

ĐÁNH GIÁ SỰ TÍCH LŨY HOẠT CHẤT EURYCOMANONE TRONG RỄ CÂY MẬT NHÂN (*EURYCOMA LONGIFOLIA JACK*) NUÔI CẤY MÔ TRỒNG NGOÀI TỰ NHIÊN

Nhận bài:

01 – 03 – 2016

Chấp nhận đăng:

28 – 06 – 2016

<http://jshe.ued.udn.vn/>

Võ Châu Tuấn^a, Trần Quang Dân^b

Tóm tắt: Eurycomanone là một hợp chất chính trong nhóm quassinoid, có nhiều hoạt tính sinh học quý, và tích lũy với hàm lượng lớn trong rễ cây Mật nhân (*Eurycoma longifolia* Jack). Loài cây này đã được nghiên cứu nhân giống *in vitro* thành công với hệ số nhân rất cao; tuy nhiên, cần phải đánh giá sự tích lũy eurycomanone trong rễ cây *in vitro* khi trồng ở ngoài điều kiện tự nhiên. Trong bài báo này, sự tích lũy của eurycomanone trong mẫu rễ thu được từ cây nuôi cấy mô 1 năm và 1,5 năm tuổi được trồng ở hai địa điểm khác nhau đã được khảo sát. Kết quả cho thấy, hàm lượng eurycomanone tích lũy trong rễ cây cấy mô tăng theo thời gian trồng (từ 177,367 - 178,53 mg/g ở cây 1 năm tuổi lên 213,57 - 225,55 mg/g ở cây 1,5 năm tuổi); và không có sự khác biệt về hàm lượng tích lũy của hợp chất này ở cây cấy mô và cây hữu tính được trồng cùng một khoảng thời gian cũng như ở các địa điểm khác nhau.

Từ khóa: Mật nhân; eurycomanone; nuôi cấy mô; hợp chất thứ cấp; HPLC.

1. Giới thiệu

Cây Mật nhân (*Eurycoma longifolia* Jack) là cây dược liệu quý được biết đến nhiều ở một số quốc gia trong khu vực Đông Nam Á, bao gồm: Việt Nam, Malaysia, Indonesia [1, 2]. Ở Việt Nam, cây Mật nhân còn được biết đến với tên cây Bá bệnh, và chúng chỉ phân bố chủ yếu ở các vùng rừng núi tại một số tỉnh ở khu vực miền Trung - Tây Nguyên [3]. Trong y học cổ truyền, các bộ phận của loài cây này được sử dụng như là một vị thuốc dùng để chữa trị nhiều căn bệnh khác nhau như: sốt rét, xương khớp, lở loét, dạ dày [3]. Ngày nay, tác dụng và thành phần dược liệu của cây Mật nhân đã được nghiên cứu và công bố trong nhiều công trình khoa học [1, tr.4-6]. Trong số các hoạt chất quý của cây Mật nhân, eurycomanone là hoạt chất sinh học chính thuộc nhóm quassinoid, tích lũy với hàm lượng cao trong rễ, có vị đắng. Năm 1982, Darise và cộng sự đã lần đầu tiên sử dụng hỗn hợp các phương pháp phân tích

(NMR, MS, UV và IR) để xác định đặc tính cấu trúc của eurycomanone trong dịch chiết từ rễ cây [7]. Từ đó đến nay, nhiều công trình nghiên cứu về hoạt tính sinh học của eurycomanone chiết xuất từ cây Mật nhân trên động vật cũng đã được công bố [5, tr.8-10]. Bên cạnh đó, Hassan và cộng sự (2014) đã tiến hành xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cây Mật nhân và bước đầu đánh giá sự tích lũy của eurycomanone ở trong rễ cây 1 năm tuổi. Ngoài ra, eurycomanone còn được xem như là một thành phần dược tính chủ yếu của cây Mật nhân và thường được sử dụng như chất chuẩn để tiêu chuẩn hóa chất lượng các sản phẩm thương mại [11].

Để đáp ứng nhu cầu về nguồn dược liệu Mật nhân cho các mục đích khác nhau, việc ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào đã tạo ra nguồn cây giống có chất lượng tốt [12,14]. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cho thấy, việc tích lũy các hợp chất thứ cấp trong tế bào thực vật phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố khác nhau, như: thời gian, điều kiện trồng, chăm sóc,... [15, 16]. Chính vì vậy, khi trồng các cây giống nuôi cấy mô ngoài tự nhiên thì việc đánh giá sự tích lũy hoạt chất, để so sánh hiệu quả của nó với cây giống tự nhiên là rất quan trọng [17].

^a Trường Đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng

* Liên hệ tác giả

Võ Châu Tuấn

Email: vochautuan@gmail.com

Trong nghiên cứu này, chúng tôi bước đầu tiến hành đánh giá sự tích lũy hoạt chất eurycomanone trong rễ cây Mật nhân nuôi cấy mô và cây giống hữu tính (gieo từ hạt) ở các độ tuổi và địa điểm trồng khác nhau.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Cây Mật nhân nuôi cấy mô sau 3 tháng huấn luyện ở trong vườn ươm của phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học, trường Đại học Sư phạm – ĐHQĐN [18] đã được trồng tại 02 địa điểm khảo sát: (1) xã Hòa Bắc (huyện Hòa Vang - Đà Nẵng), tọa độ điểm trồng 16°7'32"B 107°57'18"E; và (2) xã Đại Lãnh (huyện Đại Lộc - Quảng Nam), tọa độ điểm trồng 15°52'35"B 107°56'6"E. Điều kiện sinh thái tại các điểm trồng và phương pháp trồng được mô tả bởi tác giả Lê Thị Thùy Trâm và cộng sự [19]. Tương tự, cây con sau khi nảy mầm 3 tháng tuổi cũng đã được trồng trên cùng một điều kiện để làm mẫu đối chứng tích về khả năng tích lũy eurycomanone.

2.2. Đánh giá hàm lượng eurycomanone trong rễ cây

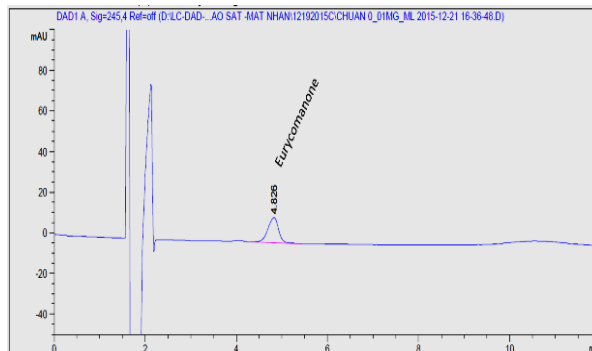
Hàm lượng eurycomanone trong rễ cây Mật nhân nuôi cấy mô trồng ở các địa điểm và độ tuổi khác nhau được xác định dựa trên phương pháp của Mohamad và cộng sự [20].

2.2.1. Chuẩn bị dịch chiết thô

Ở mỗi địa điểm trồng tương ứng ở mỗi độ tuổi (1,0 và 1,5 năm tuổi), mẫu rễ từ 20 cây nuôi cấy mô, cây hữu tính đã được thu thập và sấy khô ở 40°C đến khối lượng không đổi [21]. 100 g mẫu rễ khô của mỗi nghiệm thức được nghiền thành dạng bột mịn, sau đó ngâm trong 250 ml dung môi methanol 70%, và ủ trên máy lắc ở điều kiện 40°C, 8 giờ [8]. Quá trình ngâm ủ được tiếp tục lặp lại 2 lần với việc thay dung môi mới sau mỗi lần ủ và thu hồi dịch chiết đã ủ trước đó bằng cách lọc qua giấy lọc. Toàn bộ dịch sau 3 lần chiết được trộn đều và cô quay chân không ở điều kiện 40°C, áp suất 337 mbar [21] để loại bỏ hoàn toàn dung môi, sau đó hòa tan phần cặn trong 10 ml methanol tuyệt đối (Merck), lọc với màng lọc 0,45 µm và bảo quản ở điều kiện 4°C để sử dụng cho các phân tích tiếp theo. Cách lấy mẫu và quy trình tách chiết tương tự cũng được áp dụng cho mẫu rễ thu được từ các cây tự nhiên có độ tuổi > 5 năm được thu thập từ mỗi địa điểm trồng.

2.2.2. Xác định hàm lượng eurycomanone

Hàm lượng eurycomanone trong các mẫu dịch chiết được xác định bằng phương pháp sắc kí lỏng cao áp tại Trung tâm Kỹ thuật tiêu chuẩn đo lường chất lượng 2 (Quatest 2) thuộc Tổng cục Tiêu chuẩn theo protocol của Mohamad và cộng sự có sự điều chỉnh [14]. Cụ thể, cột C-18 (4.6 mm × 150 mm, 5 µm) (hãng Aligent-Mỹ) đã được sử dụng với vận tốc của pha động là 1,5 ml/phút, với hỗn hợp dung môi acetonitrile và 0,05% axit orthophosphoric (tỉ lệ thể tích tương ứng 24/76). Tín hiệu được xác định ở bước sóng 245 nm và thời gian chạy mẫu là 10 phút với thể tích mẫu là 10 µl [20]. Nồng độ của các mẫu thử được xác định dựa vào đường chuẩn được xây dựng bằng mẫu chuẩn eurycomanone (hãng Sigma – Đức) pha theo dãy nồng độ 0,01; 0,2, 0,4; 0,6; 0,8 mg/ml (Hình 1). Nồng độ eurycomanone được tính theo hàm lượng hoạt chất này trên khối lượng chất khô (mg/g).



Hình 1. Kết quả quét phổ chất chuẩn eurycomanone sau khi phân tích HPLC với dung dịch mẫu tiêm có nồng độ 0.01mg/ml, thời gian lưu là 4,826 phút.

2.3. Xử lý thống kê

Mỗi nghiệm thức đánh giá hàm lượng eurycomanone được lặp lại 03 lần. Các giá trị đặc trưng cho mẫu (Mean±SD) và sự sai khác có ý nghĩa giữa các giá trị hàm lượng trung bình của các nghiệm thức được xử lý theo phương pháp Duncan's test (p =0,05) bằng phần mềm SAS ver 9.1.

3. Kết quả và biện luận

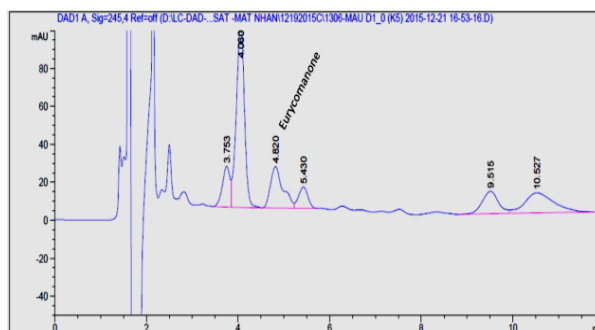
3.1. Sự tích lũy eurycomanone trong rễ cây Mật nhân trồng ở xã Hòa Bắc trồng ở các độ tuổi khác nhau

Hàm lượng các hoạt chất bên trong các sản phẩm được liệu là yếu tố quan trọng quyết định chất lượng sản

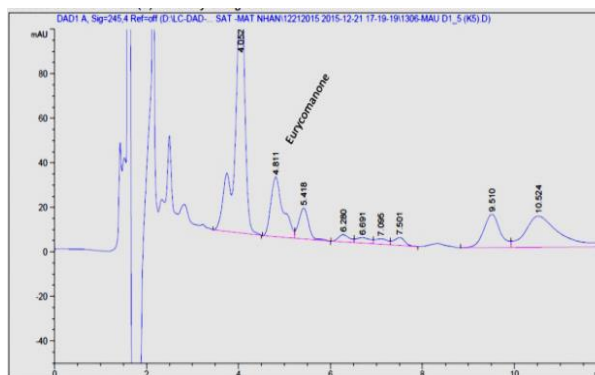
phẩm và hiệu quả của quy trình sản xuất [15, 22]. Sự tích lũy các hợp chất thứ cấp ở trong tế bào thực vật phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau, trong đó độ tuổi cây trồng có ảnh hưởng rất lớn. Sự tích lũy eurycomanone bên trong rễ của cây nuôi cấy mô và cây hữu tính trồng tại xã Hòa Bắc ở các mốc thời gian 1 năm và 1,5 năm tuổi đã được khảo sát.

Kết quả phân tích cho thấy, hàm lượng eurycomanone trong rễ cây Mật nhân 1,5 năm tuổi (213,57 mg/g) cao hơn đáng kể so với hàm lượng tích lũy chất này trong cây 1 năm tuổi (178,53 mg/g) (Bảng 1, Hình 2 - 3). Bên cạnh đó, hàm lượng eurycomanone trong rễ ở cây hữu tính 1 năm (184,03 mg/g) và 1,5 năm tuổi (223,56 mg/g) cũng cho kết quả tăng với các giá trị tương đương (Bảng 1). Hiện nay, chưa có công trình chính thức nào đánh giá về sự tích lũy eurycomanone trong rễ cây ở các độ tuổi sinh lý khác nhau; tuy nhiên, nhiều công trình khoa học nghiên cứu trên các đối tượng thực vật khác cũng cho thấy kết quả tương tự [23, 24]. Sự tăng giảm các nhóm hoạt chất tùy thuộc nhiều vào cơ chế chuyển hóa và sự thay đổi đặc tính sinh lý qua các giai đoạn của cây.

Ngoài ra, kết quả cũng cho thấy sự tích lũy hợp chất eurycomanone trong cây Mật nhân nuôi cấy mô và cây hữu tính là không có sự khác biệt đáng kể. Cụ thể, ở cây hữu tính hàm lượng hợp chất này tích lũy là 184,03 mg/g ở cây 1 năm và 223,56 mg/g ở cây 1,5 năm tuổi. Trong nghiên cứu đánh giá hàm lượng eurycomanone trong rễ cây Mật nhân *in vitro* 1 năm tuổi của tác giả Hassan và cộng sự cho thấy, hàm lượng chất tích lũy đạt 120,76 mg/g [25]. Ở kết quả mà chúng tôi thu được, hàm lượng eurycomanone trong rễ cây nuôi cấy mô 1 năm tuổi cao hơn đáng kể (178,53 mg/g) (Hình 2). Điều này cho thấy, khả năng tích lũy eurycomanone trong rễ cây được trồng trong điều kiện tự nhiên, tại các vùng khảo sát cao hơn cây trồng trong chậu ở điều kiện vườn ươm. Kết quả này cũng đã được tìm thấy ở nhiều hợp chất và loại nhiều đối tượng cây dược liệu nuôi cấy mô khác nhau, do sự tích lũy các hợp chất chịu tác động rất lớn từ các điều kiện môi trường sống [15, 16].



Hình 2. Kết quả quét phổ dịch chiết từ rễ cây Mật nhân nuôi cấy mô 1 năm tuổi trồng ở xã Hòa Bắc sau khi phân tích HPLC với thời gian lưu là 4,820 phút

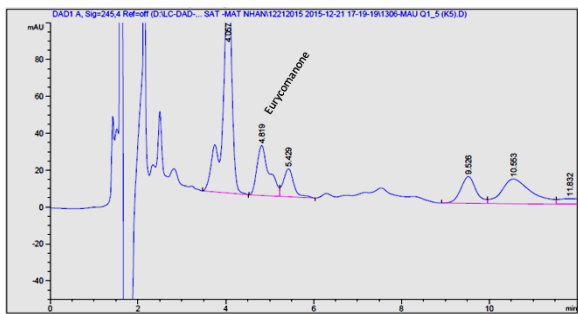


Hình 3. Kết quả quét phổ dịch chiết từ rễ cây Mật nhân nuôi cấy mô 1,5 năm tuổi trồng ở xã Hòa Bắc sau khi phân tích HPLC với thời gian lưu là 4,811 phút

3.2. Sự tích lũy eurycomanone trong rễ cây Mật nhân trồng ở xã Đại Lãnh

Xã Đại Lãnh, huyện Đại Lộc - Quảng Nam là một địa điểm đã được chọn để trồng cây Mật nhân nuôi cấy mô và cây hữu tính nhằm đánh giá sự tích lũy các hoạt chất trong rễ cây.

Kết quả phân tích cho thấy, hàm lượng eurycomanone trong rễ cây nuôi cấy mô và cây hữu tính tăng đáng kể theo thời gian trồng. Ở cây nuôi cấy mô, hàm lượng eurycomanone tăng từ 177,36 mg/g ở cây 1 năm tuổi lên 215,53 mg/g ở cây 1,5 năm tuổi (Bảng 1, Hình 4). Trong khi đó, hàm lượng chất này trong cây tự nhiên tăng từ 180,53 mg/g ở cây 1 năm tuổi lên 225,55 mg/g (Bảng 1). Ngoài ra, khi so sánh hàm lượng eurycomanone trong rễ giữa cây nuôi cấy mô và cây hữu tính 1 năm tuổi hoặc 1,5 năm tuổi cho thấy, không có sự khác biệt về hàm lượng chất này ở trong các mẫu phân tích. Kết quả này cũng tương tự như kết quả đánh giá cây Mật nhân trồng ở xã Hòa Bắc.

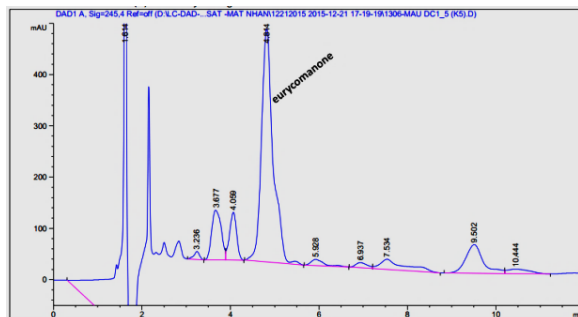


Hình 4. Kết quả quét phổ dịch chiết từ rễ cây Mật nhân nuôi cấy mô 1,5 năm tuổi trồng ở xã Đại Lãnh sau khi phân tích HPLC với thời gian lưu là 4,819 phút

3.3. So sánh sự tích lũy eurycomanone trong rễ cây Mật nhân

Các điều kiện sinh thái, canh tác và trồng trọt có ảnh hưởng quan trọng đến sự tích lũy các hợp chất thứ cấp ở trong tế bào thực vật [22]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành so sánh sự tích lũy eurycomanone ở hai địa điểm trồng khác nhau, xã Hòa Bắc và xã Đại Lãnh, nhằm tìm ra điều kiện môi trường thích hợp cho việc trồng quy mô sản xuất các hợp chất trong rễ cây Mật nhân.

Kết quả thu được cho thấy, hàm lượng eurycomanone tích lũy trong rễ cây Mật nhân ở hai địa điểm vào các khoảng thời gian trồng tương ứng là tương đương nhau. Mẫu rễ cây cấy mô thu từ các cây trồng tại xã Hòa Bắc tích lũy hàm lượng từ 178,53 mg/g đến 213,57 mg/g, trong khi đó, mẫu rễ ở xã Đại Lãnh tích lũy từ 177,36 mg/g đến 215,53 mg/g (Bảng 1).



Hình 5. Kết quả quét phổ dịch chiết từ rễ cây Mật nhân tự nhiên 5 năm tuổi trồng ở xã Hòa Bắc sau khi phân tích HPLC với thời gian lưu là 4,814 phút

Xã Hòa Bắc và xã Đại Lãnh là hai địa điểm thuộc khu vực miền núi của TP Đà Nẵng và tỉnh Quảng Nam. Bên cạnh sự khác biệt một số yếu tố về khí hậu, thổ nhưỡng, thì vẫn có một số điểm tương đồng về các điều

kiện sinh thái ở hai khu vực này. Ngoài ra, trong khoảng thời gian tiến hành trồng khảo sát, chúng tôi nhận thấy các điều kiện khí hậu ở hai vùng là ít khác biệt (Trung tâm Khí tượng thủy văn Trung Bộ, 2012-2014). Có thể chính các yếu tố này đã dẫn đến sự tương đồng về tích lũy eurycomanone trong cây Mật nhân trồng ở hai địa điểm này.

Bên cạnh việc so sánh sự tích lũy hoạt chất ở các địa điểm trồng khác nhau, sự tích lũy eurycomanone trong rễ cây Mật nhân từ 1 – 1,5 năm tuổi với rễ cây tự nhiên > 5 năm (đây là độ tuổi có thể khai thác làm dược liệu) đã được so sánh, nhằm đánh giá mức độ tích lũy trong rễ cây nuôi cấy này so với cây dược liệu thương phẩm. Kết quả cho thấy, hàm lượng hoạt chất tích lũy trong cây tự nhiên đạt từ 1.833,77 mg/g (ở xã Hòa Bắc) (Hình 5) đến 1.838,08 mg/g (ở xã Đại Lãnh). Như vậy, cây Mật nhân nuôi cấy mô 1,5 năm tuổi trồng ở hai địa điểm đạt từ 11,62 - 11,69%. Hàm lượng này sẽ tích lũy tăng dần theo thời gian.

Bảng 1. Sự tích lũy hàm lượng eurycomanone trong rễ cây Mật nhân

Địa điểm trồng	Mẫu	Sự tích lũy eurycomanone (mg/g)		
		1 năm	1,5 năm	> 5 năm
Xã Hòa Bắc	CM	178,53 ^a	213,57 ^b	
	HT	184,03 ^a	223,56 ^b	1.833,77 ^c
Xã Đại Lãnh	CM	177,36 ^a	215,53 ^b	
	HT	180,53 ^a	225,55 ^b	1.838,08 ^c

Chú thích: Các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa nhỏ nhất của các giá trị trung bình theo Duncan's test (p<0.05). CM: cây cấy mô, HT: cây hữu tính.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng eurycomanone tích lũy trong rễ cây nuôi cấy mô và cây hữu tính ở các độ tuổi (1 và 1,5 năm tuổi) là khác nhau và tăng dần theo thời gian. Ngoài ra, điều kiện môi trường trồng tại hai địa điểm khảo nghiệm (xã Hòa Bắc và xã Đại Lãnh) có ảnh hưởng tương tự nhau lên sự tích lũy eurycomanone trong rễ cây Mật nhân. Bên cạnh đó, sự tích lũy eurycomanone trong cây nuôi cấy mô từ 1 - 1,5 năm tuổi cũng đã đạt hàm lượng xấp xỉ 11,62% so với cây dược liệu thu làm thương phẩm.

Tài liệu tham khảo

- [1] Bhat R, Karim A (2010), Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia* Jack): a review on its ethnobotany and pharmacological importance, *Fitoterapia*, 81(7), 669-679.
- [2] Farouk A-E, Benafri A (2007), Antibacterial activity of *Eurycoma longifolia* Jack. A Malaysian medicinal plant, *Saudi medical journal*, 28(9), 1422-1424.
- [3] Đỗ Tất Lợi (2013), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Hồng Đức, 884.
- [4] Le Tran Q, Tezuka Y, Ueda J-y, Nguyen NT, Maruyama Y, Begum K, Kim H-S, Wataya Y, Tran QK, Kadota S (2003), In vitro antiplasmodial activity of antimalarial medicinal plants used in Vietnamese traditional medicine, *Journal of Ethnopharmacology*, 86(2), 249-252.
- [5] Ang HH, Hitotsuyanagi Y, Fukaya H, Takeya K (2002), Quassinoids from *Eurycoma longifolia*, *Phytochemistry*, 59(8), 833-837.
- [6] Low B.S, Ng B.H, Choy W.P, Yuen K.H, Chan K.L (2005), Bioavailability and pharmacokinetic studies of eurycomanone from *Eurycoma longifolia*. *Planta medica*, 71(9), 803-807.
- [7] Darise M, Kohda H, Mizutani K, Tanaka O (1982), Eurycomanone and eurycomanol, quassinoids from the roots of *Eurycoma longifolia*. *Phytochemistry*, 21(8), 2091-2093.
- [8] Hajjouli S, Chateaubieux S, Teiten M-H, Orlikova B, Schumacher M, Dicato M, Choo C-Y, Diederich M (2014), Eurycomanone and eurycomanol from *Eurycoma longifolia* Jack as regulators of signaling pathways involved in proliferation, cell death and inflammation, *Molecules*, 19(9), 14649-14666.
- [9] Pan Y, Tiong KH, Abd-Rashid BA, Ismail Z, Ismail R, Mak JW, Ong CE (2014), Effect of eurycomanone on cytochrome P450 isoforms CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 and CYP3A4 in vitro, *Journal of natural medicines*, 68(2), 402-406.
- [10] Khari N, Aisha AF, Ismail Z (2014), Reverse phase high performance liquid chromatography for the quantification of eurycomanone in *Eurycoma longifolia* Jack (*Simaroubaceae*) extracts and their commercial products, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(5), 801-807.
- [11] Chan K.L, Choo C.Y, Abdullah NR, Ismail Z (2004), Antiplasmodial studies of *Eurycoma longifolia* Jack using the lactate dehydrogenase assay of *Plasmodium falciparum*, *Journal of ethnopharmacology*, 92(2), 223-227.
- [12] Thorpe T.A. (1981), *Plant tissue culture. Methods and applications in agriculture*, Academic Press Inc.
- [13] Dwivedi P (2004), *Plant tissue culture*, Scientific Publishers (India).
- [14] Negi D, Saxena S (2011), *Plant tissue culture*. In *Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 47, 604-610.
- [15] Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001), Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant science*, 161(5), 839-851.
- [16] Gershenzon J (1984), Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress in phytochemical adaptations to stress, *Springer*, 273-320.
- [17] Matkowski A (2008), Plant in vitro culture for the production of antioxidants—a review, *Biotechnology advances*, 26(6), 548-560.
- [18] Võ Châu Tuấn, Trần Quang Dân (2012), Nghiên cứu khả năng tái sinh in vitro cây mật nhân (*Eurycoma longifolia* Jack.). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Đà Nẵng*, 12(61), 126-130.
- [19] Lê Thị Thùy Trâm (2015), Nghiên cứu hiện trạng phân bố và kỹ thuật nhân giống cây mật nhân (*Eurycoma longifolia* Jack) tại Đà Nẵng, *Đại học Đà Nẵng*.
- [20] Mohamad M, Ali MW, Ripin A, Ahmad A (2013), Effect of extraction process parameters on the yield of bioactive compounds from the roots of *Eurycoma longifolia*. *Jurnal Teknologi*, 60(1), 51-57.
- [21] Faisal G, Zakaria S, Najmuldeen G (2015), In vitro antibacterial activity of *Eurycoma longifolia* Jack (tongkat ali) root extract, *The International Medical Journal of Malaysia*, 14(1), 77-81.
- [22] Rao S.R., Ravishankar G (2002), Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 20(2), 101-153.
- [23] Collin H (2001), Secondary product formation in plant tissue cultures, *Plant Growth Regulation*, 34(1), 119-134.
- [24] Vasconsuelo A, Boland R (2007), Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants, *Plant Science*, 172(5), 861-875.
- [25] Hassan N.H., Abdullah R., Kiong L.S., Ahmad A.R., Abdullah N., Zainudin F., Ismail H., Rahman S.A. (2014), Micropropagation and production of eurycomanone, 9-methoxycanthin-6-one and canthin-6-one in roots of *Eurycoma longifolia* plantlets. *African Journal of Biotechnology*, 11(26), 6818-6825.

DETERMINING THE ACCUMULATION OF EURYCOMANONE IN THE ROOT OF *IN VITRO* EURYCOMA LONGIFOLIA JACK PLANT GROWING IN THE WILD

Abstract: Eurycomanone, a key compound in the quassinoid group, is rich in precious bioactivity highly accumulated in the roots of the *Eurycoma longifolia* Jack plant. There has been successful research into the *in vitro* multiplication of this plant species with a very high coefficient; however, it is necessary to determine the accumulation of eurycomanone in the root of the *in vitro* plants growing in the wild. This paper presents an investigation into the accumulation of the eurycomanone compound in the root samples of the *in vitro* plants aging from 1,0 to 1,5 years grown in two different areas. The results showed that eurycomanone accumulation in the roots of the *in vitro* plants increased over time (from 177,367 - 178,53 µg/g in one-year-old plants up to 213,57 - 225,55 µg/g in plants aged 1,5 years old), and there was no significant difference in the accumulation of this compound between the *in vitro* plants and seedlings grown in the same period in two different places.

Key words: *Eurycoma longifolia* Jack; eurycomanone; tissue culture; secondary compounds; HPLC.