

## BAB 5

### KAJIAN KULTUR TISU KE ATAS TANAMAN HIASAN *Zinnia elegans* Jacq.

#### 5.1 TUJUAN EKSPERIMENT

Tujuan utama eksperimen ini dijalankan adalah untuk melihat kesesuaian propagasi *in vitro* ke atas tanaman hiasan *Zinnia elegans* Jacq. Juga bertujuan untuk mendapatkan media yang optima untuk penggandaan pucuk dan pembentukan akar dengan menggunakan pelbagai kombinasi hormon auksin dan sitokinin. Di samping itu juga kajian ini bertujuan untuk melihat respons pelbagai jenis eksplan seperti daun, pucuk, batang dan akar di dalam usaha untuk mendapatkan eksplan yang paling responsif untuk pembentukan pucuk berganda.

Kajian kultur tisu menggunakan eksplan vegetatif dan reproduktif tanaman hiasan melibatkan 3 peringkat utama iaitu penghasilan kalus, pembentukan pucuk aksilari atau adventitius dan pembentukan akar. Setiap proses regenerasi membentuk plantlet yang lengkap bermula dari eksplan tumbuhan induk. Justeru itu peranan media dalam menentukan komposisi nutrien yang sesuai sebagaimana sesuatu tisu tumbuhan, akar atau daun itu perolehi dari tumbuhan induknya adalah penting untuk initiasi akar dan pucuk. Beberapa faktor yang memainkan peranan penting dalam kejayaan sesuatu sistem kultur *in vitro* ialah formulasi media, sumber karbon dan tenaga, pH media, hormon tumbesaran tumbuhan, eksplan, cahaya, suhu, polariti dan lain-lain.

## MEDIA

Komposisi sesuatu media merupakan faktor yang paling penting dalam menentukan tumbesaran dan pembentukan morfogenesis sesuatu tisu tumbuhan. Terdapat beberapa jenis formulasi media yang selalu digunakan di dalam kajian kultur tisu tumbuhan seperti media Murashige dan Skoog (1962), White (1963) dan Gamborg (1968) atau lebih dikenali sebagai media B5. Secara amnya perbezaan utama di dalam formulasi sesuatu media adalah tahap kepekatan komposisi media atau garam mineralnya. Perbezaan tahap kepekatan ini boleh diklasifikasikan kepada 3 jenis iaitu tahap kepekatan garam mineral yang tinggi seperti media Murashige dan Skoog (1962), tahap kepekatan garam mineral yang sederhana seperti dalam media Nitsch dan Nitsch (1969) serta tahap kepekatan garam mineral yang rendah seperti dalam media White (1963).

Bagi kajian kultur tisu terhadap tanaman hiasan untuk mendapatkan morfogenesis, media Murashige dan Skoog (1962) selalu digunakan. Media Gamborg, B5 pula lebih digemari untuk mendapatkan proliferasi sel yang cepat dengan penambahan 2,4-D (Gamborg, 1968). Kebiasaananya komposisi sesuatu media terdiri dari garam mineral seperti makronutrien dan mikronutrien, sukrosa sebagai sumber karbon dan tenaga, vitamin dan komposisi organik yang lain.

## FORMULASI MEDIA

Formulasi media Murashige dan Skoog (1962) didapati terbaik untuk kajian kultur tisu ke atas tanaman hiasan kerana komposisi nitrat, potassium dan

ammonianya yang tinggi. Murashige dan Skoog (1962) di dalam kajian mereka terhadap cara penyediaan ferum di dalam media MS berbanding dengan media lain mendapatkan formulasi media MS berupaya dan sangat berkesan untuk mengurangkan nekrosis atau kehilangan pigmen hijau di dalam daun. Media Gamborg, B5 pula didapati sangat sesuai untuk kultur sel kacang soya di mana komposisi nitrat dan potassiumnya adalah tinggi. Media Schenk dan Hildebrandt juga didapati memainkan fungsi yang sama seperti media Gamborg, B5 tetapi komposisi garam mineralnya lebih tinggi berbanding media B5 (Gamborg *et al.*, 1976). Media White pula selalu digunakan di dalam kajian kultur tisu tumbuhan dengan modifikasi pada komposisi potassium dan nitrogen. Ini kerana formulasi asal didapati terlalu rendah serta tidak sesuai untuk mendapatkan kalus dan sukar untuk mendapatkan pertumbuhan kultur ampaian sel bagi kebanyakan spesies tumbuhan (Gamborg *et al.*, 1976).

### **5.1.3 SUMBER KARBON DAN TENAGA**

#### **SUKROSA**

Kebanyakan kajian kultur tisu tumbuhan menggunakan sukrosa sebagai sumber karbon yang utama. Ini kerana walaupun glukosa dan fruktosa boleh digunakan sebagai pilihan alternatif tetapi sumber karbohidratnya rendah dan tidak mencukupi untuk tumbuhan. Karbohidrat mempunyai 2 fungsi utama di dalam media iaitu sebagai sumber tenaga kepada tisu dan sebagai pengawalaturan keupayaan osmosis (Conger, 1981).

Takayama dan Misawa (1979) di dalam kajian mereka terhadap kesan sukrosa mendapatkan kepekatan sukrosa yang tinggi boleh merencatkan proses organogenesis pada famili Liliaceae. Pada kepekatan sukrosa 30g/l didapati 100% eksplan tunas pucuk tumbuhan Liliaceae boleh menghasilkan ‘bulblet’ berganda. Manakala pada kepekatan sukrosa 90g/l cuma 28% sahaja yang berupaya memberi respons manakala 72% lagi cuma menghasilkan kalus sahaja.

## AGAR

Agar adalah salah satu unsur organik yang biasa digunakan di dalam kajian kultur tisu dan jumlah agar yang digunakan berbeza mengikut keperluan. Sebagai contoh media Murashige dan Skoog mengikut formulasi asal menggunakan 10g/l (1%) agar, tetapi ramai penyelidik mengurangkannya kepada 8g/l atau kurang daripada itu. Sebab utama agar dikurangkan kepada 8g/l adalah kerana ia boleh mengganggu potensi osmosis di mana ini akan mengurangkan penyerapan nutrien dan sebatian organik oleh tisu atau eksplan tumbuhan (Hughes, 1981).

## pH MEDIA

Walaupun terdapat kajian dan laporan yang menggunakan pH 5.0 atau kurang di dalam penyediaan media kultur tisu seperti *Rhododendron* dan “Blueberries” yang menggunakan pH 4.5 (Anderson, 1975). Kebanyakan spesies tumbuhan di dalam kajian kultur tisu, menggunakan pH 5.6 hingga 5.8 (Hughes, 1981)

## HORMON TUMBESARAN TUMBUHAN

Morfogenesis secara *in vitro* bagi sesuatu eksplan adalah sangat dipengaruhi oleh hormon pengawalatur tumbesaran auksin dan sitokin yang dibekalkan ke dalam media atau yang terhasil secara semulajadi (endogenous) di dalam sel yang dikultur. Walau bagaimanapun kadarnya bagi sesuatu spesies tumbuhan adalah berbeza (George dan Sherrington, 1984). Jenis atau tahap sesuatu organogenesis pula boleh ditentukan oleh nisbah auksin kepada sitokin (Skoog dan Miller, 1957).

Miller dan Skoog (1953) menyatakan perbezaan dan pembentukan organogenesis daripada kalus sangat bergantung kepada kadar nisbah yang betul antara auksin dan sitokin. Di samping itu, faktor-faktor seperti formulasi media, vitamin, kesan kala cahaya, intensiti cahaya, kepekatan agar dan penambahan kompleks organik juga banyak mempengaruhi proses organogenesis. Jenis-jenis hormon yang biasa digunakan di dalam kajian kultur tisu ke atas tanaman hiasan :

### Auksin

IAA	“Indole-3-acetic acid”	Semulajadi
IBA	“Indole-3-butyric acid”	Sintetik
NAA	“ $\alpha$ -Naphthalene-acetic acid”	Sintetik
2,4-D	“2,4-Dichlorophenoxyacetic acid”	Sintetik
2,4,5-T	“2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid”	Sintetik
PICLORAM	“4-Amino-3,5,6-trichloropicolinic acid”	Sintetik

## Sitokinin

ZEATIN	“4-Hydroxy-3-methyl-trans-2-butenylaminopurine”	Semulajadi
2-iP	“N <sup>6</sup> -(2-isopentyl) adenine”	Semulajadi
KINETIN	“6-Furfurylaminopurine”	Sintetik
BAP	“6-Benzylaminopurine”	Sintetik
TDZ	“(N-Phenyl-N'-1,2,3-Thiadiazol-Gylurea)”	Sintetik
PBA	“6-(Benzylamino)-9-(2-tetrahydropyranyl)-9H-purine”	Sintetik

## AUKSIN

Auksin berupaya untuk mengawal proses tumbesaran dan pemanjangan sel. Terdapat dua jenis auksin iaitu auksin yang dihasilkan secara semulajadi atau auksin sintetik. Pemilihan jenis auksin dan kepekatan yang diperlukan bergantung kepada jenis perkembangan dan pertumbuhan sel, kandungan auksin endogenous di dalam eksplan, keupayaan tisu yang dikultur untuk mensintesis auksin secara semulajadi dan kesan interaksi di antara auksin sintetik dan auksin endogenous (George dan Sherrington, 1984).

Pada kepekatan yang tinggi auksin sintetik seperti 2,4-D dan 2,4,5-T akan bertindak sebagai fitotoksik terutama terhadap tumbuhan berdaun lebar dan didapati menghalang proses morfogenesis (Hill, 1967; Street, 1979 dan Staba *et al.*, 1965). Pada kepekatan yang rendah, ia boleh menggalakkan morfogenesis berlaku. NAA pula didapati mempunyai kesan perencatan yang kurang berbanding dengan IAA. Pikloram didapati lebih berkesan dalam menginduksi

proliferasi sel berbanding dengan 2,4-D dalam kebanyakan tumbuhan (Chernova *et al.*, 1975).

Rao *et al.* (1973) mendapati penggunaan 2,4-D pada 100-2000 $\mu$ M/l terhadap eksplan batang dan daun *Petunia inflata* boleh menghasilkan pembentukan embrio. Kepekatan terbaiknya adalah pada 200  $\mu$ g/l dan 500  $\mu$ g/l. Hussey (1975) pula mendapati 2,4-D adalah lebih berkesan berbanding dengan NAA untuk induksi pucuk pada *Narciso* tetapi pada kebanyakan spesies tumbuhan monokotiledon yang lain didapati NAA adalah yang terbaik.

Regenerasi lengkap daripada tisu tumbuhan dengan kehadiran kedua-dua hormon auksin dan sitokinin pada tanaman hiasan adalah amat sukar dan jarang berlaku. Sebagai contoh pada tumbuhan *Haworthia* (Kaul dan Sabharwal, 1972), penggunaan 2,4-D hanya menginduksikan akar saja manakala pembentukan pucuk didapati terencat. Pembentukan akar selalunya terbantut dengan kehadiran sitokinin manakala proliferasi pucuk selalunya memerlukan kehadiran auksin dan sitokinin. Walau bagaimanapun di dalam proses subkultur, sitokinin sahaja sudah mencukupi untuk proliferasi pucuk. Auksin yang selalu digunakan di dalam kajian kultur tisu adalah 2,4-D, IAA, IBA dan NAA. Manakala sitokinin pula adalah kinetin dan BAP (Hughes, 1981).

## SITOKININ

Sitokinin penting di dalam mengawalatur tumbesaran dan pembentukan morfogenesis dalam kultur tisu. Penggunaan sitokinin dengan kombinasi auksin

didapati boleh merencatkan proses pembentukan akar. Proliferasi pucuk pula selalunya memerlukan kehadiran kedua-dua auksin dan sitokinin pada peringkat permulaan tetapi pada peringkat penggandaan atau subkultur penggunaan sitokinin sahaja sudah mencukupi (Hughes, 1981)

Sitokinin juga didapati boleh melanjutkan proses metafasa di dalam mitosis dan diperlukan untuk mengawalatur sintesis protein yang terlibat di dalam pembentukan gelendung sel (Jouanneau, 1973; 1975). Kekurangan sitokinin pula boleh menyebabkan pembahagian sel nukleus terhenti pada satu peringkat dalam kitaran sel (Jouanneau, 1973).

Secara amnya diakui pembentukan kalus adalah satu proses antagonisme kepada penghasilan akar dan proliferasi pucuk. Untuk ini pembentukan kalus hendaklah dielakkan di dalam kajian kultur tisu terutama tumbuhan yang mempunyai kepentingan dan nilai dari segi hortikultur. Ini kerana kultur kalus didapati boleh meningkatkan kadar variasi somaklon. Oleh itu, untuk mendapatkan proliferasi akar dan pucuk yang maksima, tanpa berlaku variasi somaklon pembentukan kalus hendaklah minima atau tiada langsung (Hughes, 1981).

James dan Newton (1977) mendapati kepekatan BAP dan IBA yang terbaik untuk menghasilkan pembentukan pucuk 'adventitious' pada 'Gento' "strawberry" adalah pada kepekatan 0.25-1.0  $\mu\text{mol/l}$  dan 0.25-2.5  $\mu\text{mol/l}$  di mana tiada masalah pembentukan morfologi yang abnormal seperti daun melengkung dan tiada pembentukan kalus berlaku.

### **5.1.6 EKSPLAN**

Eksplan adalah sebahagian atau cebisan tisu atau organ tumbuhan yang dipotong dari tumbuhan untuk memulakan kultur tisu. Kejayaan dan keupayaan sesuatu eksplan dipengaruhi oleh banyak faktor yang mewarisi sesuatu eksplan itu seperti sifat genotip eksplan, saiz eksplan, umur fisiologi dan juga sumber tisu atau organ tumbuhan (Conger, 1981 dan Hughes, 1981).

### **SAIZ EKSPLAN**

Saiz eksplan yang terlalu kecil mempunyai kadar pembezaan dan kehidupan yang rendah dalam kultur samada daripada tisu atau kalus. Di dalam kajian yang dilakukan terhadap *Dianthus sp.*, penggunaan eksplan meristem apeks bersaiz 0.09mm didapati tidak berkeupayaan untuk membentuk morfogenesis. Manakala eksplan yang sama bersaiz 0.2mm memberikan respons yang sedikit. Hanya eksplan bersaiz 0.35mm sahaja didapati menghasilkan banyak pucuk berganda. Bagi eksplan yang bersaiz 0.5mm, penghasilan pucuk berganda adalah menurun. Ini adalah kerana kehadiran tisu subapikal. Oleh itu, eksplan yang terlalu besar juga memberikan respons yang kurang baik (Hughes, 1981).

Bilangan pucuk yang terhasil adalah sangat bergantung kepada saiz eksplan. Eksplan hujung pucuk bersaiz 0.2 - 0.5mm dan juga eksplan meristem apeks bersaiz 0.1 - 0.2mm didapati mampu menghasilkan hanya satu pucuk. Manakala eksplan yang bersaiz besar 0.5 - 1.55mm dapat menghasilkan pucuk berganda (Hughes, 1981).

## SUMBER EKSPLAN

Tisu tumbuhan yang embriogenik atau yang berkeupayaan untuk menghasilkan embrio adalah terhad dan berbeza mengikut jenis tisu serta spesies tumbuhan. Lazimnya tisu tumbuhan yang tidak mempunyai keupayaan embriogenik, mempunyai keupayaan untuk membentuk organogenesis. Jenis sel tumbuhan yang digunakan dapat menentukan tahap keupayaan dan tumbesaran untuk proses organogenesis ini (Skirvin, 1981).

Sebagai contoh kalus yang didapati dari eksplan akar *Nigella sativa* hanya menghasilkan akar sahaja, manakala kalus yang didapati dari batang dan daun tumbuhan yang sama hanya menghasilkan pucuk sahaja (Banergee dan Gupta, 1976). Takayama dan Misawa (1979) di dalam kajian mereka terhadap *Lilium auratum* dan *Lilium speciosum* mendapati 53% dari eksplan pedunkel, 75% dari eksplan petal dan 95% dari eksplan mata tunas beбавang menghasilkan umbisi berganda. Eksplan daun dan anter didapati tiada respons manakala eksplan dari mata tunas beбавang yang dikultur secara *in vitro* boleh menghasilkan 100% umbisi berganda. Ini menunjukkan eksplan yang didapati secara *in vitro* sangat berkesan dalam proses morfogenesis. Keadaan yang sama juga didapati berlaku pada spesies Gesneriaceae (Hughes, 1981).

Tisu-tisu tumbuhan yang berlainan takson juga memberikan respons yang berbeza terhadap proses morfogenesis. Hussey (1976) telah melaporkan kesan eksplan umbisi, daun, batang inflorescen dan ovarii terhadap 12 jenis tumbuhan monokot adalah berbeza. Beliau mendapati kesemua eksplan bagi Liliaceae,

*Hyacinthus*, *Muscari*, *Ornithogalum* dan *Scilla* boleh menghasilkan plantlet. Bagi *Iridaceae* dan *Amaryllidaceae* hanya eksplan umbisi dan batang inflorescen sahaja yang memberi respons. Tulip sahaja didapati tidak menunjukkan sebarang respons bagi kesemua eksplan. Ini menunjukkan setiap famili dan spesies mempunyai respons eksplan yang berbeza.

Petru dan Landa (1974) telah melaporkan eksplan hipokotil dan hujung pucuk Carnation dapat memberikan respons yang berbeza di mana setiap satu memerlukan komposisi media dan hormon yang berbeza untuk pembentukan organogenesis dan morfogenesis. Buys *et al.* (1966) pula mendapati eksplan yang berbeza memerlukan nutrien yang berbeza untuk regenerasi lengkap tumbuhan

## **UMUR FISIOLOGI EKSPLAN**

Umur fisiologi eksplan juga banyak mempengaruhi jenis dan tahap morfogenesis di dalam kultur tisu tumbuhan. Bahagian meristem merupakan eksplan yang terbaik kerana tisu-tisunya adalah yang termuda dan kurang berlaku pembezaan sel tisu. Penggunaan bahagian meristem sebagai eksplan selalunya membawa lebih kejayaan kepada kebanyakan kajian kultur tisu bagi kebanyakan spesies tumbuhan (Hughes, 1981).

Secara amnya tisu-tisu muda mempunyai keupayaan morfogenesis yang lebih tinggi berbanding dengan tisu tua. Eksplan daun daripada tisu muda *Passiflora suberosa* sebagai contoh boleh menghasilkan bunga pada frekuensi yang tinggi berbanding dengan tisu daun tua (Scorza dan Janick, 1979). Begitu

juga pada spesies *Iris* di mana penggunaan eksplan batang yang mengandungi tisu muda sahaja didapati dapat menghasilkan pucuk (Weiler dan Emershad, 1977). Keputusan yang sama juga didapati pada spesies *Gladiolus* (Ziv *et al.*, 1970).

Pierik *et al.* (1974; 1976) pula mendapati kalus boleh diperolehi daripada tisu muda atau embrio bagi *Anthurium* tetapi untuk tisu tua didapati tiada respons. Pierik dan Steegmans (1975) dalam kajian mereka terhadap *Rhododendron* mendapati keupayaan eksplan batang untuk menginduksikan akar semakin berkurangan dengan bertambahnya usia eksplan batang. Dalam spesies tumbuhan berkayu pula, embrio dan tisu daripada anak benih didapati mempunyai keupayaan yang tinggi untuk regenerasi (Cheng, 1975; Konar dan Oberoi, 1965; Hu dan Sussex, 1971).

Eksplan embrio daripada Ivy yang berada pada fasa juvenil didapati mempunyai keupayaan regenerasi yang tinggi tetapi potensi regenerasi kembali menurun selepas tisu membentuk kalus (Banks *et al.*, 1979). Pemerhatian ini menyokong kajian yang telah dilakukan ke atas spesies-spesies tumbuhan lain di mana didapati potensi morfogenesis semakin berkurangan dengan pembentukan kalus (Murashige, 1974).

## **CAHAYA**

Beberapa kajian telah menunjukkan bahawa cahaya memainkan peranan yang penting dalam proses organogenesis. Kalus daripada famili Iridaceae yang dikultur dalam gelap akan menghasilkan pucuk bila dipindah kepada cahaya

(Bajaj dan Pierik, 1974; Simonsen dan Hildebrandt, 1971; Hussey, 1976). Pemerhatian yang sama juga diperolehi terhadap *Liliaceae* dan *Heloniopsis orientalis* (Kato, 1978). Hasegawa *et al.* (1973) pula mendapati pengkulturan yang berterusan di dalam gelap akan mengurangkan bilangan pucuk di dalam kultur *Asparagus*. Eksperimen yang dijalankan ke atas *Nicotiana tabacum* menunjukkan cahaya adalah faktor kritikal untuk inisiasi pucuk dan mempengaruhi pertumbuhan akar (Murashige dan Nakano, 1968). Walau bagaimanapun dalam kebanyakan spesies tumbuhan cahaya didapati merencat pertumbuhan akar (Pierik dan Steegmans, 1975; Leroux, 1971).

Cahaya juga didapati meningkatkan pengumpulan kanji di dalam sel-sel yang khusus melalui fotosintesis. Thorpe dan Murashige (1970) mendapati terdapat perbezaan bererti antara pengumpulan kanji di dalam sel kalus tembakau dengan pembentukan pucuk primordia. Sel yang tidak menghasilkan pucuk primordia didapati tiada pengumpulan kanji. Penghasilan kanji adalah penting sebagai sumber tenaga untuk pembentukan pucuk dan meningkatkan aktiviti respirasi. Kanji juga bertindak sebagai agen osmosis dan pengumpulan kanji didapati semakin meningkat dengan kehadiran sitokinin terutamanya kinetin (Thorpe dan Meier, 1972; Thorpe, 1974).

## KALA CAHAYA

Kajian awal terhadap *Bryophyllum tubiflorum* dan *B. daigremontianum* menunjukkan kala cahaya memberi kesan terhadap pembentukan mata tunas (Sironval, 1965; Heide, 1965a). Pemerhatian yang sama didapati pada *Begonia x*

*cheimantha* (Heide, 1965b), *Streptocarpus* (Applegren dan Heide, 1972) dan *Begonia x hiemalis* (Hilding dan Welander, 1976). Tempoh kala cahaya yang efektif untuk proses morfogenesis adalah berbeza mengikut jenis takson tumbuhan. Jangkamasa kala cahaya selama 12 jam untuk penghasilan pucuk *Helianthus* didapati adalah yang paling optima (Gautheret, 1969) dan 16 jam didapati yang terbaik untuk induksi bunga pada tembakau (Tran Thanh Van, 1977). Manakala 15 – 16 jam adalah yang paling maksimum untuk pembentukan mata tunas daripada kalus pada *Geranium*. Jangkamasa cahaya yang kurang atau lebih dari 15 hingga 16 jam didapati akan mengurangkan frekuensi pembentukan mata tunas *Geranium*. Apabila cahaya diberi berterusan kalus tidak bertukar kepada hijau dan pembentukan mata tunas tidak akan berlaku (Pillai dan Hildebrandt, 1969).

Eksplan meristem apeks *Pharbitis nil* yang diberi jangkamasa cahaya 16 – 24 jam telah berjaya menghasilkan plantlet. Cahaya yang berterusan pula berjaya menghasilkan morfogenesis tanpa sebarang perencatan (Bapat dan Rao, 1977). Respons jangkamasa kala cahaya juga didapati memberi kesan terhadap kepekatan auksin dan sitokinin endogenous di dalam tumbuhan. Kandungan auksin dan sitokinin endogenous pada *Begonia* dan *Bryophyllum* didapati meningkat dengan bertambahnya jangkamasa kala cahaya (Heide, 1965a; Heide dan Skoog, 1967).

## KEAMATAN CAHAYA

Murashige (1974) mendapati keamatian cahaya yang optima untuk kultur tisu tumbuhan adalah berbeza mengikut keperluan tumbuhan itu sendiri. Untuk

inisiasi dan penggandaan pucuk keamatan cahaya optima yang diperlukan adalah sekitar 1000 lux. Manakala untuk proses pembentukan akar keamatan cahaya yang diperlukan adalah 3000 hingga 10 000 lux. Keamatan cahaya yang tinggi telah didapati dapat menambahkan peratus kehidupan tumbuhan apabila dipindah ke tanah. Keamatan cahaya yang berbeza juga memberikan kesan terhadap jenis pertumbuhan di dalam kultur. Pertambahan keamatan cahaya dari 3000 kepada 6000 lux menyebabkan peningkatan pembentukan pucuk di dalam *Begonia x hiemalis* tetapi tiada pertambahan di dalam berat kering (Welander, 1978). Peningkatan keamatan cahaya dari 1000 kepada 3000 lux pada *Asparagus* menyebabkan pembezaan morfologi yang nyata pada peratus pembentukan dan pemanjangan pucuk (Hasegawa *et al.*, 1973).

## SUHU

Kajian awal terhadap pertumbuhan dan perkembangan sel-sel tumbuhan menunjukkan julat optima suhu adalah di antara 26 - 28°C. Perbezaan yang agak luas juga didapati pada spesies yang berlainan. Pada *Ipomoea* pertumbuhan kultur ampaian sel yang maksimum adalah pada 25 - 32°C (Carew dan Staba, 1965; Puchan dan Martin, 1971). Pertumbuhan *Narcissus* (Seabrook dan Cumming, 1978) dan penginduksian akar pada eksplan *Rhododendron* (Pierik dan Steegmans, 1975) yang terbaik didapati pada suhu 25°C. Takayama dan Misawa (1979), dalam kajiannya mendapati pembentukan umbisi yang terbaik pada *Lilium auratum* adalah pada suhu 20°C dan berkurangan pada suhu 30°C. Umumnya keperluan suhu untuk pertumbuhan sesuatu kultur tisu tumbuhan adalah sekitar 25°C.

Suhu juga mempengaruhi jenis pertumbuhan dan morfogenesis di dalam kultur tisu sesuatu spesies tumbuhan. Tanaka dan Sakanishi (1978) mendapati pengkulturan tangkai bunga *Phalaenopsis* pada 25°C menunjukkan penghasilan dan perkembangan pucuk yang reproduktif. Goloff *et al.* (1979) pula mendapati pada suhu 17°C eksplan salad telah menghasilkan pucuk tetapi hanya dengan kehadiran kinetin yang berkepekatan tinggi. Pada suhu 28°C, penghasilan pucuk masih lagi terhasil tetapi hanya pada media MS tanpa hormon. Ini menunjukkan terdapat interaksi antara auksin endogenous dengan suhu di dalam proses morfogenesis.

## POLARITI

Polariti atau orientasi eksplan pada permukaan media juga mempunyai kesan atau mempengaruhi proses organogenesis. Kesan akibat polariti ini adalah disebabkan oleh beberapa faktor seperti penyerapan dan pengangkutan hormon atau bahan kimia ke dalam tumbuhan atau eksplan dan perbezaan anatomi di antara tisu eksplan. Ini terbukti apabila didapati induksi pucuk semakin bertambah apabila permukaan bahagian atas eksplan diletakkan di atas media berbanding permukaan bahagian bawah eksplan pada *Gladiolous* (Ziv *et al.*, 1970). Bagi *Narcissus* pula orientasi eksplan yang berlawanan adalah perlu untuk proses organogenesis. Jika mengikut orientasi yang sebenar tiada organogenesis yang berlaku (Seabrook *et al.*, 1976).

## SUBKULTUR

Terdapat bukti dan kajian yang banyak mengatakan subkultur yang berulang kali terhadap kalus dan kultur ampaian sel boleh mengurangkan potensi morfogenesis (Hill, 1967; Chen dan Galston, 1967; Pearson, 1979; Vasil *et al.*, 1964; Reinert dan Backs, 1968). Eksperimen yang dijalankan terhadap kalus *Convolvulus* menunjukkan selepas 3 atau lebih subkultur sebahagian daripada kalus hilang keupayaan untuk morfogenesis (Hill, 1967). Reinert dan Backs (1968) pula mendapati keupayaan morfogenesis beransur-ansur berkurangan di dalam kultur jangka panjang bagi tumbuhan lobak.

Pada *Isatis tinctoria* pula didapati keupayaan penghasilan pucuk semakin berkurangan selepas beberapa kali disubkultur dan kembali normal selepas penambahan kinetin ke dalam media (Danckwardt-Lilliestrom, 1957). Pemerhatian yang sama juga diperolehi pada kultur lobak (Wochok dan Wetherell, 1972).

Terdapat juga sel dan tisu yang kembali regeneratif selepas disubkultur berulang kali untuk suatu jangka masa yang panjang. Pada kalus *Chrysanthemum* yang mengandungi sel meristikatik didapati dapat kembali menunjukkan potensi morfogenesis selepas tiga setengah tahun di subkultur (Earle, 1974). Sheridan (1974) juga memperolehi keputusan yang sama pada *Lilium longiflorum*.

## **5.2 BAHAN DAN KAEDAH**

### **5.2.1 Percambahan Biji Benih, Pensterilan Eksplan dan Kaedah Kultur**

Biji benih *Z.elegans* dicambahkan secara aseptik di atas media MS tanpa hormon seperti pada bahagian 2.2. Anak benih yang berusia seminggu telah digunakan sebagai sumber eksplan untuk mendapatkan bahagian-bahagian kotiledon, hipokotil, daun dan batang. Kesemua eksplan dipotong sepanjang 5mm x 5mm dan dikultur di atas media MS dengan pelbagai kombinasi auksin dan sitokinin pada suhu  $25\pm1^{\circ}\text{C}$  dengan 16 jam cahaya dan 8 jam gelap. Setelah 4 minggu kerja-kerja pengumpulan dan pengambilan data telah dilakukan.

### **5.2.2 Penentuan Kombinasi Hormon BAP dan NAA yang Sesuai**

Sebanyak 21 kombinasi hormon BAP dan NAA telah digunakan untuk mendapatkan julat yang sesuai untuk pembentukan kalus, pucuk dan akar. Berikut adalah kombinasi hormon yang telah digunakan di dalam kajian ini :

1. MS + 1.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA
2. MS + 1.0 mg/l BAP + 2.0 mg/l NAA
3. MS + 1.0 mg/l BAP + 3.0 mg/l NAA
4. MS + 1.0 mg/l BAP + 4.0 mg/l NAA
5. MS + 1.0 mg/l BAP + 5.0 mg/l NAA
6. MS + 2.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA
7. MS + 2.0 mg/l BAP + 2.0 mg/l NAA

8. MS + 2.0 mg/l BAP + 3.0 mg/l NAA
9. MS + 2.0 mg/l BAP + 4.0 mg/l NAA
10. MS + 2.0 mg/l BAP + 5.0 mg/l NAA
11. MS + 3.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA
12. MS + 3.0 mg/l BAP + 2.0 mg/l NAA
13. MS + 3.0 mg/l BAP + 3.0 mg/l NAA
14. MS + 3.0 mg/l BAP + 4.0 mg/l NAA
15. MS + 3.0 mg/l BAP + 5.0 mg/l NAA
16. MS + 4.0 mg/l BAP + 5.0 mg/l NAA
17. MS + 5.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA
18. MS + 5.0 mg/l BAP + 2.0 mg/l NAA
19. MS + 5.0 mg/l BAP + 3.0 mg/l NAA
20. MS + 5.0 mg/l BAP + 4.0 mg/l NAA
21. MS + 5.0 mg/l BAP + 5.0 mg/l NAA

### **5.2.3 Penentuan Kombinasi Hormon BAP dan NAA Untuk Pembentukan Pucuk**

Sebanyak 16 perlakuan telah digunakan untuk mendapatkan inisiasi pucuk berdasarkan kajian dan pemerhatian pada bahagian 5.2.2. Kombinasi hormon yang telah digunakan adalah seperti berikut :

1. MS + 0.1 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA
2. MS + 0.1 mg/l BAP + 0.2 mg/l NAA
3. MS + 0.1 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA
4. MS + 0.2 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA

5. MS + 0.2 mg/l BAP + 0.2 mg/l NAA
6. MS + 0.3 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA
7. MS + 0.3 mg/l BAP + 0.2 mg/l NAA
8. MS + 0.4 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA
9. MS + 0.4 mg/l BAP + 0.2 mg/l NAA
10. MS + 0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA
11. MS + 0.5 mg/l BAP + 0.2 mg/l NAA
12. MS + 0.01 mg/l BAP + 0.02 mg/l NAA
13. MS + 0.02 mg/l BAP + 0.03 mg/l NAA
14. MS + 0.03 mg/l BAP + 0.03 mg/l NAA
15. MS + 0.04 mg/l BAP + 0.03 mg/l NAA
16. MS + 0.05 mg/l BAP + 0.03 mg/l NAA

#### **5.2.4 Penentuan Media Untuk Pembentukan Pucuk Dengan Pelbagai Kombinasi Auksin dan Sitokinin Berdasarkan Kajian Terdahulu Terhadap Famili Compositae**

Terdapat 13 perlakuan dengan pelbagai kombinasi auksin dan sitokinin berdasarkan kajian terdahulu terhadap famili Compositae. Kombinasi hormon yang digunakan adalah seperti berikut :

1. MS tanpa hormon
2. MS + 0.125 mg/l BAP + 0.125 mg/l IBA
3. MS + 0.025 mg/l Kinetin + 0.25 mg/l NAA
4. MS + 0.15 mg/l Kinetin + 0.25 mg/l NAA

5. MS + 0.50 mg/l Kinetin + 1.0 mg/l IAA
6. MS + 0.50 mg/l Kinetin + 0.05 mg/l IAA
7. MS + 1.0 mg/l Kinetin + 0.125 mg/l IAA
8. MS + 1.0 mg/l Kinetin + 0.25 mg/l IAA
9. MS + 0.50 mg/l Kinetin + 0.50 mg/l IBA
10. MS + 1.25 mg/l Kinetin + 0.50 mg/l 2,4-D
11. MS + 0.0075 mg/l TDZ + 0.125 mg/l NAA
12. MS + 0.005 mg/l TDZ + 0.25 mg/l NAA
13. MS + 0.125 mg/l TDZ + 0.125 mg/l IAA

### **5.2.5 Penentuan Kepekatan Sitokinin Yang Terbaik Untuk Pembentukan Pucuk**

Terdapat 16 kombinasi hormon BAP dan Zeatin yang berbeza telah digunakan. Julat kepekatan sitokinin yang terbaik diperolehi dari bahagian 5.2.3 dan 5.2.4. Senarai kombinasi hormon yang digunakan adalah seperti berikut :

1. MS tanpa hormon
2. MS + 0.5 mg/l Zeatin
3. MS + 1.0 mg/l Zeatin
4. MS + 1.5 mg/l Zeatin
5. MS + 2.0 mg/l Zeatin
6. MS + 2.5 mg/l Zeatin
7. MS + 3.0 mg/l Zeatin
8. MS + 0.001 mg/l BAP

9. MS + 0.01 mg/l BAP
10. MS + 0.05 mg/l BAP
11. MS + 0.1 mg/l BAP
12. MS + 0.2 mg/l BAP
13. MS + 0.5 mg/l BAP
14. MS + 1.0 mg/l BAP
15. MS + 2.0 mg/l BAP
16. MS + 3.0 mg/l BAP

## **5.3 KEPUTUSAN**

### **5.3.1 Penentuan Julat Kombinasi Hormon BAP dan NAA yang Sesuai Untuk Pembentukan Kalus, Pucuk dan Akar**

Sebanyak 21 kombinasi hormon BAP dan NAA telah digunakan seperti pada jadual 5.1. Dari pemerhatian yang dilakukan, didapati kesemua eksplan iaitu daun dan batang tidak berupaya membentuk pucuk. Kesemua eksplan membentuk kalus yang rapuh bewarna putih kekuningan pada semua perlakuan. Kalus mula terbentuk pada hari ke 7-14 dan mula terbentuk pada permukaan eksplan yang terpotong.

Akar terbentuk pada kepekatan 1.0mg/l BAP yang ditambah dengan 1.0mg/l NAA hingga 2.0mg/l BAP yang ditambah dengan 2.0mg/l NAA. Akar mula terbentuk pada minggu pertama dan kesemua akar yang terbentuk adalah abnormal. Pada kepekatan 2.0mg/l BAP yang ditambah dengan 3.0mg/l NAA hingga 5.0mg/l BAP yang ditambah dengan 5.0mg/l NAA tiada pembentukan akar yang berlaku. Kesemua eksplan hanya menghasilkan kalus sahaja. Kalus yang terhasil masih tidak berpotensi untuk membentuk pucuk atau morfogenesis walaupun dibiarkan selama 8 minggu. Kalus didapati bertukar warna perang dan akhirnya mati selepas 8 minggu.

Dengan ini berdasarkan keputusan yang didapati, julat kombinasi BAP (1.0-5.0mg/l) dan NAA (1.0-5.0mg/l) seperti dalam jadual 5.1 didapati tidak berupaya untuk membentuk pucuk dan akar yang normal tanpa melalui fasa kalus.

### **5.3.2 Penentuan Kepekatan BAP dan NAA yang Sesuai Untuk Inisiasi Pucuk**

Untuk pembentukan pucuk pula sebanyak 16 perlakuan telah digunakan seperti pada jadual 5.2. Eksplan yang digunakan adalah hipokotil yang berusia 5 hari, daun dan batang. Keputusan yang didapati menunjukkan hanya eksplan hipokotil yang berpotensi untuk membentuk pucuk dimana kesemuanya menghasilkan purata bilangan pucuk  $1.0 \pm 0.0$ . Kalus terbentuk selepas 3 minggu dan pucuk yang terbentuk akan menjadi abnormal.

Secara keseluruhannya didapati eksplan daun dan batang tidak berpotensi untuk membentuk pucuk. Akar terbentuk dengan cepat pada eksplan daun berbanding dengan eksplan batang dan hipokotil selepas 1 minggu dikultur. Ini diikuti dengan pembentukan kalus putih kekuningan hingga keperangan pada minggu kedua dan ketiga. Peratus penghasilan kalus didapati semakin menurun terutamanya pada eksplan daun dan diikuti eksplan batang pada kombinasi BAP dan NAA yang lebih rendah. Akar-akar yang terhasil masih lagi di dalam keadaan yang abnormal.

Kalus yang terbentuk didapati tidak menunjukkan sebarang tanda-tanda untuk membentuk pucuk atau proses morfogenesis. Kalus didapati bertukar warna menjadi hitam keperangan dan mati pada minggu kelapan selepas disubkultur.

### **5.3.3 Penentuan Pelbagai Kombinasi Auksin dan Sitokinin Untuk Inisiasi Pucuk**

Berdasarkan keputusan yang didapati (Jadual 5.3) kombinasi hormon 0.50mg/l Kinetin dan 0.05mg/l IAA (Plat 5.1) serta 0.125mg/l TDZ dan 0.125mg/l IAA (Plat 5.2) adalah yang terbaik untuk menghasilkan pucuk berganda daripada eksplan hipokotil berbanding dengan perlakuan-perlakuan lain. Purata bilangan pucuk yang didapati adalah  $3.4 \pm 0.32$  dan  $3.0 \pm 0.25$ . Pembentukan kalus masih lagi berlaku selepas minggu keempat pembentukan pucuk. Pada media MS tanpa hormon kesemua eksplan didapati mampu menghasilkan akar pada hari ketiga selepas dikultur tanpa pembentukan kalus.

Eksplan kotiledon dan batang didapati tidak berupaya untuk menghasilkan pucuk. Kebanyakan akar abnormal terbentuk pada minggu pertama. Ini diikuti dengan pembentukan kalus putih kekuningan yang rapuh pada minggu kedua dan ketiga. Kalus yang terbentuk masih tidak menunjukkan respons untuk proses morfogenesis atau organogenesis selepas 8 minggu dikultur. Kesemua kalus didapati mati dan bertukar warna menjadi keperangan selepas 8 minggu.

Pucuk yang terhasil daripada kombinasi hormon 0.50mg/l Kinetin dan 0.05mg/l IAA (Plat 5.1) serta 0.125mg/l TDZ dan 0.125mg/l IAA didapati berakar selepas 3 hari dipindahkan ke dalam media MS tanpa hormon. Ini diikuti dengan pemanjangan dan tumbesaran pucuk.

### **5.3.4 Penentuan Kepekatan Sitokinin yang Terbaik Untuk Inisiasi Pucuk**

Sebanyak 16 perlakuan yang telah digunakan seperti pada jadual 5.4 dan plat 5.3-5.4. Media MS tanpa hormon didapati hanya mampu menghasilkan akar yang normal tanpa penggandaan pucuk. Kesemua perlakuan 0.50 – 3.0mg/l Zeatin, didapati mampu menghasilkan pucuk daripada eksplan hipokotil. Kepekatan Zeatin pada 1.0mg/l didapati adalah yang terbaik untuk menginduksi pucuk yang terbanyak iaitu dengan purata bilangan pucuk  $4.3 \pm 1.46$ . Julat bilangan pucuk pula adalah di antara 2 hingga 24. Purata bilangan pucuk didapati semakin berkurangan apabila kepekatan Zeatin meningkat dari 2.0mg/l kepada 3.0mg/l. Pucuk berganda mula kelihatan pada minggu kedua. Ini diikuti dengan pembentukan kalus pada minggu keempat selepas pembentukan pucuk. Tiada sebarang pembentukan akar didapati pada semua perlakuan dengan Zeatin.

Kesemua rawatan BAP dengan kepekatan 0.01mg/l hingga 3.0 mg/l didapati hanya berupaya menghasilkan purata bilangan pucuk  $1.0 \pm 0.0$ . Hanya kepekatan BAP pada 1.0mg/l yang boleh menghasilkan purata bilangan pucuk yang terbanyak iaitu  $4.0 \pm 2.31$  dengan julat bilangan pucuk di antara 1 hingga 5. Kesemua pucuk mula kelihatan pada minggu kedua dan didapati akan menjadi abnormal apabila pembentukan kalus berlaku pada minggu keempat selepas dikultur. Kesemua pucuk yang berhasil akan dipindah ke media MS tanpa hormon untuk pembentukan akar (Plat 5.5). Pembentukan akar berlaku selepas 3 hari dikultur dan ini diikuti dengan proses pemanjangan dan tumbesaran pucuk tanpa sebarang pembentukan kalus.

Jadual 5.1 : Respons yang ditunjukkan oleh eksplan daun dan batang *Z. elegans* Jacq. terhadap kombinasi hormon BAP dan NAA yang telah dikultur di bawah 16 jam cahaya dan 8 jam gelap dengan suhu  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  untuk mendapatkan julat yang sesuai bagi pembentukan kalus, pucuk dan akar. Media asas ialah MS (1962).

PERLAKUAN		EKSPPLAN	KALUS (%)	AKAR (%)	PUCUK (%)	PEMERHATIAN
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)					
1.0	1.0	Daun	100	100	-	Akar abnormal diikuti dengan pembentukan kalus kekuningan
		Batang	100	100	-	
	2.0	Daun	100	100	-	Akar abnormal diikuti dengan pembentukan kalus kekuningan
		Batang	100	100	-	
	3.0	Daun	100	80	-	Akar abnormal diikuti dengan pembentukan kalus kekuningan
4.0		Batang	100	100	-	
	4.0	Daun	100	90	-	Akar abnormal diikuti dengan pembentukan kalus kekuningan
		Batang	100	100	-	
	5.0	Daun	100	100	-	Akar abnormal diikuti dengan pembentukan kalus kekuningan
		Batang	100	20	-	
2.0	1.0	Daun	100	100	-	Akar abnormal diikuti dengan pembentukan kalus kekuningan
		Batang	100	10	-	
	2.0	Daun	100	10	-	Akar abnormal diikuti dengan pembentukan kalus kekuningan
		Batang	100	10	-	
	3.0	Daun	100	0	-	Pembentukan kalus kekuningan tanpa pembentukan akar
3.0		Batang	100	0	-	
	4.0	Daun	100	0	-	Pembentukan kalus kekuningan tanpa pembentukan akar
		Batang	100	0	-	
	5.0	Daun	100	0	-	Pembentukan kalus kekuningan tanpa pembentukan akar
		Batang	100	0	-	
4.0	1.0	Daun	100	0	-	Kalus kekuningan dan rapuh menjadi perang dan mati selepas 5 minggu
		Batang	100	0	-	
	2.0	Daun	100	0	-	Kalus kekuningan dan rapuh menjadi perang dan mati selepas 5 minggu
		Batang	100	0	-	
	3.0	Daun	100	0	-	Kalus kekuningan dan rapuh menjadi perang dan mati selepas 5 minggu
5.0		Batang	100	0	-	
	4.0	Daun	100	0	-	Kalus kekuningan dan rapuh menjadi perang dan mati selepas 5 minggu
		Batang	100	0	-	
	5.0	Daun	100	0	-	Kalus kekuningan dan rapuh menjadi perang dan mati selepas 5 minggu
		Batang	100	0	-	
5.0	1.0	Daun	100	0	-	Kalus kekuningan dan rapuh menjadi perang dan mati selepas 5 minggu
		Batang	100	0	-	
	2.0	Daun	100	0	-	Kalus kekuningan dan rapuh menjadi perang dan mati selepas 5 minggu
		Batang	100	0	-	
	3.0	Daun	100	0	-	Kalus kekuningan dan rapuh menjadi perang dan mati selepas 5 minggu
4.0		Batang	100	0	-	
	4.0	Daun	100	0	-	Kalus kekuningan dan rapuh menjadi perang dan mati selepas 5 minggu
		Batang	100	0	-	
	5.0	Daun	100	0	-	Kalus kekuningan dan rapuh menjadi perang dan mati selepas 5 minggu
		Batang	100	0	-	

Jadual 5.2 : Respons yang ditunjukkan oleh eksplan hipokotil, daun dan batang *Z. elegans* Jacq. terhadap kombinasi hormon BAP dan NAA yang telah dikultur di bawah 16 jam cahaya dan 8 jam gelap dengan suhu  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  untuk inisiasi pucuk. Media asas ialah MS (1962).

PERLAKUAN		EKSPPLAN	KALUS (%)	AKAR (%)	PURATA BIL. PUCUK	PEMERHATIAN	
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)						
0.1	0.1	Hipokotil	100	100	1.0±0.0	Pembentukan akar abnormal diikuti dengan pembentukan kalus kekuningan	
		Daun	100	50			
		Batang	50	100			
	0.2	Hipokotil	100	100	1.0±0.0		
		Daun	100	75			
		Batang	100	50			
	0.5	Hipokotil	100	100	1.0±0.0		
		Daun	100	82			
		Batang	100	20			
0.2	0.1	Hipokotil	20	50	1.0±0.0	Pembentukan akar abnormal diikuti dengan pembentukan kalus keperangan	
		Daun	0	53			
		Batang	94	78			
	0.2	Hipokotil	67	17	1.0±0.0		
		Daun	50	93			
		Batang	100	57			
0.3	0.1	Hipokotil	100	71	1.0±0.0	Pembentukan akar abnormal diikuti dengan pembentukan kalus keperangan	
		Daun	12	75			
	0.2	Hipokotil	100	50	1.0±0.0		
		Daun	53	95			
		Batang	89	78			
0.4	0.1	Hipokotil	100	50	1.0±0.0	Pembentukan akar abnormal diikuti dengan pembentukan kalus keperangan	
		Daun	50	94			
	0.2	Batang	100	83	1.0±0.0		
		Hipokotil	100	50			
		Daun	50	100			
		Batang	100	37			
0.5	0.1	Hipokotil	100	60	1.0±0.0	Pembentukan akar abnormal diikuti dengan pembentukan kalus keperangan	
		Daun	83	89			
	0.2	Batang	95	55	1.0±0.0		
		Hipokotil	100	60			
		Daun	83	89			
		Batang	100	58			
0.01	0.02	Hipokotil	90	90	1.0±0.0	Pembentukan akar abnormal diikuti dengan pembentukan kalus kekuningan	
		Daun	22	100			
		Batang	100	63			
0.02	0.03	Hipokotil	90	100	1.0±0.0	Pembentukan akar abnormal diikuti dengan pembentukan kalus kekuningan	
		Daun	82	100			
		Batang	100	75			
0.03	0.03	Hipokotil	100	100	1.0±0.0	Pembentukan akar abnormal diikuti dengan pembentukan kalus keperangan	
		Daun	88	100			
		Batang	100	63			
0.04	0.03	Hipokotil	100	100	1.0±0.0	Pembentukan akar abnormal diikuti dengan pembentukan kalus keperangan	
		Daun	88	100			
		Batang	100	63			
0.05	0.03	Hipokotil	100	100	1.0±0.0	Pembentukan akar abnormal diikuti dengan pembentukan kalus keperangan	
		Daun	50	63			
		Batang	100	100			

Jadual 5.3 : Respons yang ditunjukkan oleh eksplan hipokotil, daun dan batang *Zinnia elegans* Jacq. terhadap pelbagai kombinasi hormon auksin dan sitokinin yang telah dikultur di bawah 16 jam cahaya dan 8 jam gelap dengan suhu  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  untuk inisiasi pucuk. Media asas ialah MS (1962).

PERLAKUAN (mg/l)		EKSPLAN	KALUS (%)	AKAR (%)	PURATA BIL. PUCUK	PEMERHATIAN	
KIN 0.025	NAA 0.25	Hipokotil	100	-	$1.0 \pm 0.0$	Pembentukan akar dan pucuk abnormal diikuti pembentukan kalus kekuningan yang rapuh	
		Kotiledon	90	50	-		
		Batang	100	30	-		
KIN 0.15	NAA 0.25	Hipokotil	100	-	$1.0 \pm 0.0$	Pembentukan akar dan pucuk abnormal diikuti pembentukan kalus kekuningan yang rapuh	
		Kotiledon	100	70	-		
		Batang	100	40	-		
KIN 0.50	IAA 1.0	Hipokotil	-	100	$1.0 \pm 0.0$	Pembentukan akar abnormal diikuti dengan pembentukan kalus kekuningan yang rapuh	
		Kotiledon	83	33	-		
		Batang	100	80	-		
KIN 0.50	IAA 0.05	Hipokotil	25	50	$3.4 \pm 0.32$	Pucuk terbentuk selepas 2 minggu. Kalus rapuh dan putih kekuningan. Akar abnormal	
		Kotiledon	-	90	-		
		Batang	100	80	-		
KIN 1.0	IAA 0.125	Hipokotil	100	25	$1.0 \pm 0.0$	Pembentukan akar dan pucuk abnormal diikuti pembentukan kalus kekuningan yang rapuh	
		Kotiledon	-	80	-		
		Batang	100	100	-		
KIN 1.0	IAA 0.25	Hipokotil	100	-	$1.0 \pm 0.0$	Pembentukan pucuk abnormal diikuti pembentukan kalus kekuningan yang rapuh	
		Kotiledon	50	-	-		
		Batang	100	-	-		
KIN 0.50	IBA 0.50	Hipokotil	100	-	$1.0 \pm 0.0$	Pembentukan pucuk abnormal diikuti pembentukan kalus kekuningan yang rapuh	
		Kotiledon	100	-	-		
		Batang	100	-	-		
KIN 1.25	2,4-D 0.50	Hipokotil	100	-	-	Kalus putih kekuningan terbentuk selepas 3 minggu tanpa pembentukan akar	
		Kotiledon	100	-	-		
		Batang	100	-	-		
TDZ 0.007	NAA 0.125	Hipokotil	100	-	$1.0 \pm 0.0$	Pembentukan pucuk abnormal diikuti pembentukan kalus kekuningan yang rapuh	
		Kotiledon	100	-	-		
		Batang	100	-	-		
TDZ 0.005	NAA 0.25	Hipokotil	100	-	$1.0 \pm 0.0$	Pembentukan pucuk abnormal diikuti pembentukan kalus kekuningan yang rapuh	
		Kotiledon	-	-	-		
		Batang	-	-	-		
TDZ 0.125	IAA 0.125	Hipokotil	100	100	$3.0 \pm 0.25$	Kalus rapuh putih kekuningan serta akar terbentuk selepas 2 minggu pembentukan pucuk	
		Kotiledon	-	60	-		
		Batang	100	40	-		
BAP 0.125	IBA 0.125	Hipokotil	100	-	$1.0 \pm 0.0$	Pembentukan akar dan pucuk abnormal diikuti pembentukan kalus kekuningan yang rapuh	
		Kotiledon	-	100	-		
		Batang	100	10	-		
MSO		Hipokotil	-	100	$1.0 \pm 0.0$	Akar normal terbentuk pada hari ketiga diikuti dengan pemanjangan pucuk	
		Kotiledon	-	100	-		
		Batang	-	100	-		

Jadual 5.4 : Respons yang ditunjukkan oleh eksplan hipokotil *Zinnia elegans* Jacq. terhadap pelbagai kombinasi hormon sitokin yang telah dikultur di bawah 16 jam cahaya dan 8 jam gelap dengan suhu  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  untuk inisiasi pucuk. Media asas ialah MS (1962).

Perlakuan (mg/l)	Eksplan	Kalus (%)	Akar (%)	Purata Bil. Pucuk	Pemerhatian
MSO	Hipokotil	-	100	$1.0 \pm 0.0$	Akar terbentuk selepas 3 hari di ikuti dengan pemanjangan pucuk
Zeatin 0.50	Hipokotil	100	-	$1.6 \pm 0.25$	Kalus terbentuk selepas 4 minggu pembentukan pucuk.
Zeatin 1.0	Hipokotil	100	-	$4.3 \pm 1.46$	Kalus terbentuk selepas 4 minggu pembentukan pucuk.
Zeatin 1.5	Hipokotil	100	-	$4.0 \pm 1.43$	Kalus terbentuk selepas 4 minggu pembentukan pucuk.
Zeatin 2.0	Hipokotil	100	-	$1.0 \pm 0.0$	Kalus terbentuk selepas 4 minggu pembentukan pucuk.
Zeatin 2.5	Hipokotil	100	-	$1.5 \pm 0.25$	Kalus terbentuk selepas 4 minggu pembentukan pucuk.
Zeatin 3.0	Hipokotil	100	-	$1.8 \pm 0.32$	Kalus terbentuk selepas 4 minggu pembentukan pucuk.
BAP 0.001	Hipokotil	100	-	$1.0 \pm 0.0$	Kalus putih kekuningan dan rapuh terbentuk selepas 3 minggu
BAP 0.01	Hipokotil	100	-	$1.0 \pm 0.0$	Kalus putih kekuningan dan rapuh terbentuk selepas 3 minggu
BAP 0.05	Hipokotil	100	-	$1.0 \pm 0.0$	Kalus putih kekuningan dan rapuh terbentuk selepas 3 minggu
BAP 0.1	Hipokotil	100	-	$1.0 \pm 0.0$	Kalus putih kekuningan dan rapuh terbentuk selepas 3 minggu
BAP 0.2	Hipokotil	100	-	$1.0 \pm 0.0$	Kalus putih kekuningan dan rapuh terbentuk selepas 3 minggu
BAP 0.5	Hipokotil	100	-	$1.0 \pm 0.0$	Kalus putih kekuningan dan rapuh terbentuk selepas 3 minggu
BAP 1.0	Hipokotil	100	-	$4.0 \pm 2.31$	Kalus terbentuk selepas 4 minggu pembentukan pucuk.
BAP 2.0	Hipokotil	100	-	$1.0 \pm 0.0$	Kalus putih kekuningan dan rapuh terbentuk selepas 3 minggu
BAP 3.0	Hipokotil	100	-	$1.0 \pm 0.0$	Kalus putih kekuningan dan rapuh terbentuk selepas 3 minggu



(a)  $0.025\text{mg/l KIN} + 0.25\text{mg/l NAA}$



(b)  $0.15\text{mg/l KIN} + 0.25\text{mg/l NAA}$



(c)  $0.50\text{mg/l KIN} + 1.0\text{mg/l IAA}$



(d)  $0.50\text{mg/l KIN} + 0.05\text{mg/l IAA}$

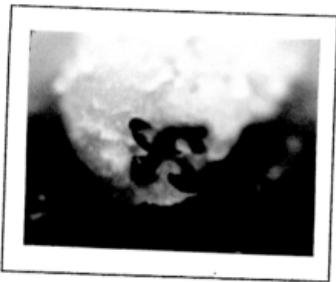


(e)  $1.0\text{mg/l KIN} + 0.125\text{mg/l IAA}$



(f)  $1.0\text{mg/l KIN} + 0.25\text{mg/l IAA}$   
( $\sqrt{0.5\text{cm}}$ , 10x)

Plat 5.1 : Respons yang dapat ditunjukkan oleh eksplan hipokotil *Zinnia elegans* Jacq. selepas 4 minggu pengkulturan pada media MS dengan pelbagai kombinasi hormon auksin dan sitokinin yang telah dikultur di bawah 16 jam cahaya dan 8 jam gelap dengan suhu  $25+1^\circ\text{C}$  untuk inisiasi pucuk.



(a)  $0.50\text{mg/l KIN} + 0.50\text{mg/l IBA}$



(b)  $1.25\text{mg/l KIN} + 0.50\text{mg/l 2,4-D}$



(c)  $0.007\text{mg/l TDZ} + 0.125\text{mg/l NAA}$



(d)  $0.005\text{mg/l TDZ} + 0.25\text{mg/l NAA}$



(e)  $0.125\text{mg/l TDZ} + 0.125\text{mg/l IAA}$



(f)  $0.125\text{mg/l BAP} + 0.125\text{mg/l IBA}$

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

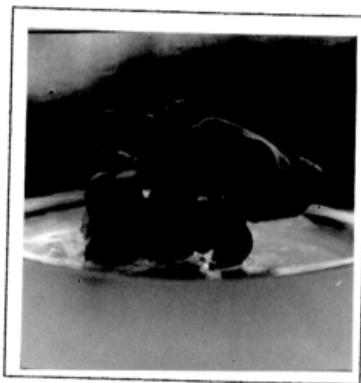
Plat 5.2 : Respons yang dapat ditunjukkan oleh eksplan hipokotil *Zinnia elegans* Jacq. selepas 4 minggu pengkulturan pada media MS dengan pelbagai kombinasi hormon auksin dan sitokinin yang telah dikultur di bawah 16 jam cahaya dan 8 jam gelap dengan suhu  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  untuk inisiasi pucuk.



(a) MSO (Tanpa Hormon)



(b) MS + 0.5mg/l Zeatin



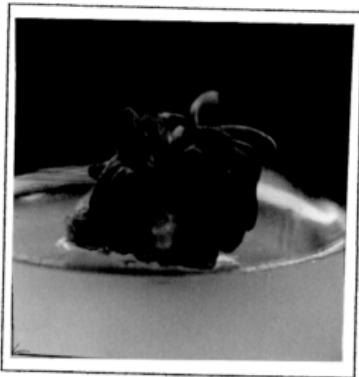
(c) MS + 1.0mg/l Zeatin



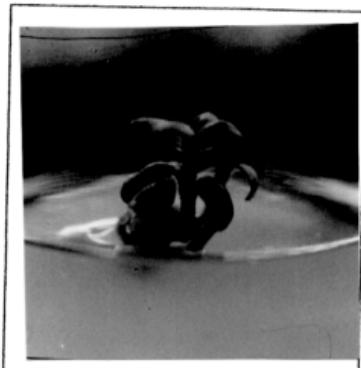
(d) MS + 1.0mg/l BAP

( 0.5cm , 10x)

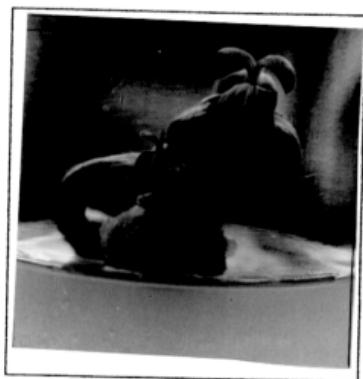
Plat 5.3 : Respons yang dapat ditunjukkan oleh eksplan hipokotil *Zinnia elegans* Jacq. selepas 4 minggu pengkulturan pada media MS dengan pelbagai kombinasi hormon sitokinin yang telah dikultur di bawah 16 jam cahaya dan 8 jam gelap dengan suhu  $25\pm1^{\circ}\text{C}$  untuk inisiasi pucuk.



(a) MS + 1.5mg/l Zeatin



(b) MS + 2.0mg/l Zeatin



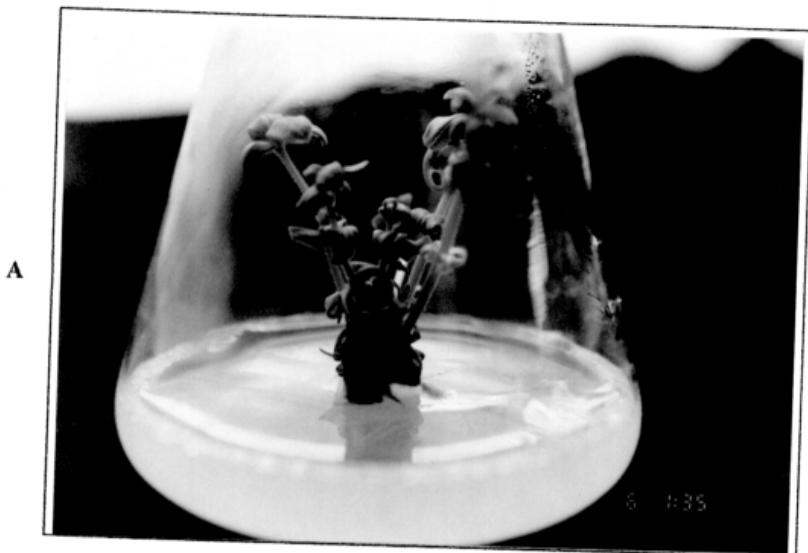
(c) MS + 2.5mg/l Zeatin



(d) MS + 3.0mg/l Zeatin

( 0.5cm , 10x)

Plat 5.4 : Respons yang dapat ditunjukkan oleh eksplan hipokotil *Zinnia elegans* Jacq. selepas 4 minggu pengkulturan pada media MS dengan pelbagai kombinasi hormon sitokinin yang telah dikultur di bawah 16 jam cahaya dan 8 jam gelap dengan suhu  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  untuk inisiasi pucuk.



Plat 5.5 : ( 0.5cm , 10x)

- Plantlet lengkap *Z. elegans* Jacq. berumur 7 minggu yang telah dikultur pada suhu  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  di bawah 16 jam cahaya dan 8 jam gelap di dalam media MS tanpa hormon untuk pembentukan akar dan tumbesaran seterusnya sebelum dipindah ke tanah.
- Tumbuhan lengkap *Zinnia elegans* Jacq. yang telah berbunga di dalam pasu selepas 12 minggu dipindahkan ke tanah.

## **5.4 RINGKASAN KEPUTUSAN**

1. Eksplan daun, batang dan kotiledon tidak berpotensi untuk membentuk pucuk. Hanya eksplan hipokotil yang berusia 5 hari didapati adalah eksplan yang terbaik untuk menghasilkan pucuk berganda.
2. Eksplan daun didapati menghasilkan akar yang tercepat berbanding dengan eksplan lain.
3. Medium MS yang telah ditambah dengan 1.0mg/l Zeatin didapati adalah media yang terbaik dan berjaya menginduksi pucuk yang terbanyak iaitu  $4.3 \pm 1.46$ . Hanya kepekatan 0.5mg/l hingga 1.5mg/l Zeatin yang berpotensi untuk menginduksikan pucuk berganda dengan julat bilangan pucuk di antara 2 hingga 24.
4. Medium MS tanpa hormon didapati adalah media yang terbaik dan tercepat untuk pembentukan akar serta untuk pemanjangan dan tumbesaran pucuk.
5. Kesemua kalus yang terbentuk pada semua perlakuan yang diberikan didapati tidak berpotensi untuk morfogenesis atau organogenesis.
6. Berdasarkan kajian terdahulu ke atas Compositae didapati tumbuhan yang berlainan spesies memerlukan kombinasi auksin dan sitokinin yang berbeza. Hanya kombinasi hormon 0.50mg/l Kinetin dengan 0.05mg/l IAA (Plat 5.1) serta 0.125mg/l TDZ dengan 0.125mg/l IAA (Plat 5.2) sahaja yang terbaik untuk menghasilkan pucuk berganda daripada eksplan hipokotil berbanding dengan perlakuan-perlakuan lain. Purata bilangan pucuk yang didapati adalah  $3.4 \pm 0.32$  dan  $3.0 \pm 0.25$  dengan julat bilangan pucuk di antara 1 hingga 5.

7. Didapati hormon Zeatin berpotensi menginduksikan pucuk lebih baik berbanding dengan hormon sitokinin yang lain seperti BAP, Kinetin dan TDZ kerana penghasilan pucuk yang lebih banyak, lebih subur dan lebih cepat.
8. Hormon auksin seperti NAA, IAA, IBA dan 2,4-D tidak diperlukan sama sekali untuk inisiasi akar kerana didapati hormon auksin endogenous yang sudah mencukupi bagi semua eksplan yang dikultur.

Regenerasi lengkap tumbuhan ros telah banyak dilaporkan berjaya pada media MS (Murashige dan Skoog, 1962) yang ditambahkan dengan 30 - 50g/l sukrosa, 6 - 8g/l agar, 0.5 - 6.3mg/l BAP dan samada 0.004 - 0.3mg/l NAA atau 0.05 - 2.0mg/l IAA (Skirvin dan Chu, 1979; Hasegawa, 1979, 1980; Bressan *et al.*, 1980, 1982; Davies, 1980; Hyndman *et al.*, 1982; Khosh-Khui dan Sink, 1982). Anak-anak pokok yang didapati melalui kaedah *in vitro* yang menggunakan eksplan meristem pucuk, kesemuanya menunjukkan keseragaman dari segi pertumbuhan apabila dipindah ke tanah (Lloyd *et al.*, 1988).

Kebanyakan regenerasi lengkap tumbuhan ros didapati samada melalui fasa kalus atau melalui eksplan batang (Yalles dan Boxus, 1987; Lloyd *et al.*, 1988; Rout *et al.*, 1991; Matthews *et al.*, 1991), eksplan daun (Lloyd *et al.*, 1988; Leffering dan Kok, 1990; De wit *et al.*, 1990; Matthews *et al.*, 1991), eksplan akar (Lloyd *et al.*, 1988; Matthews *et al.*, 1991), embrio zigotik (Burger *et al.*, 1990) dan eksplan filamen anter (Noriega dan Sondahl, 1991).

### **Perkembangan Kultur Tisu Masa Kini**

Perkembangan bioteknologi tumbuhan tidak dapat dipisahkan dengan biologi molekul, kultur tisu, sel dan protoplas kerana semua di atas merupakan perkara asas kepada perkembangan bioteknologi tumbuhan di mana membawa kepada pembaikbakaan sesuatu tanaman yang selamat dan bebas dari penggunaan bahan kimia seperti racun perosak yang boleh mencemarkan alam sekitar.