

## **Penginduksian, proliferasi kalus dan regenerasi daripada bahagian apek meristem tanaman halia bara**

(Induction, proliferation of callus and regeneration of *halia bara* from meristem apek)

Zuraida Ab Rahman, Ayu Nazreena Othman, Hartinee Abbas dan Nur Najwa Arifah Basiron

### **Pengenalan**

Halia bara atau nama saintifiknya *Zingiber officinale* Rosc var. *Rubrum* merupakan tanaman yang tumbuh di Malaysia. Halia bara juga dikenali sebagai *ginger* (bahasa Inggeris), jahe, aliah, jae, lia (Indonesia) dan *kinkh* atau *khing-daen* (Thailand). Ia mempunyai bunga yang terang pada braktea merah di bahagian atas pokok. Kelopak halia bara kelihatan seperti bunga, tetapi bunga yang sebenar ialah bunga putih kecil di atas permukaan braktea. Tumbuhan ini mempunyai kultivar yang dikenali sebagai *Jungle King* dan *Jungle Queen*. Jenis halia ini turut boleh didapati di Hawaii, Trinidad, Grenada, St. Lucia, Dominica, St. Vincent, Martinique, Guadeloupe, Puerto Rico dan di kebanyakan negara Amerika Tengah, termasuk Belize. Di Samoa, bunga halia bara dijadikan sebagai bunga kebangsaan yang dipanggil “teuila”. Halia bara juga boleh tumbuh di Florida Selatan iaitu di kawasan bersuhu tidak melebihi takat beku. Tumbuhan ini banyak tumbuh di kawasan yang redup, lembap dan panas.

Halia bara merupakan tumbuhan herba monokotiledon yang berasal daripada famili Zingiberaceae dengan 52 genus dan 1,300 spesies. Ia mempunyai bentuk yang sama dengan pokok halia biasa (*Zingiber officinale*) dan boleh mencapai ketinggian 15 – 30 cm. Namun rizom halia bara lebih kecil berbanding dengan halia biasa serta daunnya yang lebih runcing. Rizom bagi halia bara berwarna merah tua dengan bau yang lebih kuat daripada halia biasa. Halia bara juga merupakan tumbuhan tropika yang penting di mana bahagian rizomnya amat bernilai sebagai rempah-ratus masakan dan bahan herba dalam perubatan tradisional. Umum mengetahui bahawa halia biasanya membiak secara vegetatif melalui rizom, tetapi dengan kadar pertumbuhan yang rendah iaitu hanya mampu mengeluarkan 10 – 15 tunas dalam satu kilo rizom yang disemai. Halia bara sukar untuk tumbuh secara semula jadi disebabkan oleh serangan patogen dan kadar pertumbuhan yang rendah. Namun demikian, tumbuhan ini masih mempunyai permintaan yang tinggi di pasaran. Tumbuhan ini juga mudah terkena serangan patogen bawaan tanah seperti *Pythium aphanidermatum* dan *P. vexans* (pereputan rizom), *Ralstonia solanacearum* (bakteria yang menyebabkan tumbuhan layu) dan nematod *Meloidogyne incognita*. Keadaan ini menyebabkan hasil tanaman berkurangan.

Bagi mengatasi masalah ini, teknik pembiakan secara kultur tisu boleh diguna pakai dan dikembangkan untuk tujuan penanaman halia bara secara besar-besaran. Teknik ini digunakan untuk menghasilkan propagasi tanaman yang banyak dalam masa yang singkat. Propagasi melalui kaedah kultur tisu terbahagi kepada dua jenis iaitu regenerasi secara terus dan melalui proses embriogenesis somatik. Dalam kajian ini, kaedah embriogenesis somatik dipilih bagi mendapatkan hasil yang tinggi dan sebagai rujukan masa hadapan. Kajian penginduksian kalus dan regenerasi pokok halia bara dijalankan bertujuan untuk meningkatkan pengeluaran tanaman tersebut. Di samping itu, ia juga bertujuan mengelakkan serangan penyakit yang mudah berlaku sekiranya ditanam menggunakan kaedah konvensional. Oleh itu, untuk kajian bagi menentukan kepekatan dan jenis hormon pertumbuhan yang sesuai untuk pembentukan embrio somatik, percambahan pucuk dan penghasilan plantlet (anak pokok) halia bara telah dilaksanakan. Kejayaan dalam pengkulturan kalus dan regenerasi pokok dengan mengkultur hujung batang, pucuk dan pengkrioawetan bagi germplasma telah banyak dilaporkan. Begitu juga dengan penerbitan berkaitan kultur tisu bagi halia. Namun, protokol asas eksperimen masih terhad dan sangat kurang.

#### **Faktor-faktor mempengaruhi proses embriogenesis somatik**

Embriogenesis merupakan proses pembentukan sel somatik kepada suatu tumbuhan lengkap dengan rangsangan tertentu melalui beberapa siri perubahan secara morfologi dan biokimia yang mengaruh pembentukan embrio somatik. Embrio somatik kebanyakannya dihasilkan secara *in vitro* dan untuk kajian di makmal yang menggunakan medium bernutrien sama ada pepejal atau cecair yang mengandungi hormon pertumbuhan (pengawal atur pertumbuhan tumbuhan) (PGR). PGR yang biasa digunakan ialah auksin dan sitokinin dalam jumlah yang kecil.

Proses embriogenesis somatik ialah satu kaedah mikropropagasi yang mempunyai potensi untuk pengeluaran komersial secara besar-besaran. Dalam proses embriogenesis somatik, sel soma berkembang melalui pembahagian sel untuk membentuk analog lengkap embrio untuk perkembangan embrio zygote. Struktur bipolar bagi embrio somatik mengandungi kedua-dua meristem pucuk dan akar. Apabila embrio berkembang, struktur sel akan berubah kepada peringkat-peringkat yang berbeza iaitu peringkat globular, hati, torpedo, kotiledon dan peringkat matang. Pucuk dan akar eksplan adalah monopolar manakala embrio somatik adalah bipolar yang membolehkan penghasilan pokok yang lengkap tanpa pengkulturan menggunakan pelbagai jenis medium. Proses embriogenesis somatik dapat dilihat dengan mata kasar yang mana pembentukan kultur dan sel boleh dikawal dan diubah suai mengikut eksperimen yang dijalankan. Proses embriogenesis somatik boleh menjadi sistem model bagi kajian ciri-ciri morfologikal, molekular dan biokimia yang berlaku semasa proses permulaan

dan perkembangan embriogenesis dalam tumbuhan. Keadaan ini membolehkan proses embriogenesis somatik berpotensi untuk diaplikasi dalam bidang bioteknologi.

### ***Pemilihan eksplan***

Pemilihan bahagian tumbuhan untuk dijadikan eksplan merupakan peringkat yang paling kritikal kerana langkah ini boleh mempengaruhi hasil kajian. Bahagian eksplan dipilih berdasarkan kepada sifat totipotensinya. Kebiasaannya, bahagian eksplan yang dipilih adalah bahagian-bahagian yang muda kerana mempunyai keupayaan membahagi dan responsif yang lebih tinggi berbanding dengan bahagian eksplan matang yang biasanya lebih tinggi tahap kontaminasinya. Dalam eksperimen ini, bahagian eksplan yang dipilih adalah daripada pucuk meristem apeks. Kajian terdahulu menyatakan bahawa eksplan bagi halia tidak boleh disimpan terlalu lama kerana mudah terkena serangan penyakit seperti kulat, seterusnya mempengaruhi kualiti rizom. Justeru, bagi mendapatkan pengeluaran hasil yang tinggi, adalah penting bagi mendapatkan rizom atau eksplan yang sihat dan bebas penyakit.

### ***Hormon pengawal atur pertumbuhan***

Penggunaan nisbah hormon auksin yang lebih rendah berbanding dengan hormon sitokinin akan meningkatkan pembentukan pucuk, manakala nisbah hormon auksin yang lebih tinggi berbanding dengan hormon sitokinin boleh memberi rangsangan kepada pembentukan akar. Sitokinin terlibat dalam proses pengawal atur pertumbuhan dan percambahan seperti percambahan, perbezaan dan kesenesan (*sensation*) daun apabila berinteraksi dengan fitohormon yang lain. Auksin membantu menggalakkan pemanjangan sel dalam proses pertumbuhan. Apabila kandungan auksin rendah, ia akan menggalakkan pertumbuhan akar. Sebaliknya kandungan auksin yang tinggi akan merencatkan pertumbuhan akar. Kedua-dua sitokinin dan auksin diperlukan dalam proses pembahagian sel.

### ***Medium pengkulturan***

Medium pengkulturan merupakan satu-satunya sumber yang membekalkan nutrien dan vitamin dalam pengkulturan secara *in vitro*. Oleh itu, pemilihan pengkulturan medium yang sesuai memberikan persekitaran yang optimum untuk pembesaran eksplan, seterusnya menjamin hasil pengeluaran yang sihat dan berkualiti. Kebanyakan kaedah propagasi yang melibatkan penggandaan sel secara cepat melalui pembentukan kalus menggunakan medium MS (Murashige dan Skoog). Medium MS telah dibuktikan dapat memberikan penggandaan yang paling banyak. Penghasilan kalus adalah dua kali ganda dalam masa dua minggu apabila dikulturkan di atas medium MS dengan hormon yang sesuai diberikan, namun ia masih bergantung kepada jenis tanaman yang dikultur. Medium MS adalah medium yang

sering digunakan dalam kajian kultur tisu dan terbukti dapat meningkatkan produktiviti dengan mengurangkan masa yang diambil untuk penggandaan pucuk.

### **Proliferasi kalus dan regenerasi**

#### ***Penyediaan medium pengkulturan***

Medium *premix* MS (Murashige dan Skoog) mengandungi vitamin, air suling, agar, L-arginin, L-aspariginin, L-glutamine dan sukrosa digunakan. Bagi penyediaan 1 L medium pepejal, *premix* MS (Murashige dan Skoog) yang digunakan adalah sebanyak 4.414 g dengan vitamin yang telah diubah suai serta tambahan lain seperti 0.1 g/L L-asparagin, 0.1 g/L L-arginin, 0.1 g/L L-glutamin dan 30 g sukrosa dicampurkan ke dalam 500 mL air suling. Kesemua campuran ini dilarutkan di atas pengacau bermagnet. Kemudian, 0.5 mg/L hormon pengawal atur tumbuhan 2,4-D (medium induksi kalus) dimasukkan ke dalam larutan. Air suling disukat dan ditambah sehingga setiap larutan mencecah 1 L. Bacaan pH bagi larutan diambil menggunakan meter pH bagi mendapatkan pH optimum iaitu pH 5.7 – 5.8. Pelarasan bagi pH larutan dilakukan dengan menggunakan sama ada larutan asid hidroklorik (HCl) atau natrium hidroksida (NaOH). Hormon lain yang digunakan untuk proliferasi kalus dan regenerasi adalah seperti 2,4-D, BAP dan NAA yang berkepekatan berbeza antara 0.5 – 3.0 mg/L yang dibekalkan secara tunggal atau kombinasi.

Pada peringkat seterusnya, agar dimasukkan ke dalam setiap larutan. Sebanyak 3 g/L agar (*phytoge*) digunakan. Semua bahan perlu dilarutkan terlebih dahulu sebelum dimasukkan ke dalam gelombang mikro selama 15 minit, kemudian dituang ke dalam kelalang kon kecil atau jem jar sebanyak 2.5 – 5 mL larutan medium. Bahagian mulut kelalang kon dibalut dengan kepingan aluminium atau ditutup dengan penutup. Medium yang telah siap dimasukkan ke dalam mesin autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 minit dan tekanan 1.5 Mpa untuk pensterilan, diikuti dengan penyimpanan selama beberapa hari pada suhu bilik sebelum digunakan untuk tujuan pengkulturan.

#### ***Pensterilan radas, bahan dan kebuk aliran laminar***

Semua radas dan bahan yang akan digunakan untuk proses pengkulturan perlu disterilkan terlebih dahulu sebelum digunakan. Radas seperti forsep, pisau, piring Petri, kelalang kon, silinder penyukat dan air suling perlu disterilkan di dalam mesin autoklaf sebelum digunakan. Radas-radas ini akan digunakan untuk kerja-kerja di dalam kebuk aliran laminar untuk proses pengkulturan. Pensterilan adalah penting bagi meminimumkan kontaminasi ke atas eksplan.

Semua proses pengkulturan dijalankan di dalam kebuk aliran laminar bagi mengelakkan kontaminasi ke atas eksplan. Sebelum kerja-kerja pengkulturan dijalankan, bahagian dinding dalam kebuk aliran laminar akan dibersihkan dengan 70% etanol. Radas yang akan digunakan akan disembur dengan sedikit etanol,

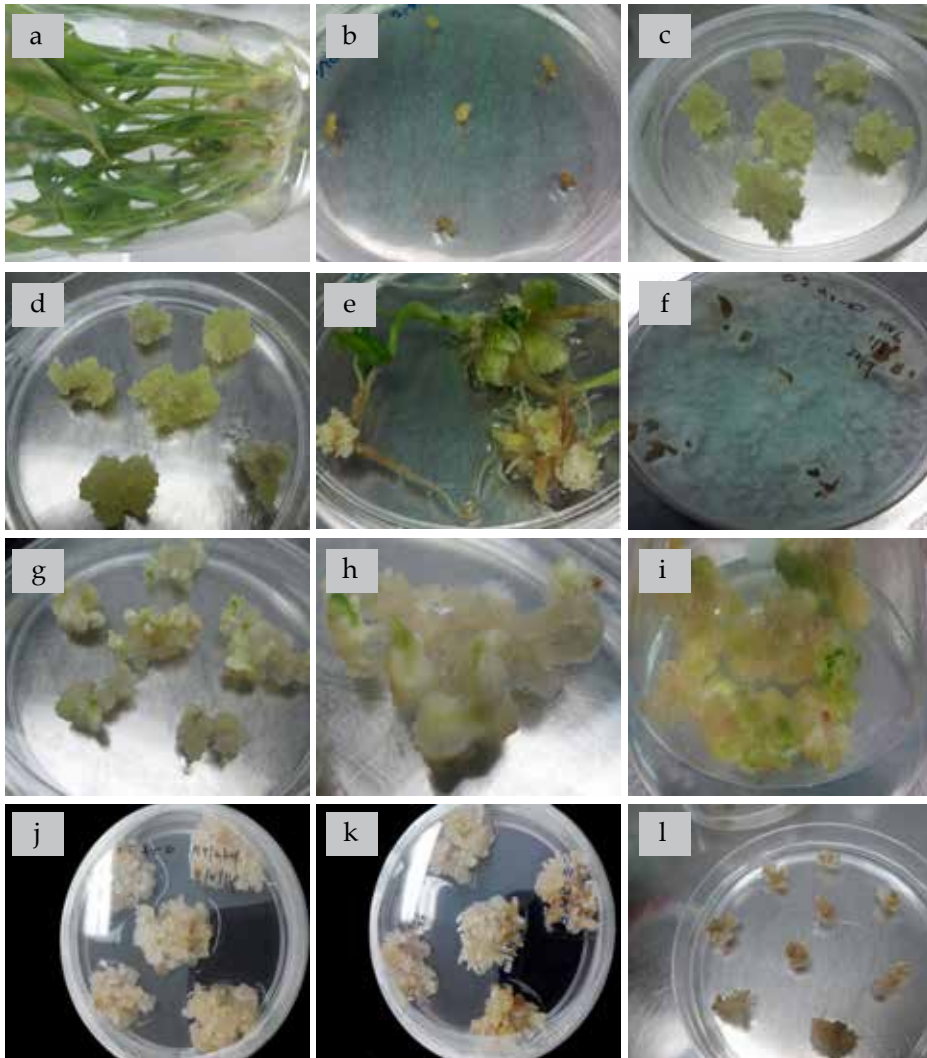
seterusnya radas tersebut dirapatkan dengan api penunu bunsen untuk tujuan pemanasan dan pensterilan radas tersebut. Selain itu, pemakaian sarung tangan getah adalah digalakkan, serta tangan perlu dilap terlebih dahulu dengan etanol setiap kali sebelum melakukan kerja.

### ***Penyediaan eksplan dan induksi kalus***

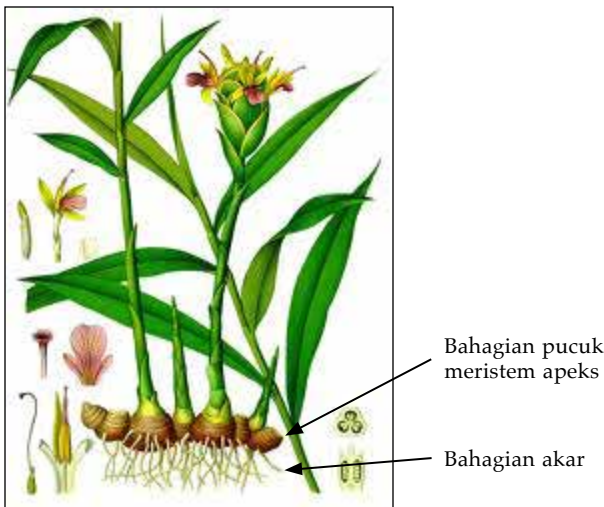
Induksi kalus adalah kaedah kultur tisu yang dilakukan dengan merangsang pembahagian sel secara berterusan pada bahagian tanaman tertentu seperti daun, akar, batang dan bahagian lain dengan menggunakan hormon pertumbuhan untuk membentuk jisim sel (kalus). Jisim sel akan tumbuh semula melalui proses embriogenesis untuk menjadi tanaman baharu. Induksi kalus merupakan peringkat permulaan dalam pelbagai peringkat proses kultur tisu, untuk pembentukan kultur sel terampai dan embriogenesis somatik tak langsung. Pelbagai rawatan PGR yang berbeza telah digunakan untuk tujuan ini. Kajian terdahulu menunjukkan penggunaan jenis dan kepekatan hormon auksin berjaya menghasilkan kalus daripada tunas pucuk eksplan.

Penyediaan eksplan merupakan antara langkah terpenting pada awal kajian. Dalam menyediakan eksplan bagi menginduksi kalus, pokok kultur tisu dipastikan sihat dan haruslah bebas daripada mikroorganisma seperti kulat atau bakteria. Pokok yang terlalu lama di dalam kultur dan melebihi jangka masa setahun kurang sesuai digunakan. Hal ini bagi memastikan eksplan mempunyai kemandirian hidup yang tinggi untuk berkembang kepada kalus dan seterusnya mengeluarkan pucuk serta boleh membesar. Pokok kultur tisu halia bara yang telah dibiak melalui proses organogenesis secara terus digunakan sebagai eksplan bagi penghasilan kalus [*Gambar 1(a)*]. Pokok halia bara dikeluarkan daripada balang dan diletakkan di atas piring petri yang kosong. Piring petri yang digunakan perlu dilap terlebih dahulu dengan menggunakan 70% etanol. Bahagian yang akan digunakan sebagai eksplan adalah pucuk meristem apeks. Bahagian bawah pokok yang mengandungi pucuk meristem apeks akan dipotong ~2 cm tanpa mendedahkan pucuk meristem apeks (*Gambar rajah 1*). Seterusnya, kulit bahagian luar keratan pokok halia bara akan dikupas satu persatu sehingga nipis, tetapi tidak mendedahkan pucuk meristem apeks. Pucuk meristem apeks yang telah siap disediakan kemudiannya diletakkan di atas medium penginduksi kalus yang mengandungi medium MS dengan 0.5 mg/L 2,4-D [*Gambar 1(b)*]. Piring petri yang telah siap dikultur dengan eksplan kemudiannya dibalut dengan menggunakan parafilm. Masa yang dihasilkan bagi membentuk kalus adalah dalam masa dua minggu iaitu 14 – 30 hari [*Gambar 1(c)*] [*Gambar 1(d)*]. Pucuk meristem apeks biasanya akan menghasilkan kalus yang padat dan kasar. Kalus yang terhasil juga membentuk embrio globular. Selain itu, eksplan daripada pucuk meristem apeks turut menghasilkan embrio kalus yang berwarna hijau dan putih [*Gambar 1(e)*].

Kemandirian hidup bagi kalus adalah tinggi serta kadar kontaminasi kalus [*Gambar 1(f)*] yang terhasil juga adalah rendah iaitu dalam purata kurang daripada 5%.



*Gambar 1. Penginduksian kalus dan proliferasi daripada eksplan pucuk meristem apeks. Pokok kultur tisulalia bara, (a) bahagian pucuk meristem apeks yang diinduksi di atas medium 0.5 mg/L 2,4-D, (b) kalus yang terhasil selepas sebulan induksi daripada pucuk meristem apeks, (c dan d) pucuk meristem apeks turut menghasilkan embrio kalus, (e) kalus dikontaminasi dengan kulat, (f) pembentukan kalus berwarna putih, (g dan h) pembentukan kalus hijau kekuningan (i) pembentukan kalus rooty, (j dan k) kalus terbantut dan (l) yang berwarna keperangan (browning).*



Gambar rajah 1. Pokok halia bara dan bahagian yang digunakan sebagai eksplan

Kalus yang diperoleh daripada pengkulturan di atas medium penginduksi kalus perlu dipindahkan (subkultur) ke medium yang sesuai untuk proses seterusnya iaitu proliferasi kalus. Bagi kajian proliferasi, kalus dikultur di atas medium rawatan yang mengandungi hormon yang berbeza seperti tersenarai dalam *Jadual 1*. Sebanyak 1 g kolompok kalus digunakan bagi permulaan rawatan dan dikultur di atas medium dalam piring petri. Kajian ini bertujuan untuk menentukan kepekatan dan jenis hormon yang berbeza bagi melihat kadar proliferasi yang paling tinggi. Sepanjang tempoh ini, subkultur akan dilakukan selepas sebulan bagi memastikan kalus mendapat sumber nutrien yang mencukupi. Selepas tempoh dua bulan dari waktu rawatan, peratusan pembentukan kalus yang berwarna putih [*Gambar 1 (g), (h)*], hijau kekuningan [*Gambar 1(i)*], kalus *rooty* (kalus yang berbentuk seperti akar) [*Gambar 1(j), (k)*] dan kalus terbantut dan yang berwarna keperangan [*Gambar 1(l)*] direkodkan seperti dalam *Jadual 1*.

Kalus yang berwarna hijau kekuningan akan terus disubkulturkan ke atas medium yang sama untuk proses regenerasi iaitu ke arah penghasilan plantlet (anak pokok). Daripada hasil rawatan yang diberikan ke atas kalus bagi tujuan proliferasi, didapati peningkatan berat kalus yang paling tinggi diperoleh daripada rawatan 0.5 mg/L 2,4-D+ 1.0 mg/L BAP dengan berat basah sebanyak 9.75 g, ia diikuti dengan rawatan 0.5 mg/L 2,4-D+ 1.0 mg/L NAA (9.55 g). Medium rawatan 0.5 mg/L 2,4-D+ 1.0 mg/L BAP juga menghasilkan kalus berwarna hijau yang tinggi pada kadar 50% dan tiada kalus keperangan (*browning*) yang terbentuk (0%). Di samping itu, pembentukan

kalus *rooty* yang merupakan kalus yang tidak embriogenik (tidak ada potensi untuk menjadi plantlet) adalah rendah iaitu sekitar 20%. Semakin tinggi kepekatan 2,4-D, semakin rendah kadar proliferasi kalus yang dihasilkan sama ada diberi secara kombinasi dengan BAP, NAA atau secara tunggal. Pemberian 3 mg/L 2,4-D secara tunggal menunjukkan penghasilan kalus yang paling rendah iaitu sebanyak 2.3 g.

Jadual 1. Rawatan bagi proliferasi kalus menggunakan hormon dengan kepekatan yang berbeza

2,4-D mg/L	BAP mg/L	NAA mg/L	Berat kalus (g)	Pembentukan kalus mengikut warna (%)			Kalus <i>browning</i> (%)
				Hijau	Putih	<i>Rooty</i>	
0.5	-	-	6.3 ± 1.5	20	50	-	30
1.0			5.6 ± 0.9	25	40	-	35
3.0			2.3 ± 0.5	35	30	-	35
0.5	1.0	-	9.75 ± 2.5	50	30	20	0
1.0	1.0	-	6.4 ± 1.3	25	40	30	5
3.0	1.0	-	5.1 ± 2.1	25	50	20	5
0.5	-	1.0	9.55 ± 1.7	25	60	-	15
1.0	-	1.0	5.3 ± 2.1	20	60	-	20
3.0	-	1.0	3.1 ± 0.5	35	35	-	30

### Somatik embriogenesis dan regenerasi pucuk

Hormon memainkan peranan yang penting dalam mencetuskan embriogenesis somatik kalus. Embriogenesis merupakan satu proses terbentuknya embrio somatik. Embrio somatik adalah embrio yang bukan berasal daripada zigot, tetapi berasal daripada sel biasa melalui kaedah kultur tisu. Tanaman lengkap yang dipanggil plantlet yang terbentuk daripada kalus perlu melalui proses embriogenesis somatik dan diikuti proses regenerasi melalui teknik kultur tisu.

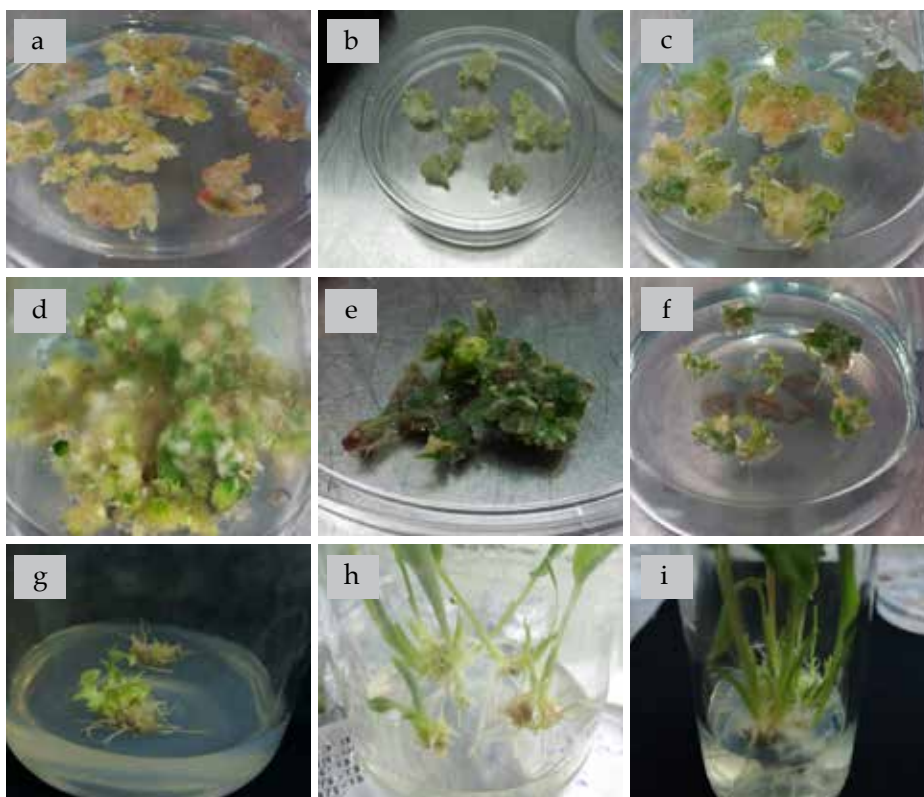
Bagi proses regenerasi, kalus hijau, kekuningan atau keputihan yang terbentuk daripada aktiviti proliferasi akan diteruskan pengkulturannya di atas medium regenerasi (*Jadual 2*) Proses pemindahan dan pengkulturan kalus ke atas medium regenerasi yang mengandungi hormon 2,4-D, BAP, NAA, TDZ dan IBA pada kepekatan yang berbeza dilakukan untuk mendapatkan medium yang optimum untuk regenerasi pucuk. Pemerhatian dilakukan ke atas pembentukan embrio somatik dan regenerasi pucuk untuk melihat keberkesanan rawatan. Selepas sebulan dikultur di atas medium regenerasi, kalus akan bertukar menjadi lebih hijau dan embrio somatik terbentuk [*Gambar 2 (a – d)*]. Regenerasi anak pokok daripada embrio somatik yang diperhatikan menunjukkan bahawa gabungan hormon TDZ dan



IBA pada kepekatan 0.5 – 1.0 mg/L menggalakkan pembentukan embrio somatik yang tertinggi dianggarkan 10 – 15% berbanding dengan kombinasi rawatan yang lain. Rawatan ini juga menunjukkan berlaku perubahan positif untuk pembentukan pucuk iaitu regenerasi pucuk yang tinggi, 5 – 7 pucuk [*Gambar 2 (e – i)*]. Data juga menunjukkan penggunaan gabungan 2,4-D+BAP, 2,4-D+NAA dan 2,4-D+IBA berjaya menghasilkan embrio somatik pada kadar 5 – 10%. Namun, tiada pengeluaran pucuk dihasilkan untuk gabungan rawatan 2,4-D+NAA atau 2,4-D+IBA. Bagi gabugan 2,4-D dan BAP ia juga berjaya menghasilkan pucuk dengan bilangan 2 – 3 pucuk. Pengkulturan kalus di atas medium regenerasi telah berjaya menghasilkan plantlet halia bara daripada kalus.

Jadual 2. Penghasilan dan perkembangan embrio somatik ke arah regenerasi pucuk

2,4-D	BAP	NAA	Pembentukan somatik embrio (%)	Regenerasi pucuk (bilangan)
0.5	-	-	0	0
0.5	1.0	-	10 ± 2.2	0
1.0	1.0	-	5 ± 1.1	3 ± 0.5
3.0	1.0	-	5 ± 2.1	2 ± 0.6
0.5	-	1.0	5 ± 0.5	0
1.0	-	1.0	5 ± 0.9	0
3.0	-	1.0	0	0
2,4-D	TDZ	IBA		
0.5	0.5	-	0	0
1.0	0.5	-	0	0
0.5	1.0	-	0	0
1.0	1.0	-	0	0
0.5		0.5	0	0
1.0		0.5	5 ± 1.0	0
0.5		1.0	0	0
1.0		1.0	0	0
-	0.5	0.5	15 ± 2.5	7 ± 2.5
-	1.0	0.5	10 ± 2.7	5 ± 0.3



Gambar 2. Proses pembentukan embrio somatik dan regenerasi pucuk halia bara. Pembentukan embrio somatik di atas medium regenerasi (a – d) dan proses pembentukan pucuk (e – i)

### Kesimpulan

Kajian mengenai induksi kalus dan regenerasi pucuk tanaman halia bara bagi tujuan pengeluaran plantlet (anak pokok) secara proses embriogenesis somatik telah dijalankan. Penyediaan eksplan merupakan langkah terpenting pada awal kajian. Dalam menyediakan eksplan untuk digunakan bagi menginduksi kalus, pokok kultur tisu yang digunakan haruslah dipastikan tahap kesterilannya di mana ia harus bebas mikroorganisma. Bagi memastikan eksplan mempunyai kemandirian hidup yang tinggi untuk berkembang kepada kalus dan seterusnya mengeluarkan pucuk dan menunjukkan pembesaran. Eksplan yang digunakan dalam kajian ini ialah pucuk pokok kultur tisu (meristem apeks). Eksplan meristem apeks diinokulasikan di atas medium 0.5 mg/L 2,4-D dan berjaya menghasilkan kalus globular. Kalus yang terhasil perlu melalui proses proliferasi dan seterusnya regenerasi untuk penghasilan plantlet. Rawatan untuk proliferasi kalus menunjukkan 0.5 mg/L 2,4-D+ 1.0 mg/L BAP adalah yang terbaik dengan penghasilan berat basah sebanyak 9.75 g. Bagi regenerasi pucuk daripada kalus, eksplan telah dikultur di atas medium regenerasi iaitu *premix* mengandungi kombinasi vitamin dan kepekatan hormon yang berlainan. Antara kombinasi hormon

yang telah digunakan, didapati rawatan gabungan hormon TDZ dan IBA pada kepekatan 0.5 – 1.0 mg/L menghasilkan somatik embrio yang tertinggi iaitu 10 – 15%. Medium yang sama ini juga telah menghasilkan bilangan pucuk yang maksimum (5 – 7 pucuk). Medium regenerasi dan proliferasi kalus dengan aplikasi kepekatan dan jenis hormon pengawal atur pertumbuhan yang sesuai untuk pertumbuhan embrio somatik dan regenerasi telah berjaya diperolehi.

### **Bibliografi**

- Faisal, M. dan Anis, M. (2006). thidiazuron induced high frequency axillary shoot multiplication in *Psoralea corylifolia*. *Biologia Plantarum* 50(3): 437 – 440
- Huetteman, C.A. dan Preece, J.E. (1993). Thidiazuron a potent cytokinin for woody plant-tissue culture. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 33(2): 105 – 119
- Garg, P. (2012). Multiple shoot an efficient root induction in *Cissus quadrangularis*. *International J. Phar Clinic Res.* 4(1): 4 – 10
- Rostiana, O. dan Seswita, D. (2007). Pengaruh indole-3- butyric acid dan naphthalene acetic acid terhadap induksi perakaran tunas piritrum (*Chrysanthemum cinerariifolium* (trevir.) vis.) klon prau 6 secara in vitro. *Bul. Litro* 18(1): 39 – 48

### **Ringkasan**

Halia bara (*Zingiber officinale* Rosc var. *Rubrum*) merupakan tumbuhan tropika yang penting serta mempunyai bahagian rizom yang amat bernilai untuk dijadikan sebagai rempah-ratus dan bahan herba. Kaedah kultur tisu *in vitro* merupakan kaedah alternatif bagi mempercepatkan pertumbuhan dalam kuantiti yang banyak berbanding dengan kaedah konvensional. Kajian kultur tisu penginduksian kalus dan regenerasi pucuk halia bara dijalankan bagi tujuan meningkatkan pengeluaran dan menghasilkan bahan tanaman halia bara yang bebas penyakit atau mikroorganisma. Dalam kajian ini, pucuk meristem apeks halia bara digunakan sebagai eksplan. Medium pertumbuhan MS yang dibekalkan dengan 0.5 mg/L 2,4-D menghasilkan kalus selepas 1 – 2 bulan dikulturkan. Kajian diteruskan lagi untuk penghasilan kalus embrio somatik. Medium kultur dengan gabungan hormon menghasilkan peratusan kalus embrio somatik hijau yang lebih tinggi berbanding dengan rawatan tunggal. Pengawal atur pertumbuhan memainkan peranan yang penting dalam mencetuskan embriogenesis somatik kalus. Regenerasi anak pokok daripada embrio somatik yang diperhatikan menunjukkan bahawa hormon TDZ dan IBA menggalakkan pertumbuhan pucuk yang lebih baik berbanding dengan hormon lain. Daripada pelbagai kepekatan yang telah diuji, keputusan menunjukkan bahawa kedua hormon ini dengan kepekatan 0.5 – 1.0 mg/L mengeluarkan bilangan pucuk yang paling tinggi.

### **Summary**

Red ginger (*Zingiber officinale* Rosc var. *Rubrum*) is an important tropical plant and has a very valuable part of the rhizome that is used as a spice and herbal ingredient. The in vitro tissue culture method is an alternative method to accelerate growth in large quantities compared to conventional methods. Tissue culture studies of callus induction and regeneration of red ginger shoots were conducted for the purpose of increasing the production and producing its plant material that is free of disease or microorganisms. In this study, ginger apex meristem shoots were used as explants. MS medium supplied with 0.5 mg/L 2,4-D produced callus after 1 – 2 months

of culture. Studies were continued for the production of somatic embryonic calluses. Culture medium with combined hormone treatment produced a higher percentage of green somatic embryonic calluses compared to a single treatment. Growth regulators play an important role in triggering callus somatic embryogenesis. Regeneration of seedlings from somatic embryos observed showed that the hormones TDZ and IBA promote shoot growth better than other hormones. Of the various concentrations that have been tested, the results showed that these two hormones with concentrations of 0.5 – 1.0 mg/L produced the highest shoot frequency.

**Pengarang**

Zuraida Ab Rahman (Dr.)

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi, Ibu Pejabat MARDI  
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

E-mel: azuraida@mardi.gov.my

Ayu Nazreena Othman

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi, Ibu Pejabat MARDI  
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

Hartinee Abbas (Dr.)

Pusat Penyelidikan Padi dan Beras, MARDI

Jalan Paya Keladi/Pinang Tunggul

13200 Kepala Batas, Pulau Pinang

Nur Najwa Arifah Basiron

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi, Ibu Pejabat MARDI  
Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor