

BAB 4

PENGKULTURAN SEGMENTEN AKAR DAN KAJIAN KELAKUAN SEL *In Vitro* KE ATAS *Zinnia elegans* Jacq.

4.1 TUJUAN EKSPERIMENT

Objektif kajian ini adalah untuk memerhati dan mengkaji kelakuan sel meristem akar tumbuhan yang diregenerasikan melalui teknik *in vitro* berbanding dengan tumbuhan yang ditanam secara *in vivo*. Kajian ini juga bertujuan untuk menentukan media yang terbaik atau optima untuk penginduksian akar serta keupayaan sel akar untuk menghasilkan regenerasi iaitu membentuk tumbuhan lengkap.

Kadar pertumbuhan dan pemanjangan akar primer yang disemai di atas kapas basah dan di atas media MS didapati adalah sama. Oleh itu hujung akar sepanjang 2 mm diambil dari anak benih *Zinnia elegans* Jacq yang berumur 5 hari dengan kepanjangan akar 40.82 ± 15.39 mm yang telah disemai secara *in vitro* di dalam media asas MS tanpa hormon. Ini bertujuan supaya perkembangan dan pertumbuhan akar adalah seragam dan variasi di antara akar dapat dikurangkan. Data-data yang diperolehi akan dibuat perbandingan dengan data-data dari sel-sel akar yang telah ditanam secara *in vivo*. Perbandingan atau pemerhatian yang akan dibuat ialah terhadap aktiviti-aktiviti sel akar seperti indeks mitosis, bilangan kromosom, kandungan DNA nukleus, purata luas sel dan nukleus dan masa penggandaan sel.

Organogenesis atau morfogenesis adalah suatu proses penghasilan bentuk atau organisasi daripada tisu yang tidak membeza. Di dalam kultur tisu, organogenesis boleh berlaku dengan dua cara iaitu samada secara langsung atau secara tidak langsung. Organogenesis secara langsung ialah apabila sesuatu bahagian tumbuhan dikulturkan, pucuk dan akar terbentuk tanpa melalui peringkat kalus. Manakala organogenesis secara tidak langsung pula ialah apabila eksplan dikultur, kalus terbentuk dan apabila kalus yang tidak berorganisasi ini dipindahkan ke dalam medium baru, pucuk dan akar terbentuk. Pertumbuhan dan perkembangan kedua-dua jenis organogenesis ini adalah dipengaruhi oleh bahagian tumbuhan itu sendiri, media nutrien, kandungan hormon dan faktor persekitaran seperti suhu dan cahaya. Ini kerana keupayaan pertumbuhan sesuatu tisu daripada spesies tumbuhan yang berlainan untuk membentuk plantlet yang lengkap adalah berbeza (Teo, 1992).

Secara amnya tumbuhan dikotiledon mempunyai keupayaan pertumbuhan semula yang lebih tinggi berbanding dengan monokotiledon. Dalam dikotiledon pula tumbuhan tidak berkayu lebih berupaya tumbuh semula berbanding dengan tumbuhan berkayu. Keadaan fisiologi tisu tumbuhan juga banyak mempengaruhi pertumbuhan eksplan yang dikulturkan secara *in vitro*. Sebagai contoh eksplan daripada tisu muda akan lebih cepat tumbuh semula berbanding dengan eksplan daripada tisu tua (Teo, 1992).

Hughes (1981) menyatakan pada masa kini teknik propagasi kultur tisu dan sel tumbuhan telah menjadi satu prosedur yang sangat penting untuk propagasi pesat tumbuhan terutamanya tanaman hiasan. Ini kerana terdapat lebih

dari 40 famili tumbuhan hiasan yang berlainan spesies telah berjaya dibiakkan melalui teknik ini walaupun terdapat sebahagian daripadanya yang tidak menguntungkan jika dikomersialkan. Multiplikasi secara *in vitro* mempunyai beberapa kebaikan berbanding dengan teknik propagasi secara konvensional. Terdapat 4 sebab utama yang menyebabkan ia penting dan berdaya maju di dalam sektor pertanian khususnya untuk tumbuhan hiasan:

1. Teknik kultur tisu boleh digunakan untuk mempercepatkan pembiakan sesuatu spesies tumbuhan yang biasanya mengambil masa yang lama atau tidak dapat dibiakkan melalui pembiakan vegetatif.
2. Pembiakan secara *in vitro* boleh mengurangkan tempoh masa pembiakan sesuatu spesies tumbuhan yang mempunyai permintaan yang tinggi atau tidak mencukupi untuk memenuhi permintaan pasaran.
3. Teknik kultur tisu sangat berguna untuk menghasilkan varieti-varieti baru atau untuk memperolehi hibrid daripada sesuatu spesies yang tidak serasi melalui kultur embrio dan kultur ovul.
4. Teknik ini juga berguna untuk tujuan pengklonan atau untuk mendapatkan bahan tanaman yang serupa dengan induk dalam masa yang singkat dengan kos yang menjimatkan.
5. Dengan kaedah ini keseragaman dari segi pembungaan dan pembuahan dapat dicapai kerana melalui pengklonan, tumbuhan yang semuanya serupa akan menghasilkan bunga atau buah pada masa yang serentak. Ini sangat menguntungkan dari segi komersial.

Di dalam kajian kultur tisu variasi somaklon adalah satu fenomena yang biasa didapati dan sukar untuk dielakkan. Hughes (1981) telah

mengklasifikasikan jenis-jenis variasi yang biasa terdapat di dalam kajian kultur tisu kepada 4 jenis :

1. Perubahan dari segi rupabentuk atau morfologi pada kalus yang belum membeza seperti pengubahsuaihan terhadap struktur sel dan keperluan biokimia.
2. Perubahan organogenesis seperti keupayaan membentuk embriod, organ atau tisu.
3. Perubahan pada aktiviti dan struktur sel yang membentuk plantlet lengkap sesuatu spesies tumbuhan yang diregenerasikan.
4. Perubahan pada struktur dan bilangan kromosom seperti peningkatan tahap ploidi.

Terdapat banyak kajian yang melaporkan bahawa apabila sesuatu tisu tumbuhan itu dikultur secara *in vitro*, perubahan-perubahan dari segi aktiviti sel seperti perubahan pada nukleus mula kelihatan samada semasa pembentukan kalus atau pertumbuhan plantlet lengkap (D'Amato, 1977). Proses pembahagian mitosis juga boleh terangsang apabila dikenakan perlakuan hormon atau disebabkan tisu-tisu terluka. Perlakuan ini apabila dikenakan pada eksplan akar atau batang sesuatu tumbuhan yang dikultur berupaya untuk menghasilkan keadaan poliploid (Matthysse dan Torrey, 1967). Justeru itu, antara lain objektif kajian ini dijalankan adalah untuk mengkaji aktiviti kelakuan sel tumbuhan yang diregenerasikan melalui teknik kultur tisu.

4.2 BAHAN DAN KAEDAH

4.2.1 Penentuan Media Optima untuk Pembentukan Akar dan Regenerasi Tumbuhan.

(a) Kaedah Pensterilan

Untuk mendapatkan eksplan hujung akar daripada anak benih yang berusia 5 hari yang telah disemai secara *in vitro*, biji benih yang hendak disemai perlu disteril terlebih dahulu dan semua kerja-kerja pengkulturan mesti dijalankan di bawah keadaan steril yang melibatkan teknik-teknik aseptik. Biji benih terlebih dahulu dicuci dengan klorox (50%) selama 7 minit, klorox (30%) selama 11 minit, klorox (15%) selama 15 minit, alkohol 70% selama 30 saat dan akhir sekali dibilas dengan air suling selama 3 minit sebanyak tiga kali.

Setelah itu, barulah biji benih tersebut dicambahkan di atas media asas MS (Murashige dan Skoog, 1962) dan diletakkan pada suhu $25 \pm 1^\circ\text{C}$ dengan 16 jam cahaya dan 8 jam gelap. Selepas 5 hari iaitu setelah kepanjangan akar primer mencapai julat piawai (40.82 ± 15.39 mm) barulah eksplan hujung akar diambil. Hujung akar sepanjang 2 mm telah diambil dan dikultur di atas media MS dengan kombinasi hormon tertentu seperti yang diterangkan pada bahagian 4.2.2. Setiap perlakuan hormon mempunyai 30 replikasi dan setiap replikasi mempunyai 2 segmen akar yang telah dikultur di dalam bilik kultur yang bersuhu $25 \pm 1^\circ\text{C}$ dengan 16 jam cahaya dan 8 jam gelap.

(b) Penyediaan Media

Media MS telah digunakan dalam kajian ini kerana media MS telah diketahui akan keberkesanannya untuk regenerasi terhadap pelbagai spesies dan kultivar tumbuhan. MS dalam bentuk serbuk telah digunakan dan ditambah dengan sukrosa pada kepekatan 30g/l dengan agar sebanyak 8g/l serta hormon BAP dan NAA di mana kepekatannya adalah seperti pada bahagian 4.4.2. Akhir sekali, air suling telah ditambahkan sehingga isipadu akhir media menjadi 1L dan pH media perlu ditetapkan pada 5.8. Media telah diautoklaf pada suhu 121° C dengan tekanan 103.4 kPa selama 20 minit. Selepas itu, media telah dituang ke dalam jar berisipadu 150 ml yang telah diautoklafkan terlebih dahulu sebanyak 30 ml. Semua kerja-kerja ini telah dilakukan secara aseptik atau di dalam kabinet 'laminar air flow' bagi mengelakkan kontaminasi berlaku.

4.2.2 Pemilihan Kombinasi Hormon Yang Sesuai

Oleh kerana tidak terdapat kajian-kajian terdahulu mengenai kombinasi hormon yang terbaik bagi menginduksikan pucuk dan akar bagi *Zinnia elegans* Jacq., maka kombinasi hormon yang akan digunakan adalah berdasarkan spesies yang tergolong dalam satu famili dengan *Zinnia elegans* Jacq. iaitu famili Compositae. Contohnya seperti *Gerbera sp.*, *Chrysanthemum sp.*, *Heliantheae sp.* dan lain-lain.

Sebanyak 18 kombinasi hormon telah digunakan terhadap spesies ini untuk pemilihan kombinasi terbaik bagi induksi akar untuk menjadi akar baru atau

akar menjadi pucuk di mana dengan ini media terbaik bagi pengakaran dan pembentukan plantlet yang lengkap dapat ditentukan. Setiap perlakuan mempunyai 30 replikasi dan setiap replikasi mempunyai 2 eksplan akar. Kombinasi hormon tersebut adalah seperti berikut :

- 1) Media MS tanpa hormon (kawalan)
- 2) MS + 3.0 mg/l BAP + 3.0 mg/l NAA
- 3) MS + 3.0 mg/l BAP + 2.0 mg/l NAA
- 4) MS + 3.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA
- 5) MS + 3.0 mg/l BAP
- 6) MS + 2.0 mg/l BAP
- 7) MS + 1.0 mg/l BAP
- 8) MS + 0.5 mg/l BAP
- 9) MS + 2.0 mg/l NAA
- 10) MS + 1.5 mg/l NAA
- 11) MS + 1.0 mg/l NAA
- 12) MS + 0.50 mg/l NAA
- 13) MS + 0.25 mg/l NAA
- 14) MS + 0.05 mg/l NAA
- 15) MS + 0.04 mg/l NAA
- 16) MS + 0.03 mg/l NAA
- 17) MS + 0.02 mg/l NAA
- 18) MS + 0.01 mg/l NAA

akar menjadi pucuk di mana dengan ini media terbaik bagi pengakaran dan pembentukan plantlet yang lengkap dapat ditentukan. Setiap perlakuan mempunyai 30 replikasi dan setiap replikasi mempunyai 2 eksplan akar. Kombinasi hormon tersebut adalah seperti berikut :

- 1) Media MS tanpa hormon (kawalan)
- 2) MS + 3.0 mg/l BAP + 3.0 mg/l NAA
- 3) MS + 3.0 mg/l BAP + 2.0 mg/l NAA
- 4) MS + 3.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA
- 5) MS + 3.0 mg/l BAP
- 6) MS + 2.0 mg/l BAP
- 7) MS + 1.0 mg/l BAP
- 8) MS + 0.5 mg/l BAP
- 9) MS + 2.0 mg/l NAA
- 10) MS + 1.5 mg/l NAA
- 11) MS + 1.0 mg/l NAA
- 12) MS + 0.50 mg/l NAA
- 13) MS + 0.25 mg/l NAA
- 14) MS + 0.05 mg/l NAA
- 15) MS + 0.04 mg/l NAA
- 16) MS + 0.03 mg/l NAA
- 17) MS + 0.02 mg/l NAA
- 18) MS + 0.01 mg/l NAA

4.2.3 Langkah-langkah Percambahan dan Pengkulturan Untuk Kajian Sitologi Sel-Sel Akar Primer yang Dikultur Secara *in vitro*.

Kajian sitologi sel-sel akar primer yang dikultur secara *in vitro* hanya melibatkan eksplan akar yang menginduksikan akar sahaja. Eksplan akar berumur seminggu yang paling responsif pada media yang terbaik untuk penginduksian akar akan diambil untuk kajian sitologi dan analisa kelakuan sel. Ini bertujuan untuk membuat perbandingan kelakuan-kelakuan sel akar semasa dikultur secara *in vitro* berbanding *in vivo*.

Parameter-parameter berkaitan kajian sitologi akar seperti Indeks Mitosis, Bilangan Kromosom, Kandungan DNA Nukleus, Purata Luas Sel dan Nukleus serta Masa Penggandaan Sel (Cdt) telah ditentukan ke atas sampel-sampel akar ini.

4.2.4 Penentuan Indeks Mitosis (MI)

Sampel-sampel akar yang berumur 7 hari telah diambil dan diawetkan di dalam larutan 3:1 (v/v) alkohol : asid asetik. Sebanyak 10 sampel akar telah dibuat slaid kekal seperti yang telah diterangkan pada bahagian 3.2.1.

Seterusnya setiap sampel akar akan dikira nilai Indeks Mitosis iaitu peratus sel-sel yang berada pada peringkat profasa, metafasa, anafasa dan telofasa. Sebanyak 1500 sel telah dikira dari 3 slaid yang berlainan.

4.2.5 Bilangan Kromosom

Untuk pengiraan bilangan kromosom bagi sel-sel akar yang dikultur secara *in vitro*, slaid dari bahagian 4.2.4 iaitu pengiraan indeks mitosis telah digunakan. Sebanyak 15 sel yang berada pada peringkat metafasa, telah digunakan untuk pengiraan bilangan kromosom.

4.2.6 Pengukuran Kandungan DNA Nukleus

Slaid-slaid dari bahagian 4.2.4 telah digunakan untuk pengukuran kandungan DNA nukleus. Slaid-slaid telah dianalisis di bawah mikroskop cahaya (Zeiss Axioscope) yang bersambungan dengan VIDAS ‘Image Analysis System’ seperti yang telah diterangkan pada bahagian 3.2.4.

4.2.7 Pengukuran Purata Luas Sel dan Nukleus

Slaid yang telah digunakan adalah berlainan berbanding dengan bahagian 4.2.4 iaitu tiada teknik ‘squash’ dan sel-sel telah diwarnakan dengan 0.2% (w/v) larutan ‘Light Green’ selama 6 minit selepas diwarnakan dengan larutan Feulgen. Penyediaan yang lain adalah sama seperti pada bahagian 3.2.5.

4.2.8 Penentuan Masa Penggandaan Sel (Cdt)

Akar yang berusia seminggu selepas dikultur dalam media MS tanpa hormon iaitu media yang terbaik untuk penginduksian akar dari akar telah

digunakan untuk menentukan masa penggandaan sel. Sebanyak 10 sampel akar telah direndam bagi setiap masa perlakuan dengan 0.025% (w/v) larutan kolkisin iaitu selama 0, 1, 2, 3, 4, 5 dan 6 jam.

Selepas setiap jam pendedahan, semua sampel akar perlu diawetkan dalam 3:1 (v/v) larutan alkohol : asid asetik. Penyediaan slaid kekal adalah sama seperti pada bahagian 3.2.1. Setiap slaid dibuat pemerhatian di bawah mikroskop cahaya dengan kuasa pembesaran x40 di mana peratus sel pada peringkat metafasa dan profasa dikira.

4.3 KEPUTUSAN

4.3.1 Pemerhatian Am Kultur Akar

Daripada 18 kombinasi hormon yang telah digunakan (Jadual 4.1) didapati eksplan akar *Z. elegans* Jacq. tidak memberi sebarang respons atau tidak berpotensi untuk regenerasi membentuk tumbuhan yang lengkap. Daripada jadual 4.1, didapati media MS tanpa hormon adalah media yang terbaik dan tercepat untuk menginduksi akar dari eksplan akar. Berdasarkan kajian ini *Z. elegans* Jacq., tidak memerlukan hormon sama sekali untuk penginduksian akar. Ini kerana hormon yang terhasil secara semulajadi atau “endogenous” di dalam tumbuhan ini sudah cukup untuk menginduksikan akar dari eksplan akar.

Dari jadual 4.1, didapati semakin meningkat perlakuan hormon NAA dari 0.01 ke 0.05 mg/l (Plat 4.1) semakin kurang pemanjangan akar dan pertumbuhannya menjadi terencat. Manakala pertambahan hormon NAA dari 0.25 hingga 2.0 mg/l (Plat 4.2) pula boleh menyebabkan eksplan akar membengkak dan membentuk kalus yang rapuh dan berwarna kuning keperangan.

Penggunaan hormon BAP dari 0.5 hingga 3.0 mg/l (Plat 4.2 dan 4.3) juga didapati tidak berupaya untuk membentuk pucuk dari eksplan akar. Pemanjangan akar juga tidak berlaku sebaliknya eksplan membengkak dan membentuk kalus berwarna putih kekuningan yang separa keras. Kombinasi hormon BAP (1.0-3.0 mg/l) dan NAA (1.0-3.0 mg/l) juga memberikan keputusan yang serupa tetapi pembentukan kalus semakin besar dan keras (Plat 4.3). Dengan ini jelas

menunjukkan eksplan akar dengan penambahan hormon BAP dan NAA samada secara bersendirian atau dalam bentuk kombinasi tidak menunjukkan sebarang respons samada untuk penginduksian akar atau mendapatkan regenerasi tumbuhan yang lengkap. Hanya media MS tanpa hormon saja didapati terbaik dan tercepat untuk induksi akar dari eksplan akar primer tanpa sebarang pembentukan kalus atau pertumbuhan akar yang abnormal.

4.3.2 Indeks Mitosis (MI)

Penentuan Indeks Mitosis (MI) ke atas sel-sel meristem akar *Zinnia elegans* Jacq., yang telah dikultur di atas media MS tanpa hormon secara *in vitro* dilakukan setelah satu minggu eksplan akar di dalam media kultur. Berdasarkan kepada Jadual 4.2, nilai Indeks Mitosis bagi sel akar *in vitro* adalah $15.6 \pm 0.20\%$. Nilai ini didapati lebih tinggi berbanding dengan nilai Indeks Mitosis dalam sel akar primer *in vivo* iaitu $13.47 \pm 0.46\%$. Ini menunjukkan aktiviti sel pada peringkat pembahagian dalam sel akar *in vitro* adalah lebih aktif berbanding sel akar dengan *in vivo*.

4.3.3 Bilangan Kromosom

Nilai purata bilangan kromosom pada peringkat metafasa bagi sel-sel akar dari sistem *in vitro* *Zinnia elegans* Jacq., didapati tidak berbeza dengan sel-sel akar primer dari tumbuhan *in vivo* iaitu $2n = 23$ (Jadual 4.2) dan berjulat di antara 18 hingga 28. Kedua-dua nilai bilangan kromosom sel akar *in vitro* dan *in vivo*

didapati menepati bilangan kromosom sebenar *Zinnia elegans* Jacq., iaitu $2n = 23$ (Terry-Lewandowski *et al.*, 1984).

Torres (1963) dan Terry-Lewandowski *et al.* (1984) mendapati bilangan kromosom bagi *Zinnia violaceae* Cav. dan *Zinnia elegans* Jacq. adalah $2n = 24$. Manakala bagi jenis hibrid atau kacukan interspesifik, mereka mendapati dalam kajian sitologinya bilangan kromosom adalah $2n = 23$.

4.3.4 Penentuan Kandungan DNA Nukleus

Sel-sel akar *in vitro* *Zinnia elegans* Jacq., yang berusia seminggu menunjukkan nilai taburan kandungan DNA yang berbeza sedikit dengan sel-sel akar primer *in vivo*. Bagi sel akar *in vivo* taburan kandungan DNA nukleus adalah 0% pada fasa G1, 14.37% pada S, 55.62% pada G2 dan 33.75% menjadi poliploid.

Bagi sel-sel akar *in vitro* pula didapati kebanyakan sel berada pada fasa G2 iaitu sebanyak 41.62%, poliploid sebanyak 38.38% dan fasa S sebanyak 20.0%. Manakala fasa G1 tetap 0% (Jadual 4.3 dan Rajah 4.2) dan nilai ini didapati sama berbanding dengan sel akar primer dalam keadaan *in vivo*. Daripada keputusan ini menunjukkan kebanyakan sel berada pada fasa G2 dan keadaan poliploid wujud pada kedua-dua keadaan iaitu *in vitro* dan *in vivo*.

4.3.5 Purata Luas Sel dan Nukleus

Berdasarkan kepada Jadual 4.4, nilai purata luas sel bagi akar *in vitro* adalah $92.40 \pm 5.7 \mu\text{m}^2$ (Rajah 4.3) dan purata luas nukleus adalah $36.86 \pm 1.44 \mu\text{m}^2$ (Rajah 4.4). Manakala nisbah luas nukleus : sel ialah 0.48. Keputusan yang diperolehi menunjukkan nilai purata luas sel dan nukleus bagi sel akar *in vitro* adalah lebih rendah berbanding dengan sel akar *in vivo*, tetapi nilai nisbah luas nukleus : sel adalah lebih tinggi bagi sel akar *in vitro* daripada *in vivo*.

4.3.6 Masa Penggandaan Sel

Masa penggandaan sel (Cdt) bagi sel akar *in vitro* yang berumur 7 hari diperolehi daripada persamaan garis lurus $Y = 0.72x - 0.96$ (Rajah 4.1) dengan koefisien korelasi, $r = 0.99$. Dengan menggunakan formula $Cdt = \ln 2/m$, masa penggandaan sel akar *in vitro* yang diperolehi adalah 96 jam (Jadual 4.2). Tempoh 96 jam didapati lebih rendah berbanding dengan tempoh 133 jam bagi sel akar *in vivo*. Ini menunjukkan sel akar *in vitro* memerlukan masa yang lebih singkat untuk menggandakan populasinya daripada sel-sel akar dari sistem *in vivo*.

Jadual 4.1 : Respons yang ditunjukkan oleh eksplan akar *Zinnia elegans* Jacq. di dalam media MS yang mengandungi hormon BAP dan NAA dengan kepekatan dan kombinasi yang berbeza yang telah dikultur pada $25 \pm 1^\circ\text{C}$, di bawah 16 jam cahaya dan 8 jam gelap.

Hormon (mg/l)	Pemerhatian	% Pucuk	% Akar	% Kalus
Tanpa Hormon	Akar terbentuk selepas 2 hari	-	100.0 ± 0.0	-
NAA (0.01)	Akar terbentuk selepas 2 hari dan membentuk kalus	-	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
NAA (0.02)	Akar memanjang selepas 3 hari dan membentuk kalus	-	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
NAA (0.03)	Akar terbentuk selepas 3 hari dan membentuk kalus	-	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
NAA (0.04)	Akar terbentuk selepas 3 hari dan membentuk kalus	-	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
NAA (0.05)	Akar terbentuk selepas 3 hari dan membentuk kalus	-	-	100.0 ± 0.0
NAA (0.25)	Kalus kuning kehijauan	-	-	100.0 ± 0.0
NAA (0.50)	Kalus kuning keperangan	-	-	100.0 ± 0.0
NAA (1.0)	Kalus kuning keperangan	-	-	100.0 ± 0.0
NAA (1.5)	Kalus kuning keperangan	-	-	100.0 ± 0.0
NAA (2.0)	Kalus kuning keperangan	-	-	100.0 ± 0.0
BAP (0.5)	Kalus kuning keperangan	-	-	100.0 ± 0.0
BAP (1.0)	Kalus putih kekuningan	-	-	100.0 ± 0.0
BAP (2.0)	Kalus putih kekuningan	-	-	100.0 ± 0.0
BAP (3.0)	Kalus putih kekuningan	-	-	100.0 ± 0.0
BAP (3.0) + NAA (1.0)	Kalus putih kekuningan	-	-	100.0 ± 0.0
BAP (3.0) + NAA (2.0)	Kalus putih kekuningan	-	-	100.0 ± 0.0
BAP (3.0) + NAA (3.0)	Kalus putih kekuningan	-	-	100.0 ± 0.0

Plat 4.1

Respons yang ditunjukkan oleh eksplan akar *Zinnia elegans* Jacq. yang telah dikultur di dalam media MS dengan kepekatan hormon NAA yang berbeza di bawah 16 jam cahaya dan 8 jam gelap pada $25 \pm 1^\circ\text{C}$.



- A. MS Tanpa Hormon B. 0.01 mg/l NAA C. 0.02 mg/l NAA
D. 0.03 mg/l NAA E. 0.04 mg/l NAA F. 0.05 mg/l NAA

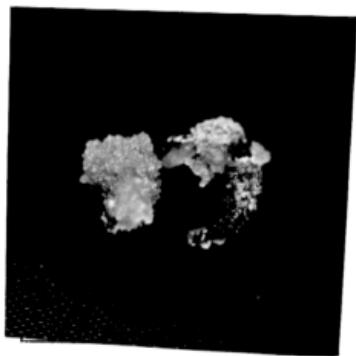
Plat 4.2 : Respons yang ditunjukkan oleh eksplan akar *Zinnia elegans* Jacq. yang telah dikultur di dalam media MS dengan pelbagai hormon.



(a) 0.5 mg/l BAP



(d) 1.0 mg/l NAA



(b) 2.0 mg/l NAA



(e) 0.5 mg/l NAA



(c) 1.5 mg/l NAA



(f) 0.25 mg/l NAA

($\overline{0.5\text{cm}}$, 10x)

Plat 4.3

Respons yang ditunjukkan oleh eksplan akar *Zinnia elegans* Jacq. yang telah dikultur di dalam media MS dengan pelbagai kombinasi hormon.



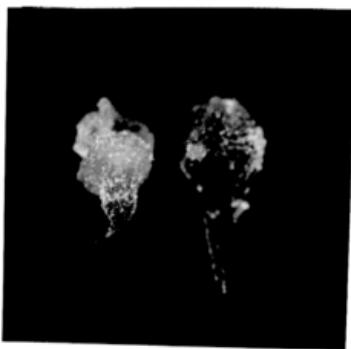
(a) 3.0 mg/l BAP dan 3.0 mg/l NAA



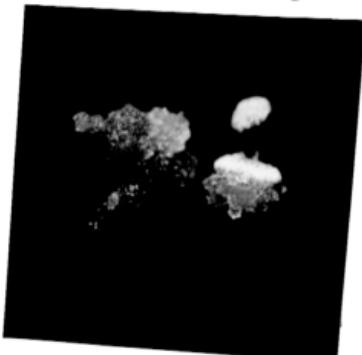
(d) 3.0 mg/l BAP



(b) 3.0 mg/l BAP dan 2.0 mg/l NAA



(e) 2.0 mg/l BAP



(c) 3.0 mg/l BAP dan 1.0 mg/l NAA



(f) 1.0 mg/l BAP

(0.5cm , 10x)

Jadual 4.2: Nilai purata MI, bilangan kromosom, purata luas sel dan nukleus serta masa penggandaan sel bagi sel akar primer *Zinnia elegans* Jacq berusia 7 hari yang telah ditanam secara *in vitro*.

Purata MI \pm SE (%)	Bilangan Kromosom	Masa Penggandaan Sel (Jam)
Julat	Purata	
15.60 \pm 0.20	18- 28	23

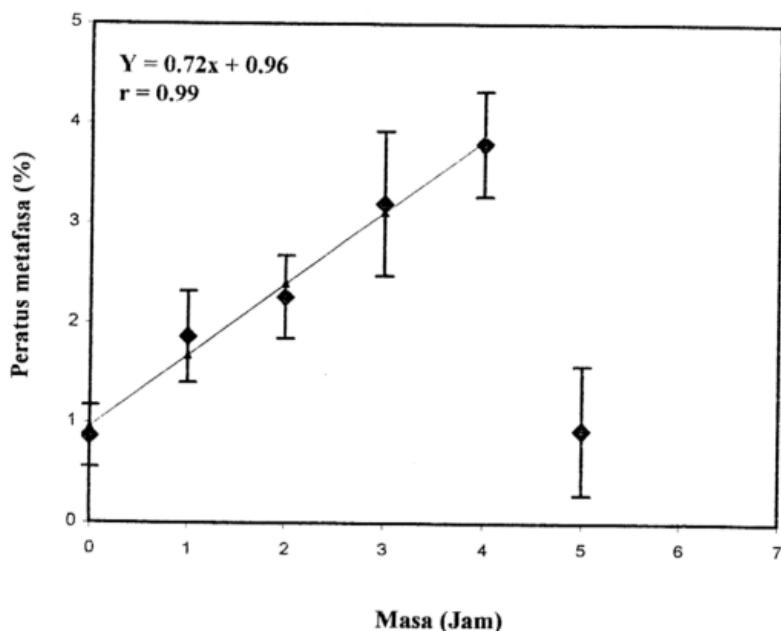
Jadual 4.3: Taburan kandungan DNA nukleus yang berada pada fasa G1, S, G2 dan yang menjadi poliploid bagi sel-sel akar primer *Zinnia elegans* Jacq. berusia 7 hari yang telah ditanam secara *in vitro*.

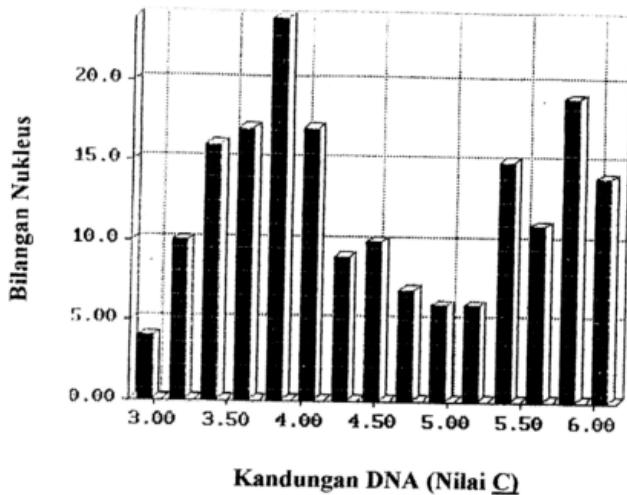
G1 (%)	S (%)	G2 (%)	Poliploid (%)
0	20.0	41.62	38.38

Jadual 4.4: Purata luas sel, luas nukleus serta nisbah luas nukleus : luas sel akar primer *Zinnia elegans* Jacq. berusia 7 hari yang telah ditanam secara *in vitro*.

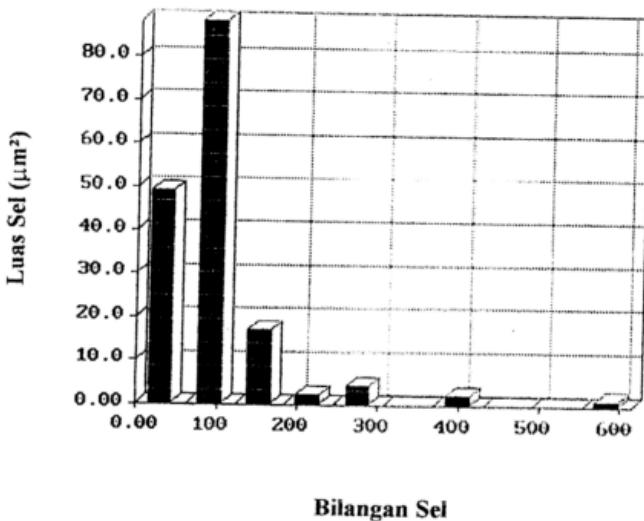
Purata Luas Sel (μm^2)	Purata Luas Nukleus (μm^2)	Nisbah Luas Nukleus : Sel
92.40 \pm 5.70	36.86 \pm 1.44	0.48

Rajah 4.1: Graf Masa Penggandaan Sel (Cdt) menunjukkan perkaitan di antara peratus kekerapan metafasa berbanding dengan tempoh pendedahan kepada 0.025% kolkisin bagi sel-sel akar *in vitro* *Z.elegans* Jacq. yang berusia seminggu.

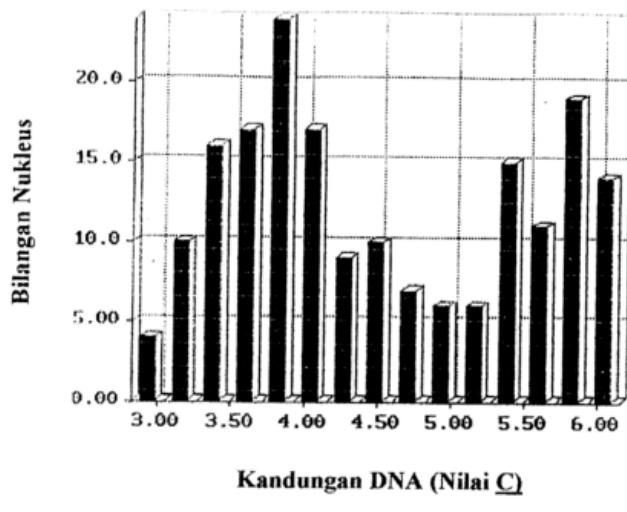




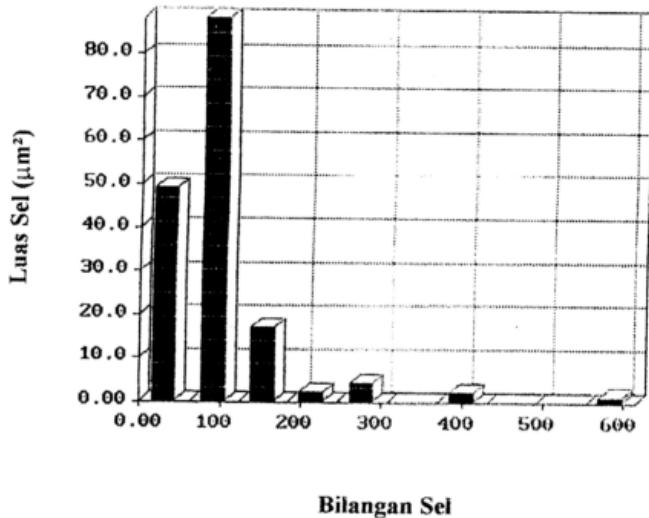
Rajah 4.2 : Taburan kandungan DNA sel akar *in vitro* *Zinnia elegans* yang berusia 7 hari



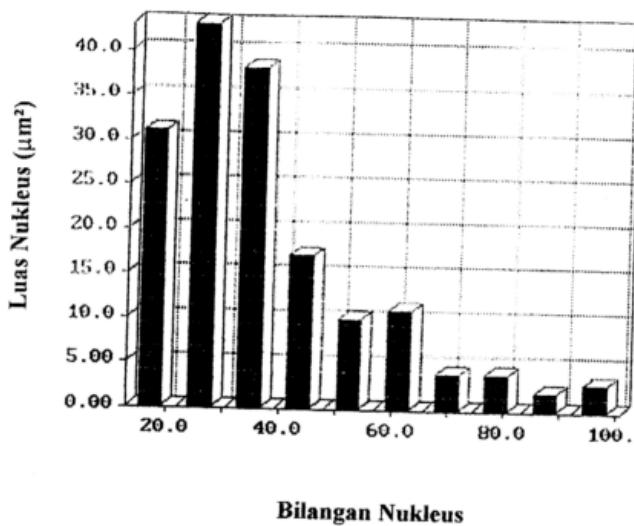
Rajah 4.3 : Taburan luas sel akar *in vitro* *Z. elegans* Jacq. yang berusia 7 hari



Rajah 4.2 : Taburan kandungan DNA sel akar *in vitro* *Zinnia elegans* yang berusia 7 hari



Rajah 4.3 : Taburan luas sel akar *in vitro* *Z. elegans* Jacq. yang berusia 7 hari



Rajah 4.4 : Taburan luas nukleus sel akar *in vitro* *Zinnia elegans* Jacq. yang berusia 7 hari

4.4 RINGKASAN KEPUTUSAN

1. Media MS tanpa hormon telah merupakan media yang terbaik untuk menginduksikan eksplan akar primer kepada akar baru. Walau bagaimanapun tiada sebarang regenerasi tumbuhan yang lengkap diperolehi daripada eksplan akar.
2. Sel-sel akar *Z. elegans* Jacq. yang telah dikultur secara *in vitro* selama 7 hari mempunyai nilai indeks mitosis yang lebih tinggi dari sel akar primer *in vivo* iaitu $15.60 \pm 0.20\%$ berbanding dengan $13.47 \pm 0.46\%$ dari sel-sel *in vivo*.
3. Bilangan kromosom sel-sel akar yang telah ditanam secara *in vitro* selama 7 hari dan ditanam secara *in vivo* selama 5 hari adalah sama iaitu $2n = 23$ dan berjulat di antara 18 hingga 28.
4. Didapati taburan nukleus bagi sel-sel akar *in vitro* dan *in vivo* adalah sama dan kebanyakannya berada di dalam fasa G2 iaitu sebanyak 41.62%. Nilai ini adalah lebih rendah berbanding dengan nilai *in vivo*. Peratus yang berada di dalam fasa S dan poliploid didapati meningkat bagi sel akar *in vitro* berbanding dengan *in vivo* iaitu sebanyak 20.0% dan 38.38% bagi sistem *in vitro* berbanding dengan 14.37% dan 33.75% bagi sistem *in vivo*. Bagi fasa G1, didapati tiada sel-sel yang berada pada fasa ini bagi kedua-dua keadaan.
5. Sel-sel akar *in vitro* berusia 7 hari didapati mempunyai purata luas sel dan nukleus yang lebih kecil berbanding dengan sel akar *in vivo* iaitu 92.40 ± 5.70 (μm^2) dan 36.86 ± 1.44 (μm^2) berbanding dengan *in vivo* iaitu 113.55 ± 4.44 (μm^2) dan 40.58 ± 0.95 (μm^2). Manakala nisbah luas nukleus : sel

didapati lebih besar bagi *in vitro* iaitu 0.48 berbanding dengan 0.39 dalam keadaan *in vivo*.

6. Sel-sel akar dari sistem *in vitro* memerlukan masa yang lebih singkat berbanding dengan sistem *in vivo* untuk menggandakan populasinya. Masa penggandaan sel yang diperlukan bagi sel-sel akar *in vitro* adalah 96 jam manakala sel-sel akar *in vivo* memerlukan masa 133 jam.