

ABSTRAK

KAJIAN FITOKIMIA SERTA EVALUASI PENGARUH ELISITASI TERHADAP PRODUKSI METABOLIT SEKUNDER KULTUR AKAR *MORUS ALBA* VAR. *SHALUN* (MORACEAE)

Oleh

Rizki Fitriani

NIM: 30517004

(Program Studi Doktor Kimia)

Morus yang dikenal sebagai “mulberry” atau “murbei” adalah salah satu genus penting dari famili Moraceae, yang terdiri dari 16 spesies. Genus ini tumbuh di daerah beriklim sedang dan subtropis di Asia, Eropa, Afrika, Amerika Utara dan Selatan. Di beberapa negara seperti India, Cina, dan Indonesia tumbuhan *Morus* dibudidayakan untuk produksi daun yang digunakan sebagai pakan ulat sutera. Lain halnya di negara-negara Eropa, seperti Turki dan Yunani, tumbuhan *Morus* dibudidayakan untuk produksi buah. Di negara tersebut, buah dari tanaman ini diolah menjadi jus, pewarna alami, dan digunakan dalam industri kosmetik. Bagian dari tumbuhan *Morus alba*, seperti kulit akar, batang, daun, dan buah sudah digunakan dalam pengobatan tradisional Cina untuk mengobati diabetes, artritis, rematik, dan berbagai macam penyakit lainnya sejak ribuan tahun yang lalu. Karena mempunyai efek yang dapat menyembuhkan berbagai macam penyakit, banyak peneliti yang tertarik untuk mengkaji kandungan kimia dari tumbuhan *M. alba* dan spesies lainnya dari genus *Morus*. Kajian fitokimia menunjukkan bahwa genus *Morus* mengandung senyawa golongan fenolik, terutama flavonoid, stilbenoid, 2-arilbenzofuran, dan *adduct* Diels-Alder, maupun senyawa golongan non-fenolik, seperti terpenoid dan steroid. Beberapa metabolit sekunder tersebut menunjukkan bioaktivitas yang penting dan beragam, seperti sitotoksik, antioksidan, antimikrobial, antiinflamasi, antifungi dan antivirus. Eksplorasi senyawa bioaktif dari *Morus* secara konvensional dilakukan terhadap tumbuhan alaminya. Akan tetapi, pencarian senyawa bioaktif pun dapat dilakukan melalui pendekatan bioteknologi yang mutakhir, salah satunya melalui teknik kultur jaringan tumbuhan. Selain itu, penelusuran literatur memperlihatkan bahwa kultur jaringan *Morus* dapat memproduksi metabolit sekunder dalam kadar yang lebih tinggi ketika diberi perlakuan berupa penambahan elisitor.

Berdasarkan latar belakang di atas, maka tujuan penelitian ini adalah melakukan kajian fitokimia terhadap kultur akar *Morus alba* var. *shalun*, mengkaji sifat sitotoksik senyawa hasil isolasi terhadap sel murine leukemia P-388 serta mengungkap hubungan struktur dengan aktivitas sitotoksiknya, dan mengevaluasi pengaruh penambahan elisitor terhadap produksi metabolit sekunder pada kultur akar *M. alba* var. *shalun*.

Metode yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari dua tahap. Tahap pertama adalah kajian fitokimia terhadap kultur akar *M. alba* var. *shalun* yang meliputi mengembangkan kultur akar *M. alba* var. *shalun* dalam media cair MS (Murashige-Skoog) dengan penambahan hormon IBA 1 ppm yang dilanjutkan dengan isolasi metabolit sekunder dari media cair dan kultur akar *M. alba* var. *shalun*. Isolasi metabolit sekunder pada penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap pekerjaan, yang meliputi tahap ekstraksi, fraksinasi dan pemurnian senyawa dengan menggunakan berbagai teknik kromatografi. Struktur molekul senyawa hasil isolasi ditetapkan berdasarkan analisis data spektroskopi, yang meliputi spektroskopi NMR 1D (^1H and ^{13}C), NMR 2D (HSQC and HMBC) serta spektroskopi massa resolusi tinggi. Sementara itu, uji sitotoksik terhadap sel murine leukemia P-388 menggunakan metode MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida]. Tahap yang kedua adalah evaluasi pengaruh elisitasi terhadap produksi metabolit sekunder pada kultur akar *M. alba* var. *shalun*. Di tahap ini, kultur akar ditumbuhkan dalam media cair MS dengan penambahan elisitor sebagai kultur akar sampel dan kultur akar yang ditumbuhkan tanpa penambahan elisitor sebagai kultur akar kontrol. Kultur akar sampel dan kontrol selanjutnya diekstraksi menggunakan pelarut metanol untuk kemudian dianalisis dengan HPLC-MS.

Pada penelitian ini telah berhasil diisolasi sepuluh senyawa murni yang meliputi lima senyawa baru golongan *adduct* Diels-Alder yang diberi nama morushalunin (2), morushalunin A (1), morushalunin B (3), morushalunin C (4), dan morushalunin D (5), serta lima senyawa turunan fenolik lainnya yang telah dikenal, meliputi satu senyawa golongan stilbenoid, oksiresveratrol (6), satu senyawa golongan 2-arilbenzofuran, morasin M (7), serta tiga senyawa golongan *adduct* Diels-Alder yaitu sorocein A (8), mulberofuran T (9), dan mulberofuran K (10). Penemuan lima senyawa baru golongan *adduct* Diels-Alder merupakan data kimiawi yang penting pada genus *Morus*. Dengan ditemukannya lima senyawa *adduct* Diels-Alder baru serta lima senyawa turunan fenol lainnya menunjukkan bahwa kultur akar *M. alba* var. *shalun* memiliki kemampuan untuk memproduksi metabolit sekunder yang beragam bahkan dapat memproduksi metabolit sekunder yang belum pernah dilaporkan dari tumbuhan alaminya.

Sitotoksitas senyawa hasil isolasi terhadap sel murine leukemia P-388 memperlihatkan bahwa delapan senyawa golongan *adduct* Diels-Alder dikategorikan sangat aktif sitotoksik terhadap sel murine leukemia P-388 dengan nilai IC_{50} di bawah $2,0 \mu\text{g/mL}$. Senyawa oksiresveratrol (6) dan morasin M (7) yang berperan sebagai prekursor senyawa *adduct* Diels-Alder tersebut mempunyai nilai IC_{50} berturut-turut sebesar $3,3 \mu\text{g/mL}$ dan $2,0 \mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa *adduct* Diels-Alder hasil isolasi mempunyai aktivitas yang lebih baik dalam menghambat pertumbuhan sel murine leukemia P-388 dibandingkan dengan prekursornya. Kajian hubungan struktur dan aktivitas menunjukkan bahwa terdapatnya tambahan cincin metil sikloheksena sebagai hasil dari reaksi sikloadisi Diels-Alder, adanya gugus isoprenil, dan bertambahnya gugus hidroksil pada senyawa *adduct* Diels-Alder memberikan kontribusi yang sangat penting pada peningkatan sifat sitotoksik terhadap sel murine leukemia P-388.

Evaluasi pengaruh penambahan elisitor asam salisilat, CuCl_2 , dan metil jasmonat terhadap produksi metabolit sekunder pada kultur akar *M. alba* var. *shalun* yang telah dilakukan pada penelitian ini merupakan yang pertama kali dilaporkan. Di antara ketiga elisitor tersebut, elisitor yang paling efektif dalam meningkatkan produksi metabolit sekunder pada kultur akar *M. alba* var. *shalun* adalah asam salisilat karena dapat meningkatkan kadar produksi hampir seluruh senyawa bahkan mampu menginduksi pembentukan senyawa baru. Dengan demikian, hasil evaluasi tersebut membuktikan hipotesis bahwa penambahan elisitor terhadap kultur akar *M. alba* var. *shalun* dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder bahkan dapat menginduksi produksi metabolit sekunder lain yang tidak diproduksi oleh kultur akar *M. alba* var. *shalun* tanpa penambahan elisitor.

Kata kunci: kultur akar, *Morus*, *Morus alba* var. *shalun*, media cair, *adduct* Diels-Alder, sitotoksisitas, elisitasi.

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL STUDY AND EVALUATION OF ELICITATION EFFECT ON PRODUCTION OF SECONDARY METABOLITES OF MORUS ALBA VAR. SHALUN (MORACEAE) ROOT CULTURES

By

Rizki Fitriani

NIM: 30517004

(Doctoral Program in Chemistry)

Morus which is known as mulberry is an important genus of the family *Moraceae*. This genus is widely distributed in Asia, Europe, North and South America, and Africa. Some species of this genus have been widely cultivated in Asian countries, such as India, China and Indonesia for its leaves which serve as indispensable food for silkworms. However, in most European countries, including Turkey and Greece, mulberries are grown for fruit production. The fruits are used in juices, liquors, natural dyes, and in the cosmetics industry. In the traditional Chinese medicine, the root barks of *Morus alba* have been used for treatment of hepatitis, diabetes, arthritis, rheumatism and other disorders for thousands years. The remarkable effects and sufficient resource of mulberry trees have attracted a lot of researchers to investigate this plant and other species of *Morus*. Previous phytochemical investigation showed that *Morus* produced either phenolic compounds, mainly stilbenes, 2-arylbenzofurans, flavonoids, and Diels-Alder adducts, or non phenolic compounds, such as terpenoids and steroids. Some of these phenolic compounds exhibited important and various bioactivities, such as cytotoxicity, antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, antifungal, and antiviral. The source of biologically important secondary metabolites was conventionally obtained from the intact plants. However, recent development in biotechnological approach has shown the possibility of plant tissue cultures as an alternative supply for producing bioactive secondary metabolites. Moreover, the production of some secondary metabolites of *Morus* tissue cultures is reported in higher amount when treated by elicitors.

Based on these backgrounds, thus, the aim of this study was conducting a phytochemical study of *Morus alba* var. *shalun* root culture, examining the cytotoxic properties of the isolated compounds against P-388 murine leukemia cells as well as revealing the relationship between structure and cytotoxic activity, and evaluating the effect of elicitor addition on secondary metabolite production in *M. alba* var. *shalun* root culture.

The method used in this study consisted of two steps. The first step was a phytochemical study of *M. alba* var. *shalun* root cultures which included developing root culture of *M. alba* var. *shalun* in MS (Murashige-Skoog) liquid media supplemented with 1 ppm IBA followed by isolation of secondary metabolites from liquid media and *M. alba* var. *shalun* root cultures. Isolation of secondary metabolites involved several stages of work, including extraction, fractionation and purification of compounds using various chromatographic techniques. The structures of the isolated compound were determined based on spectroscopic data, which included 1D-NMR (^1H and ^{13}C), 2D-NMR (HSQC and HMBC), and high resolution mass spectra. The cytotoxic effect of the isolated compounds was evaluated against murine leukemia cell P-388 using MTT [3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] method. The second step was an evaluation of the elicitation effect on the production of secondary metabolites in the root cultures of *M. alba* var. *shalun*. At this step, the root cultures were developed in MS liquid media with the addition of elicitor as sample and the root cultures without addition of the elicitors were prepared as the control samples. The sample and control root cultures were extracted using methanol and analyzed by HPLC-MS.

In the phytochemical investigation, five new Diels-Alder type adducts have been isolated, trivially named as morushalunin (2), morushalunin A (1), morushalunin B (3), morushalunin C (4), and morushalunin D (5). These new compounds are identified together with five known phenolic compounds, including one stilbene derivative (oxyresveratrol (6)), one 2-arylbenzofuran derivative (moracin M (7)), and three Diels-Alder type adducts (sorocein A (8), mulberofuran T (9), and mulberofuran K (10)). The discovery of five new Diels-Alder type adducts is chemically important to the phytochemistry of *Morus*. The presence of five new compounds as well as five known ones showed that *M. alba* var. *shalun* root cultures has the ability to produce secondary metabolites with structural diversity, even produce secondary metabolites that have never been reported from natural plants.

The cytotoxicity of the isolated compounds against murine leukemia P-388 cells showed that the eight compounds of the Diels-Alder adduct were categorized as highly cytotoxic active against P-388 murine leukemia cells with IC_{50} values below 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Oxiresveratrol (6) and moracin M (7) which act as precursors of the Diels-Alder adduct possessed IC_{50} values of 3.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively. This shows that the isolated Diels-Alder adduct exhibited a better activity in inhibiting the growth of murine leukemia P-388 cells compared to its precursors. The study of structure-activity relationship showed that the addition of methyl cyclohexene ring as a result of Diels-Alder cycloaddition reaction, the presence of isoprenyl groups, and the increasing of the number of hydroxyl groups in the Diels-Alder adducts seemed to contribute significantly to the increase of cytotoxic properties of murine leukemia P-388 cells.

Evaluation of the elicitation effect using salicylic acid, CuCl₂, and methyl jasmonate elicitor on the production of secondary metabolites in M. alba var. shalun root culture is the first report. Among the three elicitors, the most effective elicitor in increasing secondary metabolites production in M. alba var. shalun root culture is salicylic acid because it can increase the level of production almost all compounds, even can induce the formation of new compounds. Thus, this result proved the hypothesis that the addition of elicitor to M. alba var. shalun root culture can increase the production of secondary metabolites and even induce the production of other secondary metabolites which are not produced by the control of the root cultures.

Keywords: root cultures, Morus, Morus alba var. shalun, liquid media, Diels-Alder type adduct, cytotoxicity, elicitation.