

KULTUR KALUS SEBAGAI PENGHASIL METABOLIT SEKUNDER BERUPA PIGMEN

Yayuk Purwaningrum

Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Islam Sumatera Utara
Jl. Karya Bhakti No. 34 Medan Johor Telp.(061) 69692531
Email : yayuk_dadan@yahoo.com

ABSTRAK

Kalus adalah suatu kumpulan sel amorphous yang terjadi dari sel-sel yang membelah diri dan terdiri atas sel parenkim. Kelebihan penggunaan kultur jaringan menggunakan kalus dengan kultur lainnya adalah pada kultur kalus menunjukkan penampakan morfologi lebih mudah diamati, terutama warna sehingga penggunaan kultur kalus sesuai untuk menghasilkan metabolit sekunder berupa pigmen. Terdapat tiga jenis pigmen yang menentukan warna pada bunga, yaitu antosianin, karotenoid, dan betalain. Pigmen antosianin berperan pada warna jingga, merah, ungu, dan biru. Pigmen karotenoid berperan pada warna kuning-oranye, pigmen betalain berperan pada warna merah-ungu (betasianin) dan kuning-oranye (beta-santini). Betalain merupakan metabolit sekunder berupa pigmen, larut dalam air, mengandung gugus nitrogen dan berperan pada tampilan warna merah-ungu (betasianin) dan kuning-jingga (betasantini). Pigmen betalain memiliki kelebihan dibandingkan dengan antosianin yaitu betasianin tidak dipengaruhi oleh pH dan lebih stabil dalam mewarnai makanan pada suhu dingin.

Kata Kunci : Kultur Kalus, Pigmen Betalain

PENDAHULUAN

Pemanfaatan teknologi kultur *in vitro* yang sebelumnya digunakan untuk pemuliaan dan perbanyakan tanaman, dewasa ini mulai diarahkan untuk memproduksi senyawa metabolit sekunder dalam jumlah besar dalam waktu singkat. Pemanfaatan teknologi ini sekaligus dapat menjawab permasalahan keterbatasan lahan, dan menjaga keseimbangan biodiversitas dengan menghindari eksploitasi berle-

bahan plasma nutfah sumber obat dari alam (Heble, 1996).

Kultur jaringan merupakan sumber alternatif sebagai penghasil substansi bioaktif tanaman termasuk pigmen. Produksi pewarna makanan dengan menggunakan bioteknologi menggunakan kultur tanaman secara *in vitro* memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan kultivasi secara komersial pada tanaman utuh, khususnya dalam pemeliharaan kondisi aseptik dan terkontrol. Selain itu juga tidak dipengaruhi oleh variasi iklim dan kandungan tanah dan tidak membutuhkan ruang yang tidak begitu luas.

Kemampuan dalam mengontrol kondisi pada kultur jaringan membantu dalam memastikan persediaan produksi yang berkelanjutan sehingga mudah dalam melakukan ekstraksi produk dengan kualitas dan hasil yang seragam, aman dan tidak dipengaruhi oleh lokasi geografis. Selain itu pewarna yang dihasilkan melalui jalur inidiklasifikasikan sebagai "alami" daripada "identik alami" (Georgive *et al.*, 2008). Senyawa bioaktif sebagai hasil metabolisme sekunder telah banyak digunakan sebagai zat warna (pigmen), obat-obatan, dan lain sebagainya. Untuk mendapatkan senyawa bioaktif dalam jumlah banyak secara alami seringkali menimbulkan kesulitan berkaitan dengan penyediaan tanaman.

Beberapa metode kultur jaringan yang digunakan untuk menghasilkan metabolit sekunder antara lain kultur rambut akar (*hairy root*), suspensi sel, dan kalus. Menurut Wonganu (2007), kalus adalah suatu metode kultur jaringan yang berpotensi tinggi dalam menyediakan metabolit sekunder. Kalus merupakan materi esensial dalam kultur jaringan. Hormon atau zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan untuk inisiasi kalus pada umumnya adalah auksin dan sitokinin.

Kalus terbentuk jika konsentrasi antara auksin dan sitokinin berapa pada

konsentrasi yang seimbang. Kelebihan penggunaan kultur jaringan menggunakan kalus dengan kultur lainnya adalah pada kultur kalus menunjukkan penampakan morfologi lebih mudah diamati, terutama warna sehingga penggunaan kultur kalus sesuai untuk menghasilkan metabolit sekunder berupa pigmen (Stafford and Warren, 1991). Betalain merupakan metabolit sekunder berupa pigmen, larut dalam air, mengandung gugus nitrogen dan berperan pada tampilan warna merah-ungu (betasianin) dan kuning-jingga (betasantin) (Grotewold, 2006).

Pigmen betalain memiliki kelebihan dibandingkan dengan antosianin yaitu betasianin tidak dipengaruhi oleh pH dan lebih stabil dalam mewarnai makanan pada suhu dingin (Tanaka et al., 2008). Betalain pada *beetroot* telah digunakan sebagai pewarna makanan, seperti pada *ice cream* dan makanan penutup beku dengan tanpa mengubah rasa (Nottingham, 2004). Keberadaan pigmen betalain pada tumbuhan terbatas hanya terdapat pada ordo Caryophyllales (Georgiev et al., 2008). Betalain pertama kali diekstraksi dari red beet (*Beta vulgaris*) dan digunakan sebagian besar sebagai pewarna makanan (Harivaindaran et al., 2008).

Menurut Girod and Zyrd (1991), kandungan betalain dari red beet sebesar 2.626 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW betasantin dan 21.187 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW betasianin yang didapatkan dari bagian akar. Sedangkan pada kultur kalus kandungan betasantin tertinggi pada fenotip ungu sebesar 28.016 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW dan betasantin pada fenotip oranye sebesar 12.210 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW. Pewarna buatan telah diketahui dapat mengakibatkan respon alergi dan tidak toleran sehingga perkembangan penggunaan pewarna alami sebagai pewarna pada makanan mengalami peningkatan. Ketertarikan industri makanan terhadap betalain sebagai pewarna makanan juga semakin meningkat ketika dilaporkan mengandung antioksidan alami yang memiliki efek positif terhadap kesehatan manusia, dan menunjukkan aktivitas sebagai anti kanker (Georgiev et al., 2008). Oleh karena itu dibutuhkan suatu metode penghasil betalain optimal sehingga bisa memenuhi terhadap permintaan.

KULTUR KALUS SEBAGAI PENGHASIL METABOLIT SEKUNDER

Penggunaan kultur jaringan adalah aman, karena rendahnya kontaminasi oleh virus, Penggunaan metabolit sekunder semakin meningkat seperti dibidang farmakologi (obat-obatan) dan industri makanan (pewarna). Menurut Sudarmadji (2003), kalus adalah suatu kumpulan sel amorphous yang terjadi dari sel-sel yang membelah diri dan terdiri atas sel parenkim (Slater et al., 2003). Menurut Stafford dan Warren (1991), kelebihan penggunaan kultur jaringan dengan menggunakan kalus adalah pada kultur kalus penampakan morfologi lebih mudah diamati, terutama warna sehingga penggunaan kultur dengan kalus sesuai dalam memproduksi zat warna atau pigmen yang berasal dari tanaman.

Kultur kalus juga digunakan untuk menginisiasi kultur suspensi sel pada media cair. Menurut Hos (2008), terdapat tiga tahapan dalam kultur kalus, yaitu tahapan induksi, proliferasi, dan diferensiasi. Tahapan induksi sel pada eksplan yang mengalami dediferensiasi dan memulai pembelahan, pada tahapan proliferasi pembelahan sel terjadi cepat, sedangkan pada tahapan diferensiasi terjadinya proses metabolisme atau organogenesis. Tingkat pertumbuhan dari kalus dapat digambarkan sebagai kurva pertumbuhan yang memiliki lima tahapan (fase).

Kondisi kalus berbeda pada tiap tahapan pertumbuhan. yaitu (1) fase lag, dimana sel dalam persiapan membelah; (2) fase eksponen, merupakan pembelahan sel maksimal; (3) fase linear, pembelahan melambat dan sel memperbesar; (4) fase pertumbuhan menurun; (5) fase stasioner atau tidak ada pertumbuhan, jumlah sel konstan. Menurut Saito and Mizukami (2002), pada kultur kalus terdapat beberapa faktor yang dibutuhkan terutama dalam optimalisasi produksi metabolit sekunder, yaitu zat pengatur tumbuh (ZPT), nutrisi medium (nitrogen, fosfat, sukrosa, ion Cu^{2+}), elisitor, faktor fisika (cahaya, temperatur, pH, aerasi, kepadatan sel), dan faktor biologi (variasi sel, kemampuan biosintesis). ZPT yang digunakan Pada medium primer zat pengatur tumbuh dalam pembentukan kalus sering digunakan berupa sitokinin (BAP, BA, kinetin) dan auksin (IAA, NAA,

atau 2,4-D). Pada konsentrasi antara auksin dengan sitokinin yang seimbang akan menginduksi kalus (Gurel et al., 2000).

KEBERADAAN PIGMEN BETALAIN

Terdapat tiga jenis pigmen yang menentukan warna pada bunga, yaitu antosianin, karotenoid, dan betalain. Pigmen antosianin berperan pada warna jingga, merah, ungu, dan biru. Pigmen karotenoid berperan pada warna kuning-oranye, pigmen betalain berperan pada warna merah-ungu (betasianin) dan kuning-oranye (betasantin). Antosianin terdistribusi luas pada bunga angiospermae, dan karotenoid terdapat pada bunga marigold (*Tagetes*), daffodil (*Narcissus*), *Freesia*, *Gerbera*, *Rosa*, *Lilium*, dan *Calendula* (Grotewold, 2006). Menurut Georgiev et al (2008), betalain terbatas hanya pada ordo Caryophyllales, yaitu Achatocarpaceae, Aizoaceae, Amaranthaceae, Basellaceae, Cactaceae, Chenopodiaceae, Didiereaceae, Halophytaceae, Hectorellaceae, Nyctaginaceae, Phytolaccaceae, Portulacaceae, dan Stegnospermataceae, sedangkan pada dua famili lainnya, yaitu Caryophyllaceae dan Molluginaceae menghasilkan antosianin.

Betalain termasuk senyawa yang larut dalam air dan mengandung gugus nitrogen (Moreno et al., 2008) Betalain terdiri dari dua pigmen, yaitu betasianin dan betasantin. Betasianin menunjukkan kandungan pigmen merah-ungu dan terbentuk dari hasil kondensasi dari *betalamic acid* dengan cyclo-DOPA dan memiliki absorbansi pada panjang gelombang antara 534-554 nm. Betasantin menunjukkan pigmen kuning-jingga dan

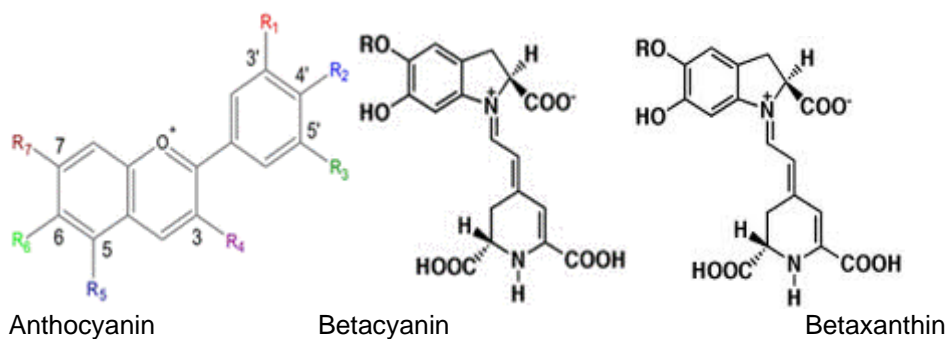
terbentuk dari konjugasi antara *betalamic acid* dengan *amine* atau dengan asam amino dan memiliki absorbansi panjang gelombang antara 470-486 nm (Gambar 1). (Zryd and Christiet, 2003).

Keberadaan betasianin selalu bersama-sama dengan betasantin. Betalain memiliki beberapa fungsi antara lain pada polinasi dan promotor penyebaran biji oleh binatang berdasarkan ketertarikan terhadap warna. Selain itu betalain memiliki fungsi spesifik pada *ice plant* yaitu memberikan perlindungan terhadap bahaya efek sinar UV (Georgiev et al., 2008). Meskipun betalain dan antosianin menunjukkan hampir adanya kesamaan terhadap warna yang tampak, namun berdasarkan struktur kimiawinya terdapat perbedaan antara betalain dengan antosianin. Pada betalain terdapat ikatan nitrogen, sedangkan pada antosianin tidak terdapat ikatan nitrogen (Gambar 1). Pada suatu sel atau tanaman yang menghasilkan betalain maka sel atau tanaman tersebut tidak akan menghasilkan antosianin, hal ini disebabkan karena pada tanaman yang menghasilkan betalain kekurangan *enzyme anthocyanidin synthase* yang berperan dalam tahapan akhir pada jalur biosintesis antosianin (Georgiev et al., 2008). Disamping adanya perbedaan struktur kimia antara betalain dengan antosianin, betalain lebih larut dengan air daripada antosianin dan kekuatan dalam mewarnai tiga kali lebih kuat daripada antosianin. Kestabilan pada pH 3 sampai 7 membuat betalain sesuai untuk diaplikasikan secara luas mewarnai makanan dengan tingkat keasaman rendah dan netral (Stintzing dan Carle, 2007). Betalain disintesis dengan *tyrosin* sebagai prekursor.

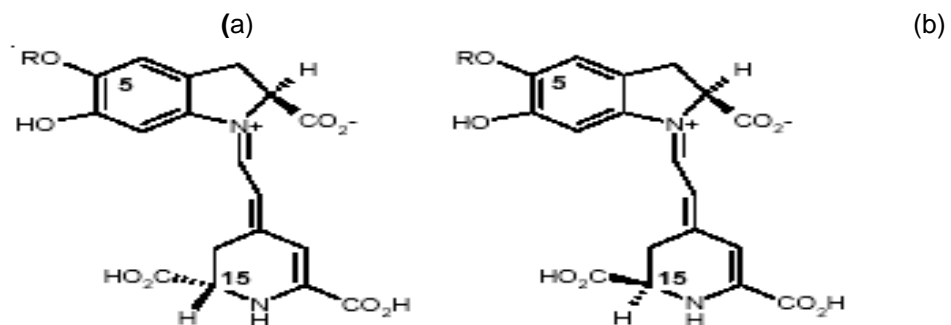
Tabel 1. Klasifikasi terbaru dari Caryophyllales (Clement dan Mabry, 1996).

Sub-Ordo	Famili	Contoh Genus
Chenopodiineae Menghasilkan betalain, tidak mengandung antosianin	Achatocarpaceae	<i>Achatocarpus</i>
	Aizoaceae	<i>Dorotheanthus, Mesembryanthemum, Carpobrotus</i>
	Amaranthaceae	<i>Amaranthus, Celosia, Gomphrena, Iresine</i>
	Basellaceae	<i>Basella</i>
	Cactaceae	<i>Mammillaria, Opuntia, Pereskia</i>
	Chenopodiaceae	<i>Beta, Chenopodium, Spinacia</i>
	Didiereaceae	<i>Didierea</i>
	Hectorellaceae	<i>Hectorella</i>
	Nyctaginaceae	<i>Halophytum</i>
	Phytolacaceae	<i>Bougainvillea, Mirabilis</i>
	Portulacaceae	<i>Phytolacca, Gisekia</i>
Stegnopermataceae	<i>Portulaca, Claytonia</i>	
Caryophyllineae Menghasilkan antosianin, tidak mengandung betalain	Caryophyllaceae	<i>Dianthus, Silene Stegnospermae</i>
	Molluginaceae	<i>Mollugo, Limeum</i>

Struktur betalains



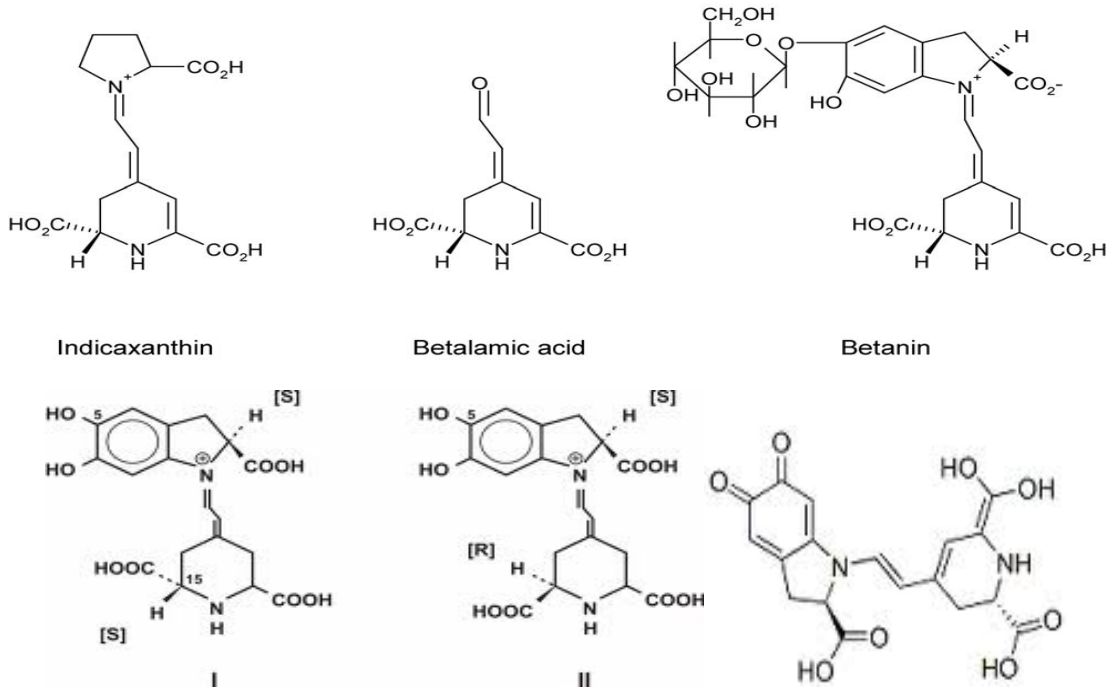
Gambar 1. Perbandingan struktur anthocyanin (contoh: delphinidin) dengan betacyanin (ex: betanidin) dan betaxanthins (R = asam amino rantai lateral atau amina). (Zyrd dan Christinet, 2003).



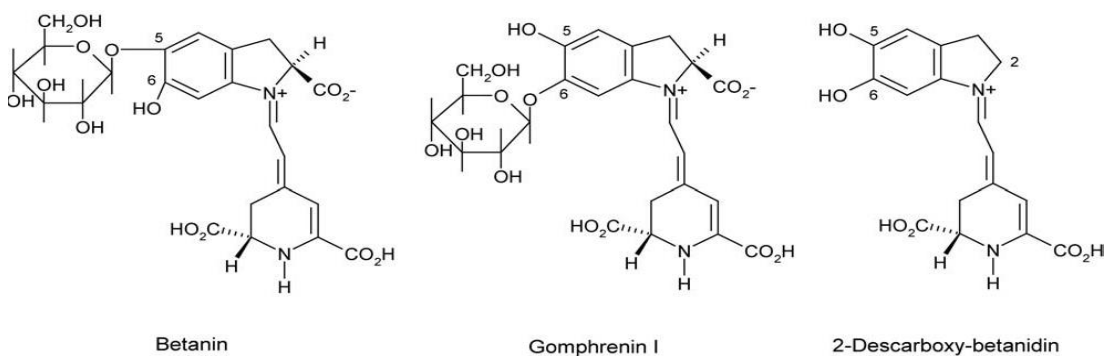
Gambar 2. Struktur kimia beberapa betasantin. (a) betanidin; (b) Isobetanidin (Zyrd dan Laurent, 2003).

Bentuk alami sederhana dari betasianin adalah *non-glycosylated betanidin* atau *isobetanidinchromophores* yang di dapatkan dari kondensasi antara cyclo-DOPA dengan betalamic acid. Bentuk betasianin lainnya dapat diperoleh dari

pengisomeran pada satu atau dua gugus *hydroxyl* bebas padacyclo-DOPA. Glikosilasi pada posisi ke-5 dinamakan dengan betanin dan merupakan pigmen merah pada tanaman *beet* yang penting (Gambar 2) (Zyrd dan Laurent, 2003).

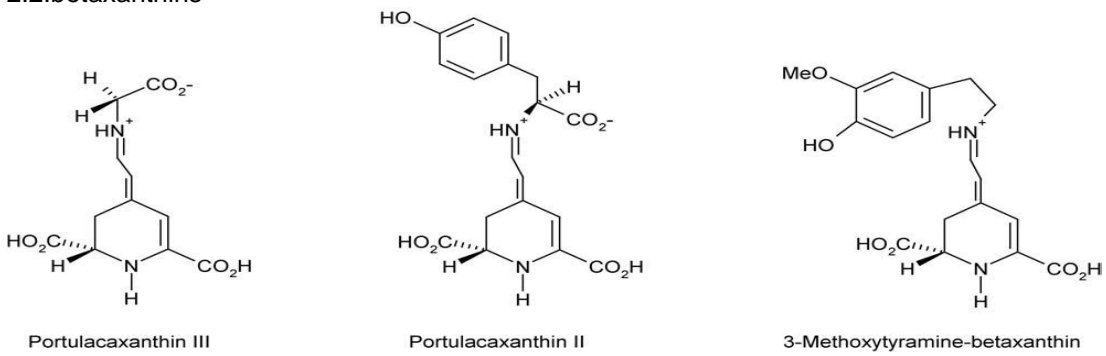


Gambar 3. Non-glycosidated kromofor betacyanin berbeda hanya oleh C15 pusat kiral (R = H).



Gambar 4. Perbandingan dari berbagai jenis glikosilasi. Betanidin 5-O-glukosida (betanin), betanidin 6-O-glukosida (gomphrenin I) dan non-glycosidated 2-decarboxy-betanin.

2.2. betaxanthins

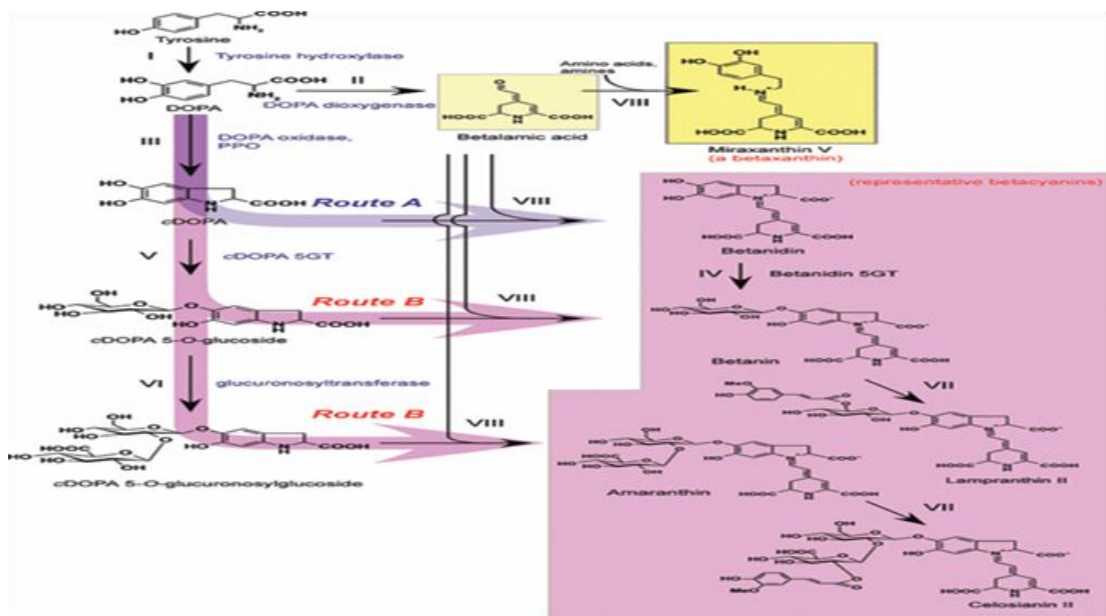


Gambar 5. Struktur kimia dari beberapa betaxanthins. Portulacaxanthin III (glycin-betaxanthin), Portulacaxanthin II [(S)-tirosin-betaxanthin] dan 3-methoxytyramine-betaxanthin (berasal dari dopamin- betaxanthin).

Dibandingkan dengan jalur biosintesis antosianin, jalur betalain agak sederhana, hanya membutuhkan beberapa langkah baik untuk betaxanthin atau sintesis betacyanin. Biosintesis (Gambar 2) diawali dengan perubahan tyrosin menjadi DOPA (*dihydroxyphenyl-alanine*) yang dikatalisis oleh enzim tyrosinase. Pembentukan betalamic acid dari DOPA membutuhkan pembelahan ekstradiol pada ikatan 4,5 yang dilakukan oleh DOPA dioxygenase.

Tahapan selanjutnya biosintesis betalain melibatkan pembentukan penghubung aldamine diantara betalamic acid dan *cyclo*-DOPA atau derivat asam amino untuk membentuk betasianin. (Grotewold, 2006). Kondensasi antara betalamic acid

dengan asam amino (seperti Ser, Val, Leu, Iso, and Phe) atau derivat asam amino seperti 3-methoxytyramine menghasilkan betasantin yang menunjukkan warna kuning-oranye (Moreno et al., 2008). Betalain pertama kali didapatkan tanaman red beet dengan betasianin (betanin) sebagai pigmen utama. Betanin telah diketahui tidak bersifat toksik (Free Patent Online, 2008). Betanin telah digunakan untuk mewarnai makanan, khususnya pada *ice cream* dan hidangan penutup tanpa mengubah rasa (Nottingham, 2004). Betalain telah diidentifikasi sebagai antioksidan alami yang memiliki efek positif terhadap kesehatan pada manusia, selain itu juga memperlihatkan aktivitas sebagai anti kanker (Georgiev et al., 2008).



Gambar 6. Jalur Biosintesis Pigmen Betalain (Bhuiyan et al., 2002).

APLIKASI KULTUR KALUS SEBAGAI PENGHASIL BETALAIN

a. Red beet (*Beta vulgaris*)

Red beet merupakan sumber utama dalam penghasil betalain dari bagian akar (beetroot). Akumulasi betasianin pada kultur jaringan pertama kali dilakukan pada *red beet*. Kombinasi auksin dan sitokinin yang berbeda dalam menginisiasi kalus akan menghasilkan kalus yang berbeda pada *red beet*. Kalus berwarna putih dan friabel dihasilkan dari

media MS dengan sitokinin (BAP) saja tanpa adanya auksin dan kalus berwarna hijau dan kompak dihasilkan dari media MS dengan penambahan auksin (NAA) dan sitokinin (BAP) (Gurel *et al.*, 2000). Sedangkan penggunaan kombinasi 2.4-D dan BAP dengan eksplan berasal dari hipokotil dan kotiledon menghasilkan kalus dengan variasi warna yang berbeda, yaitu hijau, kuning, orange, merah, dan violet (Gambar 7) (Girod and Zyard, 1991).



Gambar 7. Lima variasi fenotip warna kalus pada kultur red beet (Girod and Zyard, 1991).

Pada tanaman utuh kandungan betalain red beet sebesar 2.626 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW betasantin dan 21.187 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW betasianin. Pada kultur kalus kandungan betasantin tertinggi pada fenotip ungu sebesar 28.016 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW dan betasantin pada fenotip oranye sebesar 12.210 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW (Girod and Zyard, 1991). Menurut Leathers and Zryd (1992), betalain yang dihasilkan melalui kultur jaringan, produk terakhir dapat mengeliminasi keberadaan geosmin (aroma pada beetroot).

b. *Portulaca* sp.

Inisiasi kalus dengan eksplan batang pada *Portulaca grandiflora* menggunakan ZPT auksin berupa 2.4-D (0.25 ppm) dan sitokinin BA (1 ppm) menghasilkan kalus primer 2 macam yaitu violet dan putih (tidak berpigmen) (Trezza *et al.*, 1991). Sedangkan penggunaan ZPT

dengan auksin 2.4-D 5 ppm dan kinetin 0.2 ppm pada eksplan hipokotil menghasilkan kalus berwarna merah agak keunguan (Gambar 8) (Schroder and Bohm, 1984).

Portulaca grandiflora telah digunakan sebagai model tanaman untuk studi tentang biokimia dan genetik dari sintesis betalain. Kandungan betalain pada bagian petal terdiri atas vulgaxanthin I, portulacaxanthin III, dopaxanthin, portulacaxanthin II, miraxanthin V, dan betanin masing masing sebesar 1.20 mg g⁻¹ DW, 0.40 mg g⁻¹ DW, 2.70 mg g⁻¹ DW, 2.50 mg g⁻¹ DW, 2.60 mg g⁻¹ DW, dan 17.8 mg g⁻¹ DW (Trezza *et al.*, 1991). Sedangkan dengan kultur kalus *Portulaca* sp. „Jewel” pada medium MS kandungan total betasianin dan beta-santin masing-masing sebesar 4.80 mg g⁻¹ FW dan 0.50 mg g⁻¹ FW (Bhuiyan *et al.*, 2002).



Gambar 8 Pembuangaan dan Kalus Pada *Portulaca grandiflora* (Starck *et al.*, 2002).

c. *Gomphrena macrocephala* St.-Hil

Kalus pada media MS dengan eksplan daun dan node menggunakan kombinasi ZPT NAA dan BAP yang berbeda menunjukkan variasi yang berbeda baik dari tekstur dan warna. Warna yang ditunjukkan pada kalus mewakili keberadaan dari betalain secara kualitatif. Kalus dengan tekstur yang sangat friable dan warna merah pekat dihasilkan pada konsentrasi NAA dan BAP 1 dan 10 ppm pada kedua eksplan. Sedangkan pada kombinasi NAA 0.5 ppm dan BAP 1 ppm menunjukkan kalus dengan tekstur yang kompak dan warna merah agak muda. Pada kombinasi NAA 0.1 ppm BAP 10

ppm menghasilkan kalus dengan tekstur friabel dan berwarna merah (Vieira *et al.*, 1995).

d. *Mammillaria candida*

Mammillaria candida merupakan tanaman yang keberadaannya sangat besar di Meksiko termasuk dalam famili cactaceae yang mengandung betalain. Kalus yang dikulturkan pada media MS dengan 3 ppm 2.4-D, NAA, atau chlorophenoxyacetic acid secara tunggal maupun dikombinasikan dengan 0.1 ppm kinetin, kinetin riboside, atau BA menghasilkan 80% kalus yang terpigmentasi pada media yang mengandung auksin

saja, dan 50% pada media yang mengandung auksin dan sitokinin hal ini dikarenakan sitokinin memiliki efek yang antagonis terhadap pembentukan kalus

yang terpigmentasi (Santos-Diaz *et al.*, 2005).

KESIMPULAN

No.	Tanaman Penghasil Betalains	Eksplan	Media	Hasil
1.	Red beet (<i>Beta vulgaris</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ bagian akar (beetroot). ❖ hipokotil dan kotiledon ❖ Pada tanaman utuh 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Sitokinin (BAP) ✓ Auksin (kombinasi 2.4-D) dan BAP 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ berwarna hijau (Gurel <i>et al.</i>, 2000) ✓ hijau, kuning, orange, merah, dan violet (Girod and Zyard, 1991). ✓ 2.626 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW betasantin dan 21.187 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW betasianin, betasantin tertinggi pada fenotip ungu sebesar 28.016 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW dan betasantin pada fenotip oranye sebesar 12.210 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW (Girod and Zyard, 1991). Eathers and Zryd(1992)
	<i>Portulaca sp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Batang ❖ Hipokotil ❖ Petal 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ auksin berupa 2.4-D (0.25 ppm) dan sitokinin BA (1 ppm) ✓ auksin 2.4-D 5 ppm dan kinetin 0.2 ppm ✓ 1.20 mg g⁻¹DW, 0.40 mg g⁻¹ DW, 2.70 mg g⁻¹ DW, 2.50 mg g⁻¹ DW, 2.60 mg g⁻¹ DW, dan 17.8 mg g⁻¹ DW ✓ Medium MS 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 2 macam warna yaitu violet dan putih (tidak berpigmen) (Trezza dan Zryd, 1991). ✓ berwarna merah agak keunguan (Schroder and Bohm, 1984). ✓ vulgaxanthin I, portulacaxanthin III, dopaxanthin, portulacaxanthin II, miraxanthin V, dan betanin (Trezza dan Zryd, 1991). ✓ betasianin dan betasantin masing-masing sebesar 4.80 mg g⁻¹FW dan 0.50 mg g⁻¹FW (Bhuiyan <i>et al.</i>, 2002).
3.	<i>Gomphrena macrocephala</i>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Daun dan Node 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ NAA dan BAP 1 dan 10 ppm pada kedua eksplan. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ warna merah pekat ✓ warna merah agak muda

4. <i>Mammillaria candida</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ NAA 0.5 ppm dan BAP 1 ppm ✓ kombinasi NAA 0.1 ppm BAP 10 ppm ✓ MS dengan 3 ppm 2.4-D, NAA ✓ kombinasi 0.1 ppm kinetin 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ berwarna merah (Vieira <i>et al.</i>, 1995). ✓ 80% kalus yang terpigmentasi ada media yang mengandung auksin saja ✓ 50% pada media yang mengandung auksin dan sitokinin
--------------------------------------	--	---

2. a. Betalain memiliki beberapa fungsi antara lain pada polinasi dan promotor penyebaran biji oleh binatang berdasarkan ketertarikan terhadap warna. Selain itu betalain memiliki fungsi spesifik pada *ice plant* yaitu memberikan perlindungan terhadap bahaya efek sinar UV (Georgiev *et al.*, 2008).
- b. Betalain dan antosianin menunjukkan hampir adanya kesamaan terhadap warna yang tampak, namun berdasarkan struktur kimianya terdapat perbedaan antara betalain dengan antosianin. Pada betalain terdapat ikatan nitrogen, sedangkan pada antosianin tidak terdapat ikatan nitrogen. Pada suatu sel atau tanaman yang menghasilkan betalain maka sel atau tanaman tersebut tidak akan menghasilkan antosianin, hal ini disebabkan karena pada tanaman yang menghasilkan betalain kekurangan *enzyme anthocyanidin synthase* yang berperan dalam tahapan akhir pada jalur biosintesis antosianin (Georgiev *et al.*, 2008).
- c. Betalain lebih larut dengan air daripada antosianin dan kekuatan dalam mewarnai tiga kali lebih kuat daripada antosianin. Kestabilan pada pH 3 sampai 7 membuat betalain sesuai untuk diaplikasikan secara luas mewarnai makanan dengan tingkat keasaman rendah dan netral (Stintzing dan Carle, 2007).
- d. Pada betalain terdapat ikatan nitrogen, sedangkan pada anto-

sianin tidak terdapat ikatan nitrogen. Pada suatu sel atau tanaman yang menghasilkan betalain maka sel atau tanaman tersebut tidak akan menghasilkan antosianin, hal ini disebabkan karena pada tanaman yang menghasilkan betalain kekurangan *enzyme anthocyanidin synthase* yang berperan dalam tahapan akhir pada jalur biosintesis antosianin (Georgiev *et al.*, 2008).

DAFTAR PUSTAKA

- Bhuiyan, M. N., K. Murakami, and T. Adachi. 2002. Variation in betalain content and factor affecting the biosynthesis in *Portulaca* sp. „Jewel“ cell culture. *Plant Biotechnology*. Japan., **19** (5), 369-376.
- Georgiev V., M. Ilieva, and T. Bley. 2008. Betalain Production in Plant in vitro Systems. *Review of Acta Physiol Plant*. Krakow.
- Girod P. A. and J. P. Zyard. 1991. Secondary metabolism in cultured red beet (*Beta vulgaris* L.) cells: Differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Netherlands., **25**, 1-12.
- Grotewold, E. 2006. The Genetics and Biochemistry of Floral Pigments. *Annu. Rev. Plant Biol.* Ohio., **57**, 761-780.

- Gurel, S., Ekrem G., and Zeki K. 2000. Callus Development and Indirect Shoot Regeneration. from Seedling Explants of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Cultured In Vitro. *Turk J. Bot. Turkey.*, **25**, 25-33.
- Harivaindaran K. V., O. P. S. Rebecca and S. Chandran. 2008. Study of Optimal Temperature, pH and Stability of Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*) Peel for Use as Potential Natural Colorant. *Pakistan Journal of Biological Sciences. Malaysia.*, **11 (18)**, 2259-2263.
- Hos. 2008. In Vitro Developmental Pathways. <http://www.hos.ufl.edu/mooreweb/TissueCulture/January%2018/Development%202007.ppt>.
- Moreno, D. A., C. G. Viguera, J. I. Gil, and A. G. Izquierdo. 2008. Betalains in The Era of Global Agri-Food Science, Technology and Nutritional Health. *Phytochem Rev. Spain.*, **7**, 261–280.
- Mulabagal V., and H. S. Tsay. 2004. Plant Cell Cultures - An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites, *International Journal of Applied Science and Engineering. Taiwan.*, **1**, 29-48.
- Nottingham S. 2004. Beetroot. http://ourworld.compuserve.com/homepages/Stephen_Nottingham/beetroot.htm
- Santos-Díaz, M. S., Y. V. Garcia, and M. M. Gonzalez-Chavez. 2005. Pigment production by callus of *Mammillaria candida* Scheidweiler (Cactaceae). *Agrociencia. Mexico.*, **39**, 619–626.
- Schroder, W. and H. Bohm. 1984. Betacyanin Concentration in Young Cell Culture from *Portulaca grandiflora* an Analysis of Variation. *Plant Cell Report. German.*, **3**, 14-17.
- Slater, A., N. Scott., and M. Fowler. 2003. *Plant Biotechnology: The Genetic Manipulation of Plants*, Oxford University Press, Britanny.
- Stafford, A. and G. Warren. 1991. *Plant Cell and Tissue Culture*, John Willey and Sons. Chichester, England.
- Starck D., T. Vogt, and W. Schliemann. 2002. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry. Germany.* **62**, 247-269.
- Stintzing F. C. and R. Carle. 2007. Betalains – emerging prospects for food scientists. *Trends in Food Science & Technology. Germany.*, **18**, 514-525.
- Sudarmadji. 2003. Penggunaan Benzil Amino Purine Pada Pertumbuhan Kalus Kapas Secara In Vitro. *Buletin Teknik Pertanian.* **8**, 1.
- Trezzini G. F. and J. P. Zryd. 1991. Two Betalains From *Portulaca grandiflora*. *Phytochemistry. Switzerland.* **30**, 1897-1899.
- Vieira, C. C. J., M. R. Braga, and Ribeiro. 1995. Fructans in callus of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture.* Netherlands., **42**, 233-238,
- Wonganu, B. 2007. Callus Induction of Beet Root for Speed up Economical Plant Production. *The Journal of KMITNB. Thailand.*, **17 (2)**, 21-26.
- Zryd J. P. and L. Christinet. 2004. Betalains. In: Davies K (eds) *Plant pigments and their manipulation*. *Annu. Plant Rev. Oxford.*, **14**, 185-213.