

Penghasilan dan peningkatan pigmen betalain melalui teknologi kultur kalus pitaya

(Production and enhancement of betalain pigment through pitaya callus culture technology)

Rogayah Sekeli, Wee Chien Yeong, Siti Fatihah Yahya, Nor Fadzliana Abu Faizal, Nor Hidayu Che Asari dan Chandradevan Machap

Pengenalan

Buah pitaya atau dikenali juga sebagai buah naga merupakan antara buah yang popular di Malaysia. Buah ini berasal dari Amerika Tengah serta Amerika Selatan dan tersebar luas di rantau Asia. Permintaan yang tinggi terhadap buah pitaya adalah disebabkan warnanya yang menarik, kandungan nutrien yang tinggi serta rasa yang tidak terlalu manis di samping mempunyai kesan antioksidan yang baik untuk kesihatan. Terdapat tiga jenis pitaya yang ditanam di Malaysia. Jenis yang pertama ialah *Hylocereus polyrhizus* (Gambar 1) yang mempunyai kulit berwarna merah muda, dengan isinya berwarna merah. Jenis kedua pula ialah *Hylocereus undatus* yang juga mempunyai warna kulit merah muda, tetapi isinya berwarna putih dan jenis ketiga ialah *Selenicereus megalanthus* merupakan pitaya yang mempunyai kulit berwarna kuning dengan isinya berwarna putih.

Buah pitaya mempunyai kandungan nutrisi yang tinggi dan memberi banyak manfaat kepada kesihatan, terutamanya daripada jenis *Hylocereus* sp. yang mengandungi glukosa, fruktosa dan oligosakarida dengan pelbagai berat molekul. Oligosakarida daripada *Hylocereus polyrhizus* mempunyai ciri-ciri prebiotik yang boleh menggalakkan pertumbuhan *Lactobacillus* dan *Bifidobacteria*. Buah pitaya juga dilaporkan kaya dengan kandungan betalain terutamanya pitaya merah yang dikatakan mempunyai pelbagai pigmen yang sama seperti yang dijumpai dalam ubi bit. Ini merupakan salah satu sebab mengapa kebanyakan kajian penghasilan betalain banyak tertumpu kepada sumber buah pitaya merah.

Pewarna makanan

Dalam industri makanan, warna merupakan salah satu petunjuk penting dalam menentukan kualiti makanan atau mempengaruhi penerimaan pengguna terhadap sesuatu makanan. Pewarna tambahan berfungsi menggantikan atau meningkatkan lagi warna yang sedia ada dalam produk makanan yang berkurangan mahupun hilang semasa pemrosesan makanan. Ia juga bertujuan menjadikan sesuatu produk makanan itu lebih menyerlah



Gambar 1. Buah pitaya merah

dan lebih menarik serta menyelerakan. Oleh itu, warna menjadi isu utama dalam industri pembuatan makanan bagi memenuhi permintaan pengguna.

Penggunaan pewarna tambahan boleh diklasifikasikan sebagai semula jadi, persamaan dengan semula jadi (*nature-identical*), sintetik dan bukan organik. Pewarna semula jadi adalah seperti klorofil, antosianin dan karotenoid yang disintesis daripada organisma hidup. Warna semula jadi itu juga boleh diperoleh daripada alam semula jadi seperti karotena, riboflavin dan kantaxantin. Azo pula adalah contoh pewarna sintetik yang tidak ditemui di alam semula jadi. Manakala warna bukan organik pula adalah seperti emas, perak dan titanium dioksida. Kebanyakan industri makanan menggunakan pewarna sintetik kerana mudah dihasilkan untuk menepati keperluan produk makanan yang dikeluarkan dan warnanya tidak mudah hilang atau tidak terjejas semasa pemrosesan.

Penggunaan pigmen semula jadi daripada tumbuhan seperti karotenoid, antosianin dan betalain semakin mendapat perhatian dalam kalangan pengguna memandangkan keselamatan menggunakan pewarna sintetik semakin membimbangkan. Perhatian pengguna dan minat yang semakin meningkat terhadap penggunaan pewarna semula jadi adalah disebabkan oleh ciri-ciri karsinogenik dan kesan toksik pada pewarna sintetik tertentu seperti tartrazin, brilliant biru dan allura merah terhadap kesihatan manusia. Sehingga kini, terdapat 80 bahan pewarna tambahan disenaraikan tertakluk kepada kumpulan pensijilan yang dibenarkan penggunaannya dalam makanan, ubat-ubatan dan kosmetik.

Betalain

Betalain adalah salah satu pewarna semula jadi yang semakin mendapat perhatian dan permintaan yang tinggi oleh pengeluar produk makanan. Betalain merupakan salah satu pigmen semula jadi tumbuhan yang utama selain antosianin dan flavonoid. Selain merupakan pigmen metabolit sekunder yang larut air, betalain juga mempunyai kumpulan nitrogen tertentu yang memainkan peranan dalam penghasilan pigmen merah-ungu dan kuning-oren. Ia mempunyai dua jenis struktur utama yang dikenali sebagai betasianin dan betaxantin. Betasianin ialah pigmen merah-ungu dengan spektrum penyerapan maksimum pada jarak gelombang 535 – 578 nm, manakala betaxantin ialah pigmen kuning-oren dengan spektrum penyerapan maksimum pada 480 nm.

Betalain boleh diperoleh daripada pelbagai bahagian tumbuhan yang berbeza seperti akar, bunga, buah ataupun daun. Sumber utama betalain yang diketahui adalah seperti ubi bit (*Beta vulgaris*), buah kaktus (spesies *Opuntia*) dan buah pitaya merah (*Hylocereus polyrhizus*). Betalain memainkan peranan penting sebagai pewarna dalam produk makanan dan merupakan antara lima pewarna yang paling banyak digunakan dalam industri makanan.

Betalain didapati lebih stabil, tidak dipengaruhi oleh pH, dengan kekuatan pewarna tiga kali lebih tinggi berbanding dengan pigmen semula jadi yang lain dan sesuai digunakan untuk makanan bersuhu rendah tanpa mengubah rasa makanan berbanding dengan antosianin. Ia mempunyai kestabilan pada pH 3 – 7 menjadikan ia sesuai untuk digunakan sebagai pewarna makanan semula jadi pada tahap keasidan yang rendah. Betalain pertama yang diekstrak adalah daripada ubi bit yang mengandungi pigmen berwarna merah dan kuning iaitu betasianin dan betaxantin dengan betasianin merupakan komponen utama iaitu 95% daripada pigmen merah. Sehingga kini, sumber komersial utama betalain adalah daripada ekstrak ubi bit dan kaktus pir (*Opuntia ficus-indica*).

Betalain telah digunakan secara meluas sebagai pewarna makanan semula jadi sejak beberapa abad yang lalu, namun telah mendapat perhatian sebagai pewarna makanan dan kosmetik semenjak dilaporkan mempunyai nilai antipengoksidaan yang tinggi. Betalain juga dilaporkan mempunyai aktiviti antipenuaan, antiradang, antitoksin, mampu mengurangkan risiko pembekuan darah dan juga antikanser. Kajian klinikal juga telah membuktikan bahawa betalain boleh meningkatkan tahap tenaga, membuang sel-sel mati dan meningkatkan sistem imun badan.

Sejak beberapa tahun kebelakangan ini, pendekatan bioteknologi telah diterokai untuk menghasilkan pigmen ini secara *in vitro*. Beberapa kaedah telah dilaporkan berjaya menghasilkan metabolit sekunder secara *in vitro* termasuk menggunakan eksplan daripada akar dan kalus. Penghasilan betalain secara *in vitro* mempunyai beberapa kelebihan kerana ia tidak terjejas oleh perubahan iklim atau serangan perosak dan tidak memerlukan ruang yang luas. Penggunaan sistem kalus lebih baik berbanding dengan kultur ampai sel bagi penghasilan pigmen betalain kerana penampilan morfologi yang dihasilkan dapat dilihat dengan mudah terutama dalam pemilihan warna pigmen.

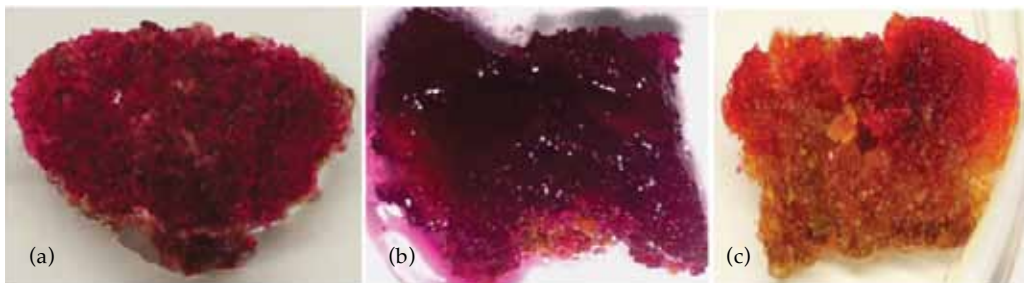
Di MARDI, projek penyelidikan mikro propagasi pokok pitaya telah berjaya dipelopori melalui pendekatan kultur tisu. Walau bagaimanapun, penyelidikan berkaitan pengeluaran pigmen betalain menggunakan sistem kalus dan kultur ampai sel buah pitaya masih belum dieksploitasi. Memandangkan kepentingan penghasilan sumber betalain daripada buah pitaya, maka kajian penghasilan pigmen ini secara sistem kalus *in vitro* telah dibangunkan.

Penghasilan metabolit betalain secara *in vitro*

Teknologi sistem kultur kalus untuk menghasilkan pigmen betalain dengan kepekatan yang lebih tinggi daripada buah pitaya merah telah dibangunkan. Sistem teknologi kultur kalus melalui pendedahan sel-sel buah pitaya ke atas rawatan hormon dan agen penggalak menunjukkan kesan yang positif dalam meningkatkan penghasilan metabolit sekunder. Kompaun metabolit sekunder daripada kalus yang terhasil kemudiannya diekstrak dan

ditentukan menggunakan LCMS-MS untuk mengenal pasti profil kimia yang diperolehi. Kesan pelbagai hormon penggalak tumbesaran iaitu 6-benzylaminopurine (BAP), thidiazuron (TDZ), asid asetik naftalena (NAA) dan asid 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) telah diuji. Penemuan menunjukkan 4 mg/liter thidiazuron dan 2 mg/liter asid asetik naftalena merupakan rawatan terbaik bagi penghasilan kalus dengan kandungan pigmen yang tinggi menggunakan segmen isi buah pitaya sebagai sumber eksplan.

Penggunaan kombinasi hormon penggalak yang berbeza juga didapati menghasilkan warna pigmen dan struktur kalus yang berbeza (*Gambar 2*). Kajian kesan penggunaan kepekatan sukrosa yang berlainan juga menunjukkan kepekatan sukrosa yang optimum penting bagi memaksimumkan penghasilan betalain secara *in vitro*. Kepekatan optimum yang diperlukan ialah 30 g/liter. Peningkatan kepekatan sukrosa dalam medium didapati menjejaskan morfologi kalus dan penghasilan betalain yang terhasil (*Gambar 3*).



Gambar 2. Morfologi kalus yang dikulturkan di atas medium Murashige dan Skoog (MS) yang ditambah dengan hormon berbeza. (a) Gabungan TDZ dan NAA, (b) Gabungan BAP dan NAA, (c) Gabungan 2,4-D dan NAA. Gabungan TDZ atau BAP dengan NAA menghasilkan pigmen kalus yang lebih gelap berbanding dengan 2,4-D dan NAA



Gambar 3. Kesan penggunaan kepekatan sukrosa yang berlainan ke atas penghasilan kalus dan pengeluaran pigmen

Kajian lanjut dengan menggunakan medium asas yang mengandungi thidiazuron dan asid asetik naftalena, kepekatan sukrosa yang optimum dengan penambahan pelbagai agen penggalak (L-tyrosine, metil jasmonate, asid salisilik dan ekstrak yis) telah dijalankan bagi meningkatkan lagi penghasilan fitonutrien dalam kultur kalus pitaya merah. Metil jasmonate dengan kepekatan 60 μM didapati mampu meningkatkan penghasilan betalain secara signifikan sehingga empat kali ganda lebih tinggi berbanding dengan agen penggalak yang lain. Di samping berupaya meningkatkan pigmen betalain, sistem kalus ini juga didapati berjaya menghasilkan sebatian bioaktif yang novel dalam tapak jalan betalain. Kultur kalus pitaya berjaya menghasilkan sembilan kompaun bioaktif yang novel berbanding dalam buah pitaya segar. Hanya tujuh sebatian bioaktif telah dikesan dalam buah segar sebaliknya sebanyak 16 sebatian bioaktif berjaya dikenal pasti dalam sistem kultur kalus. Ini membuktikan bahawa melalui pendekatan sistem kultur kalus, kehadiran kompaun bioaktif dalam sel buah pitaya merah boleh dipertingkatkan.

Hala tuju penyelidikan

Manfaat metabolit sekunder betalain terhadap kesihatan selain sebagai pewarna dalam pemprosesan makanan telah dikaji. Sistem kultur kalus pitaya merah ini sangat penting kerana bukan sahaja mampu memaksimumkan pengeluaran betalain, malah merupakan platform yang sesuai untuk memanipulasi tapak jalan metabolit melalui aplikasi rawatan pelbagai jenis hormon dan agen penggalak pertumbuhan. Teknologi yang dibangunkan berpotensi menghasilkan pigmen kesihatan yang berharga dalam jumlah/kuantiti yang tinggi dengan cara yang lebih cepat, mudah dan kos yang efektif tanpa perlu melalui proses penanaman serta menunggu ia berbuah.

Bagi mengelakkan kerugian semasa pemprosesan produk makanan dan memaksimumkan pengeluaran betalain, kajian lanjut berkaitan faktor-faktor yang mempengaruhi kestabilan dan pengeluaran betalain perlu dijalankan. Kajian ke atas bahagian lain pokok pitaya juga boleh dijalankan bagi mengenal pasti bahagian yang paling efektif dalam penghasilan sumber betalain ini. Kestabilan pigmen betalain yang terhasil juga sangat penting bagi memastikan penghasilan betalain yang tinggi, berkualiti dan seragam. Selain penambahan hormon dan agen penggalak, pengenalpastian tapak jalan laluan agen penggalak juga perlu lebih difahami agar modifikasi secara lebih berkesan dapat dijalankan bagi memastikan penghasilan betalain yang maksimum.

Penghargaan

Penulis ingin merakamkan setinggi-tinggi penghargaan kepada MARDI atas penganugerahan Dana Pembangunan MARDI 21003002500001. Sekalung budi dan ucapan penghargaan juga ditujukan kepada semua kolaborator dan kakitangan sokongan di Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi yang telah bersama-sama menjayakan projek ini.

Bibliografi

- Azeredo, H.M.C. (2009). Betalains: Properties, sources, application, stability-a review. *International Journal of Food Science and Technology* 44: 2365 – 2376
- FDA (2015). Summary of color additives for use in the United States in foods, drugs, cosmetic and medical devices. Diperoleh pada 26 Jun 2016 dari <http://www.fda.gov/ForIndustry/ColorAdditives/ColorAdditiveInventories/ucm115641.htm#ftnote4>
- Jackman, R.I. dan Smith, J.L. (1996). Anthocynins and betalain. Dalam: *Natural food colorants*, (Hendry, C.F. dan Houghton, J.D., ed.), m.s. 244 – 309. London: Blackie Academic and Professional
- Gandía-Herrero, F. dan Garcia-Carmona, F. (2013). Biosynthesis of betalains: Yellow and violet plant pigments. *Trends in Plant Science* 1039: 1 – 10
- Nottingham, S. (2004). Beetroot. Diperoleh dari http://ourworld.compuserve.com/homepages/Stephen_Nottingham/beetroot.htm
- Stafford, A. dan Warren, G. (1991). Biotransformation by plant cell cultures. Dalam: *Plant cell and tissue culture*, (Stafford, A. dan Warren, G., ed.), m.s. 163 – 204. Buckingham: Open University Press
- Stintzing, F.C. dan Carle, R. (2007). Betalains-emerging prospets for food sciences. *Trends Food Sci Technol* 18: 514 – 525
- Tanaka, Y., Sasaki, N. dan Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains, and carotenoids. *The Plant Journal* 54: 733 – 749
- Wichienchot, S., Jatupornpipat, M. dan Rastall, R.A. (2010). Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chemistry* 120: 850 – 857

Ringkasan

Buah pitaya merah (*Hylocereus polyrhizus*) dengan isi buah yang berwarna merah pekat, kaya dengan pigmen betalain yang menyerupai pigmen yang terdapat pada ubi bit. Pengeluaran buah-buahan melalui penanaman ladang adalah lambat dan menyebabkan permintaan terhadap pigmen betalain yang semakin meningkat sebagai sumber antioksidan dan pewarna makanan semula jadi tidak dapat dipenuhi. Walau bagaimanapun, dengan kemajuan teknologi, pendekatan alternatif telah dieksploitasi bagi penghasilan fitonutrien secara sistem *in vitro*. Teknologi kultur kalus pitaya merah telah berjaya dibangunkan untuk menghasilkan metabolit sekunder ini. Teknologi ini membolehkan pengeluaran kultur kalus secara berterusan dan cepat serta tidak terjejas dengan perubahan iklim, serangan penyakit dan kawasan penanaman yang terhad. Sistem kultur kalus yang dibangunkan melalui penambahan pelbagai agen penggalak dan rawatan hormon ini mampu menghasilkan pigmen betalain sebanyak empat kali ganda lebih tinggi berbanding dengan buah pitaya segar. Sebanyak 16 kompaun bioaktif betalain yang berbeza telah dikenal pasti dalam sistem kultur kalus berbanding dengan hanya tujuh kompaun dalam buah segar. Di samping itu, sembilan kompaun bioaktif betalain yang novel telah dikenal pasti apabila rawatan hormon yang mengandungi 4 mg/liter thidiazuron dan 2 mg/liter asid asetik naftalena digunakan. Penambahan agen penggalak metil jasmonate juga didapati berjaya meningkatkan pengeluaran pigmen betalain.

Summary

Red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) with deep red coloured fruit flesh is rich in betalain pigment which is similar in beetroot. Production of fruit crop through field cultivation is slow and currently cannot meet the growing demands of betalain pigment as an alternative source of antioxidants and natural food colorant. However, through the advancement of technology, an alternative approach was exploited to biosynthesize the phytonutrients by using *in vitro* system. Red pitaya callus culture was successfully developed to produce this secondary metabolite, allowing for the fast and continuous pigment production which is unaffected by the climate change or limited of suitable planting area. Introducing of various elicitors and hormonal treatment in the a callus culture system has enhanced the betalain pigments production up-to 4 folds levels higher. A total of 16 different betalain bioactive compounds were identified in callus culture compared to only seven bioactive compounds in the cultivated fruit. In addition, there are nine novel betalain bioactive compounds were produced when 4 mg/litre thidiazuron and 2 mg/litre naphthalene acetic acid hormonal treatment was used. The addition of methyl jasmonate as elicitor was also found to significantly enhance the production of betalain.

Pengarang

Rogayah Sekeli

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi,

Ibu Pejabat MARDI, Serdang, Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

E-mel: lynn@mardi.gov.my

Wee Chien Yeong, Siti Fatihah Yahya, Nor Fadzliana Abu Faizal, Nor Hidayu Che Asari dan Chandradevan Machap

Pusat Penyelidikan Bioteknologi dan Nanoteknologi,

Ibu Pejabat MARDI, Serdang, Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor