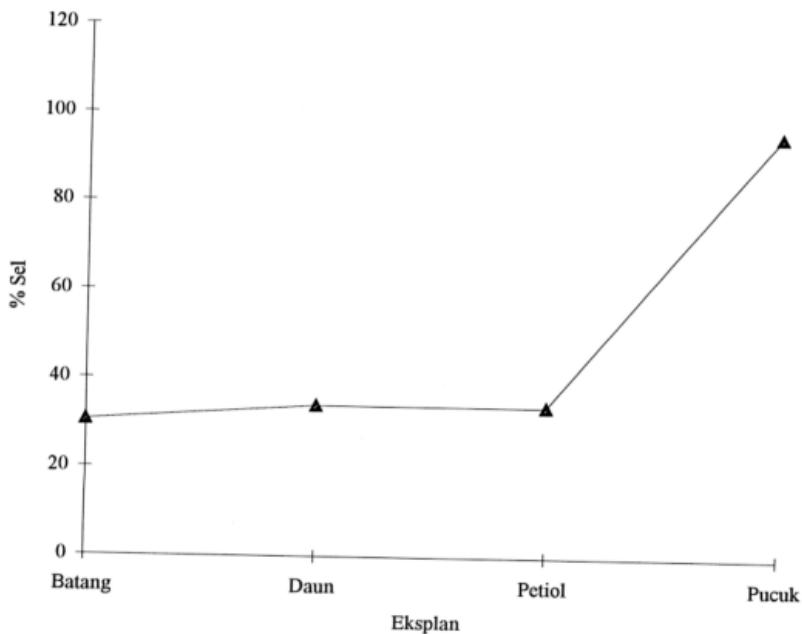
Rajah 48 :

Graf nilai peratus sel *C. annuum* var. MC 5 pada peringkat poliploidi bagi eksplan batang, daun, petiol dan pucuk di atas media MS yang dibekalkan dengan 0.5 mg/l IAA dan 5.0 mg/l BA di bawah keadaan  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 16 jam cahaya dan 8 jam gelap.



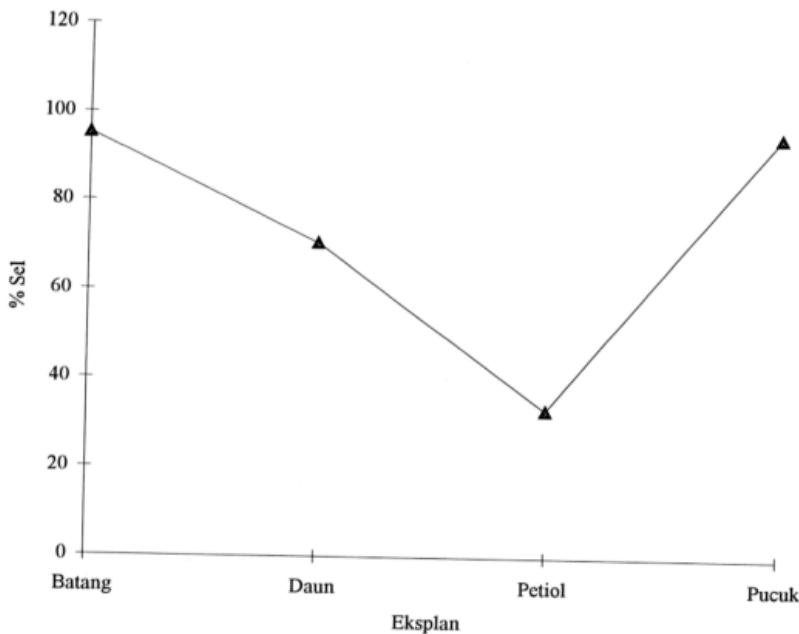
Rajah 49 :

Graf nilai peratus sel *C. annuum* var. MC 5 pada peringkat poliploidi bagi eksplan batang, daun, petiol dan pucuk di atas media MS yang dibekalkan dengan 1.0 mg/l IAA dan 4.0 mg/l BA di bawah keadaan  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 16 jam cahaya dan 8 jam gelap.



Rajah 50 :

Graf nilai peratus sel *C. annuum* var. MC 5 pada peringkat poliploidi bagi eksplan batang, daun, petiol dan pucuk di atas media MS yang dibekalkan dengan 1.5 mg/l IAA dan 6.0 mg/l BA di bawah keadaan  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 16 jam cahaya dan 8 jam gelap.



### **6.3.4 Pengukuran Luas Sel dan Nukleus**

#### **1. Media MS yang ditambah dengan 0.2 mg/l IAA**

- a) Tisu Bukan Regeneratif

Luas Sel

Berdasarkan kepada pemerhatian yang telah dilakukan ke atas se-sel akar dari eksplan daun, purata luas sel bagi sel-sel akar dari eksplan daun ialah  $232.37 \pm 6.89 \mu\text{m}^2$ .

Luas Nukleus

Purata luas nukleus bagi sel akar dari eksplan daun ialah  $67.05 \pm 2.29 \mu\text{m}^2$ .  
(Rujuk kepada Rajah 51a dan 51b, Apendediks II).

- b) Tisu Regeneratif

Luas Sel

Purata luas sel bagi sel akar eksplan batang ialah  $236.56 \pm 8.35 \mu\text{m}^2$ , eksplan petiol ialah  $217.27 \pm 6.44 \mu\text{m}^2$  dan eksplan pucuk ialah  $218.28 \pm 1.51 \mu\text{m}^2$ . Purata luas sel akar eksplan batang adalah berbeza dengan bererti ( $p < 0.05$ ) dengan

purata luas sel bagi eksplan petiol dan eksplan pucuk (Rajah 52a, 53a dan 54a, Apendiks II).

#### Luas Nukleus

Purata luas nukleus sel-sel akar tisu regeneratif eksplan batang, petiol dan pucuk di atas media ini ialah  $50.36 \pm 1.76 \mu\text{m}^2$  ( eksplan batang ),  $67.05 \pm 2.29 \mu\text{m}^2$  ( eksplan petiol ) dan  $66.0 \pm 1.32 \mu\text{m}^2$  ( eksplan pucuk ) (Rajah 52b, 53b dan 54b, Apendiks II).

## 2. Media MS yang ditambah dengan 0.3 mg/l IAA

### a) Tisu Bukan Regeneratif

#### Luas Sel

Apabila eksplan batang, daun dan pucuk dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 0.3 mg/l IAA, kesemuanya tidak menunjukkan keupayaan untuk regenerasi. Saiz sel-sel akar dari setiap eksplan ini ialah  $235.56 \pm 8.30 \mu\text{m}^2$  ( eksplan batang ),  $233.30 \pm 6.80 \mu\text{m}^2$  ( eksplan daun ) dan  $220.28 \pm 1.50 \mu\text{m}^2$  ( eksplan pucuk ) (Rajah 55a, 56a dan 57a, Apendiks II). Saiz sel bagi setiap eksplan yang serupa adalah hampir sama walaupun dikultur di atas media yang mempunyai komposisi hormon yang berbeza (Jadual 9). Contohnya luas sel bagi sel-sel akar dari eksplan daun ialah  $233.30 \pm 6.80 \mu\text{m}^2$  (dalam media MS yang dibekalkan dengan 0.3 mg/l IAA) dan

$232.37 \pm 6.89 \mu\text{m}^2$  (dalam media MS yang dibekalkan dengan 0.2 mg/l IAA).

Perbezaan ini adalah tidak bererti ( $p > 0.05$ ).

#### Luas nukleus

Tiada perubahan yang besar dalam saiz nukleus bagi eksplan-eksplan yang berbeza walaupun dikultur di atas media MS yang mengandungi hormon yang berbeza. Saiz nukleus bagi sel akar dari eksplan batang ialah  $51.35 \pm 1.60 \mu\text{m}^2$ , manakala dari eksplan daun ialah  $73.02 \pm 2.20 \mu\text{m}^2$  dan bagi eksplan pucuk adalah  $67.1 \pm 1.32 \mu\text{m}^2$  (Rajah 55b, 56b dan 57b, Apendiks II).

#### b) Tisu Regeneratif

##### Luas Sel

Walaupun eksplan petiol merupakan satu-satunya tisu regeneratif di atas media kultur ini, tetapi saiz sel akar dari eksplan ini juga tidak menunjukkan perubahan ( $P > 0.05$ ) iaitu  $217.80 \pm 5.24 \mu\text{m}^2$  berbanding dengan saiz sel akarnya yang dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 0.2 mg/l IAA . (Rajah 58a, Apendiks II).

##### Luas Nukleus

Purata luas nukleus bagi sel akar eksplan petiol ialah  $67.55 \pm 2.30 \mu\text{m}^2$  (Rajah 58b, Apendiks II), tidak menunjukkan perubahan yang bererti jika dibandingkan dengan

luas nukleus bagi sel-sel akar bagi eksplan yang sama di atas media MS yang dibekalkan dengan 0.2 mg/l IAA.

### **3. Media MS yang ditambah dengan 0.5 mg/l IAA dan 5.0 mg/l BA**

#### a) Tisu Bukan Regeneratif

##### Luas Sel

Purata luas sel bagi akar meristik eksplan pucuk ialah  $219.20 \pm 1.50 \mu\text{m}^2$  (Rajah 59a, Apendiks II) dan nilai ini adalah tidak berbeza dengan bererti ( $p > 0.05$ ) dengan luas sel akar eksplan pucuk yang dikultur di atas media MS yang ditambahkan dengan 0.3 mg/l IAA dan media MS yang ditambah dengan 0.2 mg/l IAA. Manakala luas sel bagi akar eksplan petiol pula adalah  $218.27 \pm 6.40 \mu\text{m}^2$  (Rajah 60a, Apendiks II), hampir sama dengan nilai yang diperolehi dari eksplan pucuk.

##### Luas Nukleus

Bagi akar eksplan pucuk, purata luas nukleusnya ialah  $66.05 \pm 1.30 \mu\text{m}^2$  dan bagi akar eksplan petiol pula ialah  $67.0 \pm 2.22 \mu\text{m}^2$  (Rajah 59b dan 60b, Apendiks II).

b) Tisu Regeneratif

Luas Sel

Sel-sel akar dari eksplan batang yang dikultur di atas media ini menunjukkan saiz yang hampir sama iaitu tidak berbeza dengan bererti ( $p > 0.05$ ) dengan saiz sel akar eksplan batang yang dikultur di atas media yang mempunyai hormon berbeza iaitu  $235.56 \pm 8.30 \mu\text{m}^2$ . Begitu juga dengan saiz sel akar dari eksplan daun iaitu  $231.40 \pm 5.99 \mu\text{m}^2$  (Rajah 61a dan 62a, Apendiks II).

Luas Nukleus

Saiz nukleus sel akar dari eksplan batang ialah  $49.89 \pm 1.90 \mu\text{m}^2$  dan saiz nukleus bagi sel akar eksplan daun ialah  $74.0 \pm 2.3 \mu\text{m}^2$  (Rajah 61b dan 62b, Apendiks II) berbeza dengan bererti ( $p < 0.05$ ).

**4. Media MS yang ditambah dengan 1.0 mg/l IAA dan 4.0 mg/l BA**

a) Tisu Bukan Regeneratif

Luas Sel

Tisu-tisu bukan regeneratif di atas media ini ialah eksplan batang, pucuk dan petiol; di mana luas sel bagi setiap eksplan adalah  $235.56 \pm 8.30 \mu\text{m}^2$  (akar eksplan batang),  $218.30 \pm 1.49 \mu\text{m}^2$  (akar eksplan pucuk) dan  $218.01 \pm 7.00 \mu\text{m}^2$  (akar eksplan petiol). (Rujuk Rajah 63a, 64a dan 65a, Apendiks II).

### Luas Nukleus

Purata luas nukleus sel akar eksplan batang ialah  $50.20 \pm 1.80 \mu\text{m}^2$ , sel akar eksplan pucuk  $66.01 \pm 1.5 \mu\text{m}^2$  dan sel akar eksplan petiol pula adalah  $67.03 \pm 2.3 \mu\text{m}^2$  (Rajah 63b, 64b dan 65b, Apendiks II) di mana kesemua nilai adalah hampir sama.

### b) Tisu Regeneratif

#### Luas Sel

Sel-sel akar dari eksplan petiol dan daun juga tidak menunjukkan perbezaan yang bererti dari segi saiz sel samada tisu regeneratif atau bukan regeneratif. Luas sel dari eksplan petiol ialah  $217.28 \pm 6.66 \mu\text{m}^2$  dan luas sel akar eksplan daun pula adalah  $233.28 \pm 6.80 \mu\text{m}^2$  (Rajah 66a, Apendiks II).

#### Luas Nukleus

Purata saiz nukleus bagi sel-sel akar eksplan petiol ialah  $68.04 \pm 2.24 \mu\text{m}^2$  dan  $72.9 \pm 2.23 \mu\text{m}^2$  bagi sel-sel akar eksplan daun (Rajah 66b, Apendiks II) iaitu tidak bererti ( $p>0.05$ ).

## **5. Media MS yang ditambah dengan 1.5 mg/l IAA dan 6.0 mg/l BA**

- a) Tisu Bukan Regeneratif

### **Luas Sel**

Eksplan petiol dan pucuk merupakan tisu yang tidak berpotensi menghasilkan regenerasi di atas media MS yang dibekalkan dengan 1.5 mg/l IAA dan 6.0 mg/l BA. Saiz sel bagi kedua-dua eksplan ini adalah tidak berbeza dengan bererti ( $p > 0.05$ ) jika dibandingkan dengan saiz selnya ketika dikultur di atas media MS yang mengandungi 0.2 mg/l IAA. Saiz sel eksplan petiol ialah  $218.28 \pm 6.34 \mu\text{m}^2$  dan saiz sel eksplan pucuk adalah  $217.98 \pm 1.50 \mu\text{m}^2$  (Rajah 66a, 67a dan 68a).

### **Luas Nukleus**

Luas nukleus bagi sel akar dari eksplan petiol yang telah dikultur selama 3 bulan di atas media MS yang dibekalkan dengan 1.5 mg/l IAA bersama 6.0 mg/l BA ialah  $68.00 \pm 2.3 \mu\text{m}^2$  dan luas nukleus bagi eksplan pucuk ialah  $65.9 \pm 1.4 \mu\text{m}^2$  (Rajah 66b, 66b dan 68b, Apendiks II). Kedua-dua nilai hampir sama.

b) Tisu Regeneratif

Luas sel

Purata luas sel akar eksplan batang ialah  $234.43 \pm 8.1 \mu\text{m}^2$  dan bagi akar eksplan daun pula adalah  $233.41 \pm 6.88 \mu\text{m}^2$  (Rujuk Rajah 69a dan 70a, Apendiks II). Kedua-dua nilai juga hampir sama.

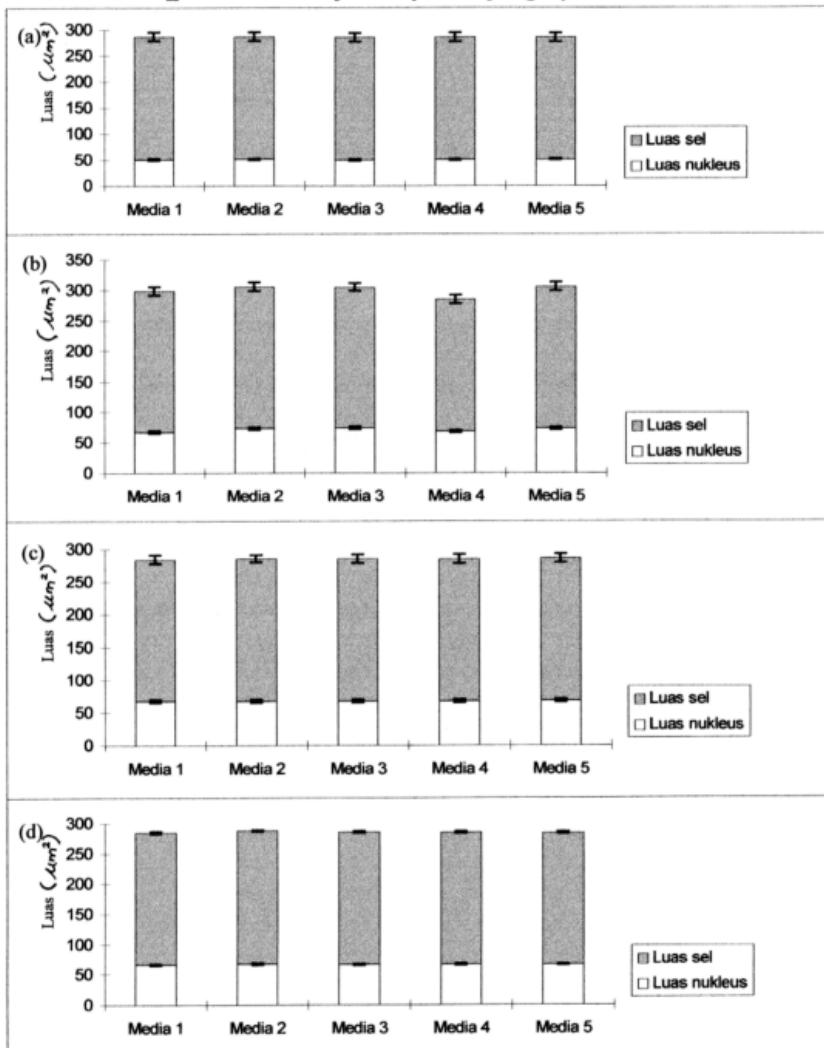
Luas nukleus

Saiz nukleus sel-sel akar dari eksplan batang setelah 3 bulan di dalam kultur ialah  $51.01 \pm 1.5 \mu\text{m}^2$  dan saiz sel akar eksplan daun ialah  $73.03 \pm 2.22 \mu\text{m}^2$  (Rajah 69b dan 70b, Apendiks II) berbeza dengan bererti ( $p < 0.05$ ).

Rajah 71 menunjukkan luas sel dan nukleus bagi sel akar eksplan-eksplan yang berbeza yang dikultur di atas media MS dengan pelbagai kombinasi hormon IAA dan BA.

Rajah 71:

Luas sel dan nukleus bagi sel akar eksplan (a) batang, (b) daun, (c) petiol dan (d) pucuk yang dikultur di atas media MS dengan pelbagai kombinasi hormon IAA dan BA di bawah keadaan  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  dan diberi 16 jam cahaya dan 8 jam gelap.



Media 1 = MS + 0.2 mg/l IAA

Media 4 = MS + 1.0 mg/l IAA + 4.0 mg/l BA

Media 2 = MS + 0.3 mg/l IAA

Media 5 = MS + 1.5 mg/l IAA + 6.0 mg/l BA

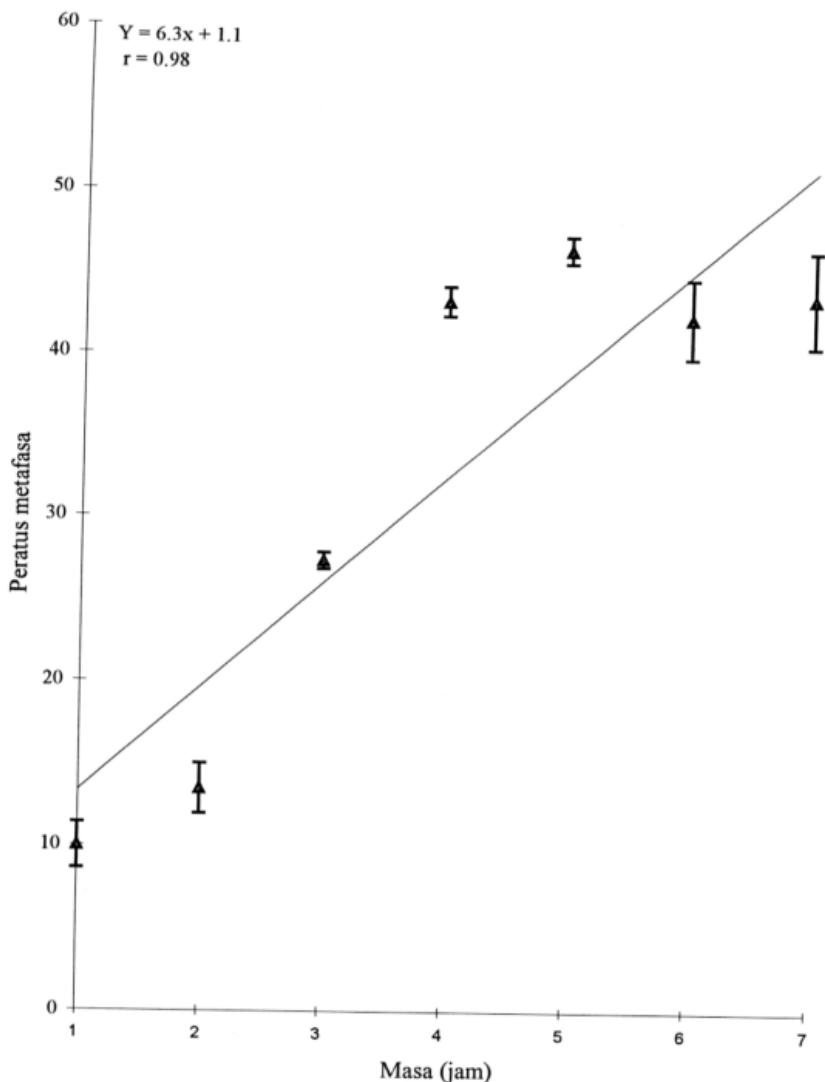
Media 3 = MS + 0.5 mg/l IAA dan 5.0 mg/l BA

### **6.3.5 Masa Penggandaan Sel ( Cdt )**

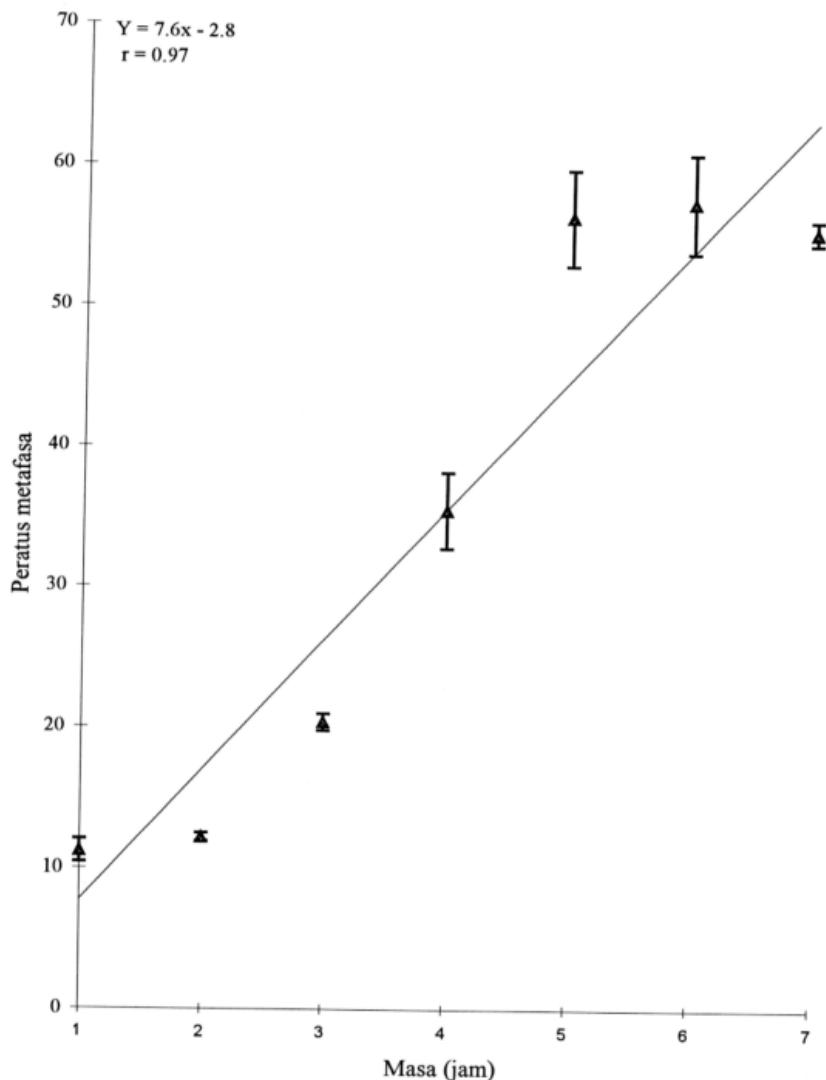
Pemilihan masa untuk pengukuran masa penggandaan sel dilakukan berdasarkan nilai indeks mitosis (MI) yang tertinggi bagi eksplan *C. annuum* var. MC 5 yang dikultur di atas media MS yang dibekalkan dengan 0.2 mg/l IAA. Berdasarkan kepada Jadual 8, nilai indeks mitosis yang tertinggi ialah  $74.8 \pm 1.26\%$  iaitu dari eksplan batang yang merupakan tisu yang paling regeneratif di atas media tersebut. Perhubungan di antara peratusan sel metafaza dan masa memberikan persamaan regresi linear iaitu;  $Y = 6.3X + 1.1$  dengan koefisien korelasi  $r = 0.98$  ( Rajah 72a ). Persamaan ini memberikan nilai masa penggandaan sel atau Cdt sebanyak 8.1 jam.

Bagi tisu bukan regeneratif pula, pengukuran nilai masa penggandaan sel diambil dari akar eksplan daun. Persamaan regresi yang diperolehi ialah  $Y = 7.6X - 2.8$  dengan koefisien korelasi  $r = 0.97$  ( Rajah 72b ) di mana nilai Cdt yang diperolehi ialah 9.0 jam.

Rajah 72 a : Perkaitan di antara peratus frekuensi metafasa dan tempoh dedahan kepada 0.025% kolkisina bagi sel-sel akar primer *C. annuum* var. MC 5 dan berasal dari eksplan batang (tisu regeneratif) yang dikultur pada suhu  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  dan diberi 16 jam cahaya dan 8 jam gelap.



Rajah 72b : Perkaitan di antara peratus frekuensi metafasa dan tempoh dedahan kepada 0.025% kolfisina bagi sel-sel akar primer *C. annuum* var. MC 5 dan berasal dari eksplan daun (tisu tidak regeneratif) yang dikultur pada suhu  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  dan diberi 16 jam cahaya dan 8 jam gelap.



## **6.4 RINGKASAN KEPUTUSAN**

1. Secara amnya, nilai MI bagi tisu regeneratif adalah lebih tinggi berbanding dengan tisu bukan regeneratif. Nilai MI yang tertinggi ialah  $74.8 \pm 1.26\%$  dari eksplan batang yang dikultur di atas media MS yang dibekalkan dengan  $0.2 \text{ mg/l IAA}$  dan eksplan ini juga merupakan eksplan yang paling regeneratif.
2. Purata bilangan kromosom di dalam tisu regeneratif adalah sama dengan purata bilangan kromosom di dalam tisu bukan regeneratif iaitu 24.
3. Julat bilangan kromosom pada tisu regeneratif dan tisu bukan regeneratif adalah di antara 19-24.
4. Nilai kandungan DNA dalam tisu regeneratif adalah lebih tinggi jika dibandingkan dengan tisu bukan regeneratif. Tiada sel yang berada dalam fasa G1 bagi setiap eksplan yang digunakan. Walaupun begitu, bagi eksplan pucuk bilangan sel poliploidi adalah tinggi dalam kedua-dua keadaan regeneratif dan bukan regeneratif ( $95.3 - 100.0\%$ ).
5. Purata luas sel dalam tisu regeneratif dan bukan regeneratif adalah sama bagi semua eksplan. Bagi eksplan batang luas selnya adalah  $235.56 \pm 8.3 \mu\text{m}^2$ , luas sel bagi eksplan daun adalah  $233.30 \pm 6.80 \mu\text{m}^2$ , luas sel bagi eksplan petiol adalah  $217.80 \pm 5.24 \mu\text{m}^2$  dan luas sel bagi sel akar eksplan pucuk pula adalah  $219.20 \pm 1.50 \mu\text{m}^2$ .

Purata luas sel setiap eksplan adalah tidak berbeza dengan bererti walaupun dikultur di atas media yang mempunyai komposisi hormon yang berlainan.

6. Purata luas nukleus juga tidak menunjukkan perbezaan di antara tisu regeneratif dan tisu bukan regeneratif. Nisbah luas nukleus kepada luas sel adalah tetap iaitu 0.3.
7. Masa penggandaan sel bagi tisu regeneratif adalah lebih pendek iaitu 8.1 jam dan bagi tisu bukan regeneratif adalah 9.0 jam.