

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

DISERTASI



Oleh :

Noor Aini Habibah

13/352840/SBI/114

**FAKULTAS BIOLOGI
UNIVERSITAS GADJAH MADA
YOGYAKARTA
2017**

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

**Disertasi untuk memperoleh derajat Doktor dalam Ilmu Biologi
Pada Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada**

**Dipertahankan di hadapan Dewan Penguji
Program Pascasarjana Fakultas Biologi
Universitas Gadjah Mada
Pada tanggal : 25 Juli 2017**

Oleh :

**Noor Aini Habibah
13/352840/SBI/114**

**FAKULTAS BIOLOGI
UNIVERSITAS GADJAH MADA
YOGYAKARTA
2017**

Disertasi ini diterima sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh
gelar Doktor

18 AUG 2017
Tanggal :



Dr. Budi Setiadi Daryono, M.Agr.Sc **AC**
Dekan/Penanggungjawab Program Pascasarjana Fakultas Biologi
Universitas Gadjah Mada

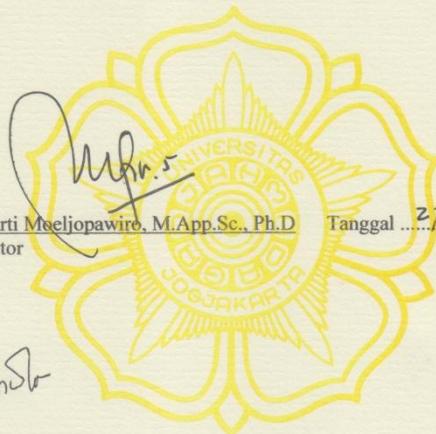
HALAMAN PENGESAHAN TIM PROMOTOR



Dr. rer-nat Ari Indrianto, SU
Promotor

Tanggal 27 JULI 2017

Prof. Sukarti Meeljopawiro, M.App.Sc., Ph.D
Ko-Promotor



Tanggal 27 JULI 2017

Dr. Kumala Dewi, M.Sc.St
Ko-Promotor

Tanggal 26 JUNI 2017

HALAMAN PENGESAHAN TIM PENGUJI DISERTASI

Naskah disertasi dengan identitas sebagai tertera di bawah ini telah diperbaiki dan disetujui oleh Tim Penguji Disertasi.

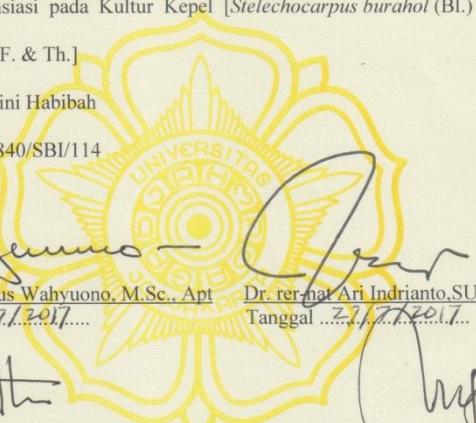
Judul : Produksi Flavonoid dan Hormon Endogen serta Korelasinya dengan Tingkat

Diferensiasi pada Kultur Kepel [*Stelechocarpus burahol* (Bl.)

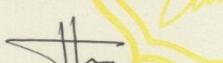
Hook. F. & Th.]

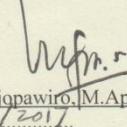
Nama : Noor Aini Habibah

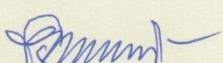
NIM : 13/352840/SBI/114

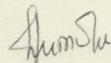

Prof. Dr. Subagus Wahyuono, M.Sc., Apt
Tanggal 27/7/2017

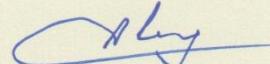
Dr. rer.nat Ari Indrianto, SU
Tanggal 27/7/2017


Prof. Dr. L. Hartanto Nugroho, M.Agr
Tanggal 27/7/2017


Prof. Sukarti Moeljopawiro, M.App.Sc., Ph.D
Tanggal 27/7/2017


Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc
Tanggal


Dr. Kumala Dewi, M.Sc.St
Tanggal 26/7/2017


Dr. Enni Suwarsi Rahayu, M.Si
Tanggal

PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN

Dengan ini Penulis menyatakan bahwa penelitian di dalam disertasi ini merupakan penelitian yang Penulis kerjakan dan bukan duplikasi dari penelitian orang lain. Sepanjang yang Penulis ketahui, materi penelitian ini belum pernah dipublikasikan oleh peneliti lain atau merupakan hasil penelitian orang lain, kecuali bahan referensi yang terdapat di dalam teks disertasi. Materi penelitian ini belum pernah dipakai sebagai bahan untuk memperoleh gelar pada universitas lain.

Yogyakarta, 27 Juli 2017



Noor Aini Habibah

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, barokah dan hidayah-Nya kepada penulis sehingga disertasi ini dapat diselesaikan. Disertasi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Studi Biologi Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Bagian dari disertasi ini telah dipublikasikan pada jurnal nasional terakreditasi Biosantifika dan *Pakistan Journal of Biological Sciences.*

Pelaksanaan penelitian dan penulisan disertasi ini dapat diselesaikan dengan dengan baik atas dukungan dan bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis menyampaikan rasa hormat dan terima kasih kepada:

1. Dr. rer-nat Ari Indrianto (Promotor), Prof. Sukarti Moeljopawiro, M.App.Sc, Ph.D (ko-promotor 1) dan Dr. Kumala Dewi, M.Sc.St (ko-promotor 2) yang telah memberikan dorongan, bimbingan dan arahan kepada penulis selama menyelesaikan studi program Doktor di PPS Biologi UGM.
2. Dr. Enni Suwarsi Rahayu. M.Si, Prof. Dr. Subagus Wahyuono, M.Sc. Apt, Prof. Dr. L. Hartanto Nugroho, M.Agr, dan Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc, selaku Tim Pengujii disertasi yang telah memberikan masukan yang berharga untuk penyempurnaan disertasi ini.

3. Rektor Universitas Negeri Semarang, Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang, dan Ketua Jurusan Biologi Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan ijin tugas belajar.
4. Rektor Universitas Gadjah Mada, Dekan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, dan Ketua Program studi S3 Universitas Gadjah Mada yang telah memberikan kesempatan penulis untuk dapat menempuh pendidikan Doktor pada Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada.
5. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi yang telah memberikan beasiswa BDN dan Hibah Doktor kepada penulis sehingga penulis dapat mengikuti dan menyelesaikan studi S3.
6. Kepala Laboratorium Bioteknologi Universitas Gadjah Mada, Kepala Laboratorium Biokimia Universitas Gadjah Mada, dan Kepala Falitma Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, beserta staf yang telah memberikan bantuan fasilitas dan peralatan penelitian.
7. Kepala Laboratorium Biologi Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan bantuan fasilitas dan peralatan penelitian. Penulis ucapkan terima kasih kepada Fitri Arum S, M.Si, Rohati, S.Si., dan Dra. Ni Luh Tirtasari atas bantuannya.
8. Dr. Widayat, ST., MT., UPT Laboratorium Terpadu, Universitas Diponegoro atas bantuannya dalam analisis hormon. Ibu Prapti, Laboratorium Struktur dan Perkembangan Tumbuhan Fakultas Biologi UGM atas bantuannya dalam pembuatan preparat, Febri Susanto, M.Si dan Desi Liana, S.Si terima kasih

- atas bantuannya selama penelitian. Pak Yusuf, Pak Hernowo, Pak Dodo dan mbak Manti, dan mbak Tyas terima kasih atas bantuannya.
9. Ayahanda Pudjiono M dan Ibunda Dalinem yang telah mendidik penulis dengan penuh kasih sayang, tulus ikhlas dan disiplin. Ibu Mertua Marwati terima kasih atas kasih sayang, pengertian dan bantuannya.
 10. Suamiku tercinta, Prof. Dr. Sutikno, ST., MT., terima kasih atas dorongan, pengertian, dan pengorbanannya. Untuk anak-anak tersayang, Muhammad Noordhien, dan Shafa Noor Aulia, pengorbanan kalian tiada bandingannya. Semua perjuangan ini untuk kalian.
 11. Saudaraku, Noor Syarifuddin, M.Eng., Dr. Noor Cholis B, Noor Laila H, S.Sos., Noor Syarifah S, SE., Noor Sari Fajarwati, SE., dan Noor Maelani A, ST. terima kasih atas dukungan dan doanya.
 12. Warga Desa 2013 : Dra. Rr. Upiek Ngesti WA, DAPE, M. Biomed, Dr. Alin Liana, S.Si., M.Sc., Dr. Retno Aryani, S.Si., M.Si., Dr. Meti Indrowati, S.Si., M.S., Dra. Steffanie Nurliana, M.S., M.M., Sulfianto A, S.Si., M.Sc., Ratna Stia D, S.Si., M.Sc., dan Dra. Endang AS, M.Si atas kebersamaan, persahabatan dan persaudaraan yang luar biasa.
 13. Teman-teman di Laboratorium Bioteknologi UGM : Dr. Yulita Nurcahyanti, S.Si., M.Si., Dr. Sumarmi, Dr. Mursyanti, Sulastri, M.Si., Sri Wahyuningsih, M.Si, Nintya, M.Si, Einstivina N, M.Si., mas Eka, mbak Latifah, dan semua anggota Laboratorium Bioteknologi UGM, terima kasih atas kebersamaan dan waktunya untuk berdiskusi.

14. Semua pihak yang telah membantu penelitian ini

Semoga penelitian ini dapat dimanfaatkan dan dikembangkan untuk perkembangan ilmu pengetahuan. Semoga Allah SWT melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada kita semua. *Amin Ya Robbal Alamin.*

Yogyakarta, 2017

Noor Aini Habibah

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN	vi
PRAKATA	vii
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN.....	xix
INTISARI	xxi
<i>ABSTRACT</i>	xxiii
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Permasalahan	5
C. Tujuan Penelitian.....	5
D. Manfaat Penelitian	6
E. Keaslian Penelitian	6
II. TINJAUAN PUSTAKA	8
A. Tinjauan Pustaka	8
1. Kepel	8
2. Flavonoid	12
3. Fitohormon	18
4. Induksi Kalus	25
5. Sintesis Senyawa Bioaktif Pada Kultur <i>in vitro</i>	28
6. Penambahan Prekursor dan Immobilisasi Sel	34
B. Landasan Teori	39
C. Hipotesis	42
III. METODE PENELITIAN	44
A. Bahan	45
B. Alat	46
C. Cara Kerja Penelitian	47
1. Penyiapan sampel	47
2. Penyiapan media.....	47
3. Sterilisasi permukaan eksplan	48
4. Induksi Kalus	49
5. Uji aktivitas antioksidan	50

6. Seleksi kalus	51
7. Kultur suspensi sel	51
8. Perlakuan penambahan prekursor naringenin	52
9. Perlakuan immobilisasi	52
10. Uji kandungan flavonoid total dan penentuan jenis flavonoid...	53
11. Uji kadar IAA dan Zeatin.....	54
12. Deteksi ekspresi gen penyandi CHS.....	55
D. Analisis Data	58
 IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	 59
A. Induksi Kalus	59
1. Eksplan Biji Muda	59
a.Waktu tumbuh kalus dan persentase eksplan yang berkalus..	59
b. Berat basah dan berat kering kalus	64
c. Morfologi kalus	65
d. Anatomi	67
e. Deteksi Flavonoid	69
f. Kandungan Flavonoid	70
2. Eksplan Daun	72
a.Waktu tumbuh kalus dan persentase eksplan yang berkalus..	72
b. Berat basah dan berat kering kalus.....	74
c. Morfologi kalus	76
d. Anatomi	78
e. Kandungan Flavonoid	79
3. Eksplan Mesokarp	81
a. Persentase eksplan yang berkalus, waktu induksi kalus, dan berat basah kalus	81
b. Morfologi kalus	84
c. Anatomi	84
d. Kandungan Flavonoid	85
B. Aktivitas Antioksidan	87
C. Kalus Terbaik untuk Penelitian Selanjutnya	89
D. Kurva Tumbuh Kalus	90
E. Kultur Suspensi Sel	93
1. Berat Basah dan Kering.....	93
2. Deteksi Flavonoid	94
3. Kandungan Flavonoid	95
4. Keragaman Bentuk Sel	96
F. Kandungan Hormon Endogen (IAA dan Zeatin).....	101
G. Korelasi antara Produksi Flavonoid, Diferensiasi dan Hormon ..	105
H. Peningkatan Kandungan Flavonoid	106
1. Immobilisasi Sel	107
2. Penambahan Prekursor	112

J. Jenis Flavonoid yang Dihasilkan	116
K. Ekspresi Gen <i>CHALCONE SYNTHASE</i>	123
BAB V PEMBAHASAN UMUM	126
BAB VI SIMPULAN DAN SARAN	138
RINGKASAN	140
SUMMARY.....	147
DAFTAR PUSTAKA	154
LAMPIRAN	172

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Penelitian pada kepel yang telah dilaporkan	7
Tabel 2. Penelitian <i>in vitro</i> pada famili Annonaceae	7
Tabel 3. Komposisi <i>cDNA synthesis mix</i>	56
Tabel 4. Campuran PCR untuk amplifikasi cDNA dengan primer gen <i>CHS</i> pada sel kepel	58
Tabel 5. Prosedur amplifikasi cDNA kepel dengan primer gen <i>CHS</i> .	58
Tabel 6. Efek perlakuan ZPT dan cahaya terhadap waktu tumbuh dan persentase eksplan biji muda kepel yang membentuk kalus	60
Tabel 7. Berat basah dan berat kering kalus hasil induksi kalus pada eksplan biji muda kepel dengan perlakuan ZPT dan pencahayaan pada umur 5 bulan	64
Tabel 8. Waktu tumbuh kalus dan persentase eksplan daun yang berkalus pada perlakuan ZPT dan cahaya	73
Tabel 9. Berat basah dan kering kalus umur 5 bulan dari eksplan daun kepel yang ditanam pada perlakuan ZPT dan cahaya ..	75
Tabel 10. Pengaruh picloram dan 2,4-D dalam medium MS pada persentase eksplan berkalus, waktu induks kalus dan berat basah kalus yang terbentuk dari eksplan mesokarp kepel	81
Tabel 11. Respon pertumbuhan biji muda, daun dan mesokarp kepel pada induksi kalus dengan perlakuan variasi ZPT dan kondisi pencahayaan	87
Tabel 12. Aktivitas antioksidan berbagai bagian tumbuhan kepel dan kalus dari berbagai eksplan	88
Tabel 13. Laju pertumbuhan, kandungan flavonoid dan aktivitas antioksidan kalus kepel dari 3 jenis eksplan	89
Tabel 14. Pertumbuhan kultur sel dari eksplan mesokarp kepel pada medium MS dengan penambahan 7,5 mg/L picloram	93
Tabel 15. Komposisi sel kepel dari eksplan mesokarp berdasarkan bentuk sel yang dipelihara pada medium MS dengan penambahan 7,5 mg/L picloram pada berbagai tingkatan umur	99
Tabel 16. Kandungan hormon endogen (IAA dan zeatin) pada kultur sel kepel pada berbagai tingkatan umur	103
Tabel 17. Berat basah, berat kering dan kandungan flavonoid sel kepel pada medium MS dengan penambahan 7,5 mg/L Picloram dengan perlakuan immobilisasi alginat pada umur 36 hari	109

Tabel 18.	Pertumbuhan dan kandungan flavonoid kultur suspensi sel kepel pada medium MS dengan penambahan 7,5 mg/L picloram dengan perlakuan penambahan prekursor naringenin pada kultur 36 hari	115
Tabel 19.	Deteksi dari 3 jenis flavonoid (naringenin, quercetin, dan rutin) pada beberapa bagian tumbuhan dan kultur <i>in vitro</i> kepel	120
Tabel 20.	Kandungan flavonoid pada beberapa bagian tumbuhan dan kultur <i>in vitro</i> kepel	136

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Tumbuhan kepel	9
Gambar 2. Bagian tanaman kepel	10
Gambar 3. Struktur daun kepel	10
Gambar 4. Struktur kimia 3, 7, 3',4'-tetrahidroxy-5- methyl-flavone .	12
Gambar 5. Struktur kelas utama flavonoid	13
Gambar 6. Jalur utama biosintesis flavonoid pada tanaman	14
Gambar 7. Mekanisme transport flavonoid di dalam sel tumbuhan	17
Gambar 8. Struktur 3 auksin alami	20
Gambar 9. Mekanisme pemanjangan sel yang diinduksi oleh auksin .	22
Gambar 10. Model hipotesis aktivasi gen oleh IAA	24
Gambar 11. Mekanisme pembentukan kalus	25
Gambar 12. Induksi pembelahan oleh auksin dan sitokinin	28
Gambar 13. Bagan Alir Penelitian	43
Gambar 14. Morfologi kalus dari eksplan biji muda kepel pada perlakuan ZPT dan dengan perlakuan gelap	66
Gambar 15. Morfologi kalus dari eksplan biji muda kepel pada perlakuan ZPT dan dengan perlakuan cahaya	66
Gambar 16. Anatomi kalus eksplan biji muda kepel	68
Gambar 17. Kromatogram untuk deteksi flavonoid pada kalus kepel eksplan biji muda	69
Gambar 18. Rerata kandungan flavonoid kalus eksplan biji muda kepel pada perlakuan ZPT dan pencahayaan	70
Gambar 19. Kalus yang muncul pertama kali pada eksplan daun kepel yang ditanam pada medium dengan penambahan picloram 7,5 mg/L	76
Gambar 20. Morfologi kalus daun kepel pada perlakuan ZPT dan dengan perlakuan gelap	77
Gambar 21. Morfologi kalus eksplan daun kepel pada perlakuan ZPT dan dengan perlakuan cahaya	77
Gambar 22. Anatomi kalus dari eksplan daun kepel	78
Gambar 23. Rerata kandungan flavonoid kalus dari eksplan daun kepel pada perlakuan ZPT dan pencahayaan	79
Gambar 24. Morfologi kalus dari eksplan mesokarp pada perlakuan ZPT	84
Gambar 25. Anatomi kalus dari eksplan mesokarp kepel yang dipelihara dalam medium MS	85
Gambar 26. Kandungan flavonoid kalus dari eksplan mesokarp kepel pada medium perlakuan	85

Gambar 27.	Berat kering kalus mesokarp pada medium dengan penambahan 7,5 mg/L picloram. Biomassa tertinggi tercapai pada minggu ke 10.....	91
Gambar 28.	Kandungan flavonoid kalus mesokarp pada medium dengan penambahan 7,5 mg/L picloram	91
Gambar 29.	Kromatogram KLT untuk deteksi flavonoid pada sel kepel	95
Gambar 30.	Kandungan flavonoid kultur sel kepel pada berbagai tingkatan umur	96
Gambar 31.	Viabilitas sel kepel pada kultur sel kepel yang dipelihara dalam medium MS cair dengan penambahan 7,5 mg/L picloram yang ditunjukkan dengan pewarnaan fluorescein diacetate (FDA)	97
Gambar 32.	Keragaman bentuk sel pada kultur suspensi kepel	98
Gambar 33.	Kromatogram senyawa standar	102
Gambar 34.	Kromatogram ekstrak kultur sel kepel umur 12 hari	102
Gambar 35.	Berat basah sel kepel pada medium MS dengan penambahan 7,5 mg/L Picloram dengan perlakuan immobilisasi alginat 1% dan 2 %.....	108
Gambar 36.	Berat kering sel kepel pada medium MS dengan penambahan 7,5 mg/L picloram dengan perlakuan immobilisasi alginat 1% dan 2 %.....	108
Gambar 37.	Kandungan flavonoid sel kepel pada medium MS dengan penambahan 7,5 mg/L picloram dengan perlakuan immobilisasi alginat 1% dan 2 %.....	109
Gambar 38.	Immobilisasi sel kepel pada alginat	112
Gambar 39.	Berat basah kultur suspensi sel kepel pada medium MS dengan penambahan7,5mg/L Picloram dengan perlakuan penambahan prekursor naringenin	113
Gambar 40.	Berat kering kultur suspensi sel kepel pada medium MS dengan penambahan7,5mg/L Picloram dengan perlakuan penambahan prekursor naringenin	114
Gambar 41.	Kandungan flavonoid kultur suspensi sel kepel pada medium MS dengan penambahan 7,5 mg/L picloram dengan perlakuan penambahan prekursor naringenin	114
Gambar 42.	Hasil HPLC senyawa standar	117
Gambar 43.	Hasil HPLC flavonoid bagian tumbuhan kepel.....	118
Gambar 44.	Hasil HPLC flavonoid kultur <i>in vitro</i> kepel.....	119
Gambar 45.	Hasil elektroforesis cDNA kepel	124

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1.	Cara kerja pembuatan preparat melintang anatomi kalus. 173
Lampiran 2.	Kurva standar perhitungan flavonoid 176
Lampiran 3.	Hasil uji Duncan aktivitas antioksidan 177
Lampiran 4.	Hasil uji korelasi 179

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

μg	: <i>microgram</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
ANS	: <i>Anthocyanidin synthase</i>
ANR	: <i>Anthocyanidin reductase</i>
ARF	: <i>Auxin Response Factor</i>
BAP	: <i>6-Benzylaminopurine</i>
cDNA	: <i>Complementary Deoxyribonucleic acids</i>
CDKA	: <i>A-type CDK</i>
C4H	: <i>Cinnamate-4-hydroxylase</i>
CHI	: <i>Chalcone isomerase</i>
CHS	: <i>Chalcone synthase</i>
CH ₃ SH	: <i>Methyl mercaptan</i>
4CL	: <i>4-coumarate-CoA ligase</i>
cm	: <i>centimeter</i>
4-Cl-IAA	: <i>Chloroindole-3 acetic acid</i>
2,4-D	: Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat
DFR	: <i>Dihydroflavonol-4-reductase</i>
DMRT	: <i>Duncan's Multiple Range Test</i>
dpl	: di atas permukaan laut
DPPH	: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
CYCD	: <i>D-type cyclins</i>
E2Fa	: <i>E2 Promoter Binding Factor</i>
EtOAc	: <i>Ethyl acetate</i>
FDA	: <i>Fluorescein diacetate</i>
F3H	: <i>Flavanone-3-hydroxylase</i>
F3'H	: <i>Flavonoid-30-hydroxylase</i>
F3'5'H	: <i>Flavonoid-3',5'-hydroxylase</i>
FLS	: <i>Flavonol synthase</i>
g	: gram
GF	: <i>Gel Filtration</i>
3GT	: 3-(<i>Glucosyl Transferase</i>),
GST	: <i>Glutathione S-transferase</i>
HPLC	: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IAA	: <i>Indole-3 Acetic Acid</i>
IBA	: <i>Indole-3butyric acid</i>
KLT	: Kromatografi Lapis Tipis
L	: liter
LBD	: <i>Lateral Organ Boundaries Domain</i>
LDOX	: <i>Leucoanthocyanidin Dioxidase</i>

MeOH	: Methanol
mg	: <i>milligram</i>
mg/kg b.w	: <i>milligram/kilogram body weight</i>
mL	: <i>milliliter</i>
MRP	: <i>Multidrug Resistance associated Proteins</i>
MS	: Murashige & Skoog
NH ₃	: <i>Nitrogen trihydride</i> (ammonia)
nm	: <i>nanometer</i>
PAL	: <i>Phenylalanine ammonia-lyase</i>
ppm	: <i>part permilion</i>
RNA	: <i>Ribonucleic acids</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
UFGT	: <i>Flavonoid Glucosyl Transgerse</i>
UV	: <i>Ultraviolet</i>
UV-Vis	: <i>Ultraviolet-visual</i>
ZPT	: Zat Pengatur Tumbuh

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'-AAGGCCATYAAGGAATGGGG-3' dan 5'-AATGTRAGCCCCACTTCACG-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 ($31,26\pm2,74\%$) dan kandungan flavonoid ($45,69\pm1,92\%$) 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 ($4,92\pm0,22$ g), sedangkan kandungan flavonoid tertinggi diperoleh pada umur kultur 15 hari. Kandungan hormon IAA tertinggi diperoleh pada umur kultur 24 hari ($13,10\pm1,16$ $\mu\text{g/g}$ berat basah sel), sedangkan zeatin tertinggi dihasilkan pada umur 6 hari ($6,65\pm1,24$ $\mu\text{g/g}$ berat basah sel). Pada semua umur kultur suspensi sel, sel bentuk bulat dengan ukuran $\leq50\mu\text{m}$ 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 Kepel [*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 kepel 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'-AAGGCCATYAAAGGAATGGGG-3' and 5'-AATGTRAGCCCDACTTCACG-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 ± 0.22), while the highest flavonoid content obtained on 15th days culture. The highest

IAA hormone content was obtained on 24 daysth of culture (13.10 ± 1.16 µg/g cell fresh weight), while the highest zeatin was produced on 6 daysth (6.65 ± 1.24 µg/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