

## INTISARI

### PRODUKSI FLAVONOID DAN HORMON ENDOGEN SERTA KORELASINYA DENGAN TINGKAT DIFERENSIASI PADA KULTUR KEPEL [*Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook. F. & Th.]

Noor Aini Habibah  
13/352840/SBI/114

Kepel mengandung zat aktif yang berpotensi sebagai obat dan deodoran oral. Salah satu senyawa bioaktif yang terdapat pada kepel adalah flavonoid yang berpotensi sebagai obat asam urat dan antioksidan. Produksi metabolit sekunder dapat dilakukan melalui teknik kultur jaringan. Pembentukan metabolit sekunder dipengaruhi antara lain oleh zat pengatur tumbuh dan tingkat diferensiasi jaringan. Pembentukan metabolit sekunder melalui kultur jaringan dapat ditingkatkan dengan penambahan prekursor dan immobilisasi. Naringenin adalah salah satu prekursor biosintesis flavonoid. Alginat merupakan salah satu media immobilisasi yang banyak digunakan dalam kultur *in vitro*. Gen *CHALCONE SYNTHASE* (*CHS*) merupakan salah satu gen kunci dalam biosintesis flavonoid. Penelitian ini mengkaji produksi flavonoid pada berbagai tingkatan diferensiasi jaringan dan pengaruh penambahan prekursor, dan immobilisasi sel kepel dalam alginat, serta produksi hormon endogen. Uji kualitatif kandungan flavonoid total dilakukan dengan KLT, dan uji kuantitatif menggunakan spektrofotometer. Jenis flavonoid yang muncul dideteksi dengan menggunakan HPLC. Pembuktian peningkatan produksi flavonoid dideteksi dengan mengkaji ekspresi gen *CHS*. Deteksi molekular ekspresi gen *CHS* dilakukan dengan isolasi RNA, pembuatan cDNA dan amplifikasi dengan *degenerate primer* (5'-AAGCCATYAAGGAATGGGG-3' dan 5'-AATGTRAGCCCDACCTTCACG-3'). Uji kandungan hormon endogen dilakukan menggunakan HPLC. Eksplan berupa biji muda, daun dan mesokarp ditanam pada medium MS padat dengan penambahan 2,4-D dan picloram untuk induksi kalus. Pemilihan eksplan yang digunakan berdasarkan pada pertumbuhan, kandungan flavonoid dan aktivitas antioksidan dari kalus yang dihasilkan dari eksplan tersebut. Kalus dipelihara dalam medium MS cair untuk mendapatkan suspensi sel. Penambahan prekursor naringenin (2, 4 dan 6 ppm) dan immobilisasi sel (alginat 1% dan 2%) diaplikasikan pada suspensi sel. Parameter yang diukur : tingkat diferensiasi sel, hormon endogen dan kandungan flavonoid. Hasil yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan ANOVA untuk mengetahui adanya perbedaan diikuti dengan DMRT untuk mengetahui letak perbedaan. Uji analisis korelasi juga dilakukan

untuk menentukan hubungan antara tingkat diferensiasi sel, hormon endogen dan kandungan flavonoid. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kalus dari mesokarp mempunyai laju tumbuh lebih rendah daripada kalus dari biji muda dan daun, tetapi mempunyai aktivitas antioksidan ( $31,26 \pm 2,74\%$ ) dan kandungan flavonoid ( $45,69 \pm 1,92\%$ ) yang lebih tinggi dari kedua kalus lainnya. Pertumbuhan kultur kalus mesokarp mencapai puncaknya pada minggu ke 10 sedangkan kandungan flavonoid mencapai puncaknya pada umur 8 minggu. Pada kultur suspensi sel, biomassa tertinggi diperoleh pada kultur 33 hari ( $4,92 \pm 0,22$  g), sedangkan kandungan flavonoid tertinggi diperoleh pada umur kultur 15 hari. Kandungan hormon IAA tertinggi diperoleh pada umur kultur 24 hari ( $13,10 \pm 1,16$   $\mu\text{g/g}$  berat basah sel), sedangkan zeatin tertinggi dihasilkan pada umur 6 hari ( $6,65 \pm 1,24$   $\mu\text{g/g}$  berat basah sel). Pada semua umur kultur suspensi sel, sel bentuk bulat dengan ukuran  $\leq 50\mu\text{m}$  jumlahnya sangat dominan. Uji korelasi menunjukkan bahwa ada korelasi antara kandungan flavonoid dan kandungan hormon. Immobilisasi menggunakan alginat 1% dan 2% meningkatkan produksi flavonoid. Immobilisasi dengan alginat 1% meningkatkan kandungan flavonoid sampai 89,27%, sedangkan immobilisasi 2% meningkatkan kandungan flavonoid 36,83 % lebih tinggi dari kandungan flavonoid sel tanpa perlakuan. Penambahan prekursor naringenin pada konsentrasi 4 ppm memberikan peningkatan kandungan flavonoid. Produksi flavonoid pada sel kepel dengan penambahan 4 mg/l prekursor naringenin meningkatkan 27,97% lebih tinggi bila dibandingkan dengan kontrol. Konsentrasi flavonoid pada kultur *in vitro* kepel lebih rendah daripada tumbuhan kepel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa naringenin, quercetin dan rutin terdeteksi pada kultur suspensi sel kepel, sedangkan pada kultur kalus hanya terdeteksi naringenin dan pada perlakuan penambahan prekursor naringenin hanya terdeteksi flavonoid quercetin. Pada biji muda dan daun tidak terdeteksi adanya naringenin, quercetin dan rutin, sedangkan pada mesokarp terdeteksi quercetin dan rutin. Terjadi peningkatan ekspresi gen *CHS* pada sel yang berkaitan dengan peningkatan produksi flavonoid.

Keywords : kepel, flavonoid, hormon endogen, diferensiasi, immobilisasi, gen *CHS*

## Flavonoids and Endogenous Hormone Production and their Correlation with the Degree of Differentiation in Kepek [*Stelechocarpus Burahol* (Bl.) Hook. F. & Th.] Culture

### ABSTRACT

*Stelechocarpus burahol* is a plant containing flavonoid compounds that have the potential for use as an anti-hyperuricemic for gout medication and antioxidant. Synthesis of bioactive compounds by *in vitro* culture are influenced by kind and concentrations of growth regulators and stages of tissue development. The production of secondary metabolites can be enhanced in various ways including cell immobilization and the addition of precursors. Naringenin is one of the precursors of flavonoids biosynthesis. Alginate is one of the immobilization media that is widely used in *in vitro* culture. The *CHALCONE SYNTHASE* gene is one of the key gene in flavonoid biosynthesis. This studies investigate the production of flavonoids and endogenous hormones at various degree of tissue differentiation, as well as the effect of precursors, and the kepek cell immobilisation in alginate. Qualitative assay for total flavonoid content was carried by TLC, whereas the quantitative assay using spectrophotometer. LC-MS used for detecting the types of flavonoids. Evidence of increased production of flavonoids was detected by examining *CHS* gene expression. Molecular detection of *CHS* gene expression was performed with RNA isolation, cDNA generation and amplification with primary degenerate (5'-AAGCCATYAAGGAATGGGG-3' and 5'-AATGTRAGCCCDACCTTCACG-3') with a 461 bp PCR product. Endogenous hormone content assay was accomplished using HPLC. The explants of young seeds, leaves and mesocarp were planted on solid MS medium supplemented with picloram and 2,4-D for callus induction. Explant selection based on callus growth, flavonoid content and antioxidant activity. Callus was then maintained in liquid MS medium to obtain a cell suspension. The addition of naringenin precursor (2, 4 and 6 ppm) and cell immobilisation (alginate 1% and 2%) was applied to the cell suspension. Parameters collected were: differentiation, endogenous hormones and flavonoid content. ANOVA were used to know the difference between treatment followed by DMRT to locate the difference. Correlation analysis was also performed to determine the relationship between the degree of differentiation, endogenous hormones and flavonoid content. The results showed that the callus of mesocarp had a lower growth rate than the callus from young seeds and leaves. However, it had the antioxidant activity ( $31.26 \pm 2.74\%$ ) and flavonoid content ( $45,69 \pm 1,92\%$ ) that were higher than the other calluses. The growth of callus culture peaked at week 10, whereas the flavonoid content peaked at week 8. In cell suspension cultures, the highest biomass was obtained after 33 days of culture ( $4.922 \pm 0.22$ ), while the highest flavonoid content obtained on 15<sup>th</sup> days culture. The highest

IAA hormone content was obtained on 24 days<sup>th</sup> of culture ( $13,10 \pm 1,16 \mu\text{g/g}$  cell fresh weight), while the highest zeatin was produced on 6 days<sup>th</sup> ( $6,65 \pm 1,24 \mu\text{g/g}$  cell fresh weight). Round cell shape (size  $\leq 50 \mu\text{m}$ ) were dominant in all ages of cell suspension cultures. Correlation test showed that there was a correlation between the flavonoid and hormone content. Immobilisation using alginate 1% and 2% increased the production of flavonoids 89.27% and 36.83% respectively higher than control. The addition of naringenin precursor at concentration of 4 ppm enhanced flavonoid content. The production of flavonoids in kepel cells with the addition of 4 mg/L naringenin precursor increased to 27.97% higher than controls. The result showed that the flavonoid concentration that produced in natural plant higher than that produced in *in vitro* culture. Naringenin, quercetin and rutin were detected in kepel suspension cell culture. Quercetin and rutin, but not naringenin, were detected in mesocarp. *CHS* gene expression increased associated with increased production of flavonoids.

Keywords: Kepel, flavonoids, endogenous hormones, differentiation, immobilisation, *CHS* gene