



# METABOLOMIC

**Rima Erviana**

9 Oktober 2023

# Senyawa aktif kunyit

Beberapa senyawa yang terkandung pada Minyak Atsiri Dari Kunyit  
(Sumber : Ibáñez, M. D., & Blázquez, M. A. 2021).



Rhizome's essential oil

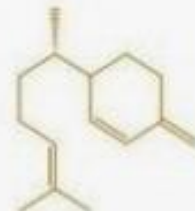
## Sesquiterpene Hydrocarbons



ar-Curcumene

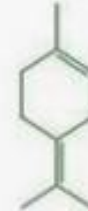


$\alpha$ -Zingiberene



$\beta$ -Sesquiphellandrene

## Monoterpene Hydrocarbons



Terpinolene



$\alpha$ -Phellandrene

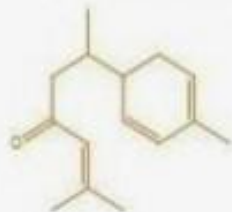


p-Cymene

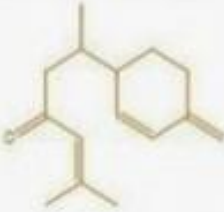
## Oxygenated Sesquiterpenes



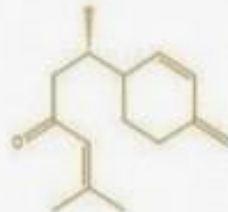
ar-Turmerone



$\alpha$ -Turmerone



$\beta$ -Turmerone



Curione



Leaf's essential oil

## Oxygenated Monoterpene



1,8-Cineole

# Banyak senyawa dalam satu tanaman

- untuk menjamin kualitas obat herbal evaluasi terhadap satu atau dua indikator senyawa saja tidaklah cukup → aktivitas obat berasal dari efek sinergis semua senyawa
- Kontrol kualitas dengan pendekatan metabolomic dan analisis statistika multivariat (kemometrik) memungkinkan evaluasi produk herbal dengan melihat variasi profil metabolit.

# Plant Metabolomic

- Adalah Analisis kualitatif dan kuantitatif, elusidasi metabolit tanaman dalam kondisi tertentu
- Metabolit merupakan produk selular dari proses kimia yang bisa dipengaruhi oleh system biologi (genetic dan lingkungan)

# Metabolomic

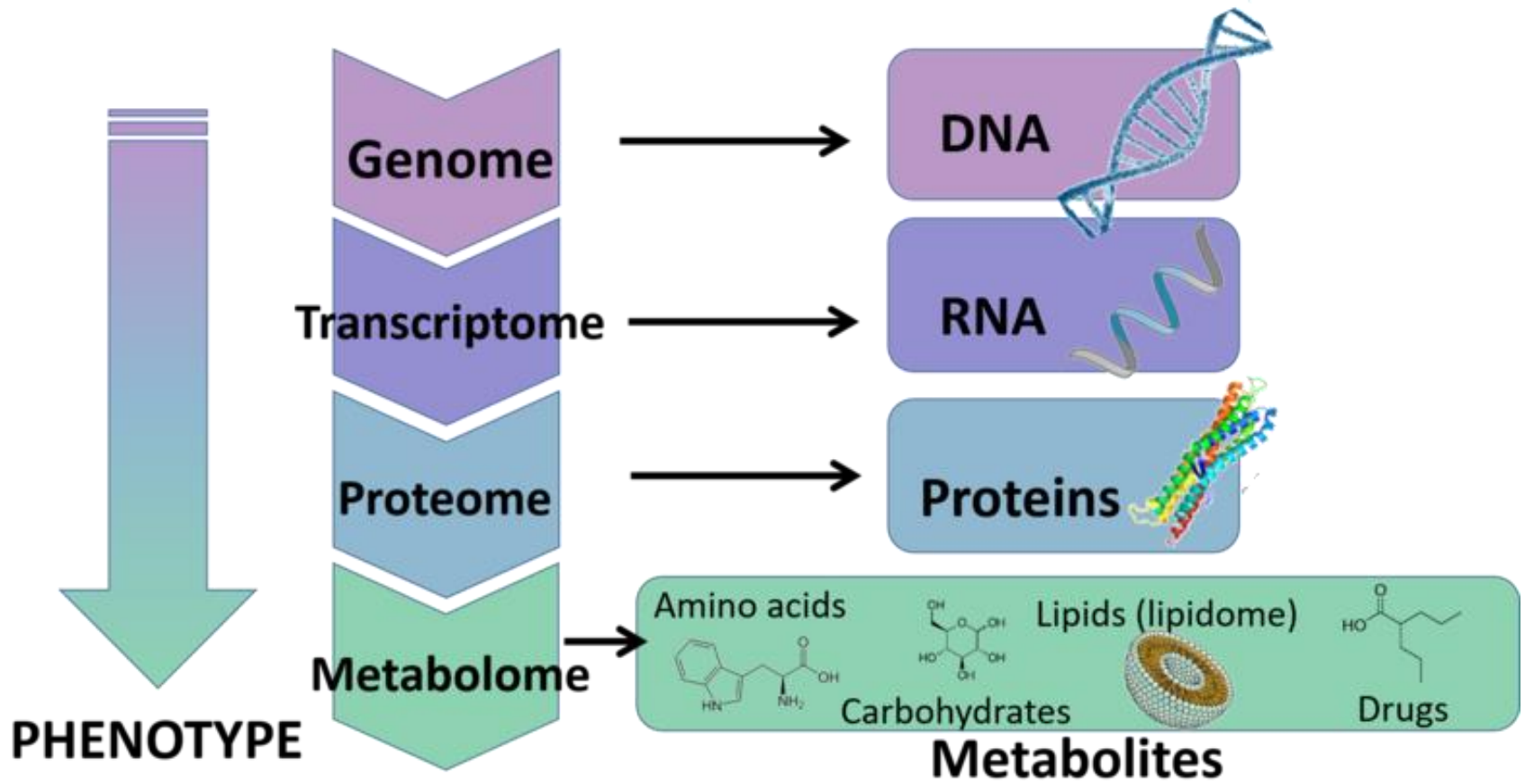
- Metabolomik: High throughput analysis
- Studi secara sistematis tentang profil senyawa kimia yang dihasilkan oleh suatu proses reaksi dalam organisme tertentu
- Studi yang mempelajari profil metabolit yang berupa senyawa dengan ukuran kecil (BM: 100-1000).
- Ilmu yang mempelajari senyawa kimia (metabolit) dalam sel, jaringan, atau organisme

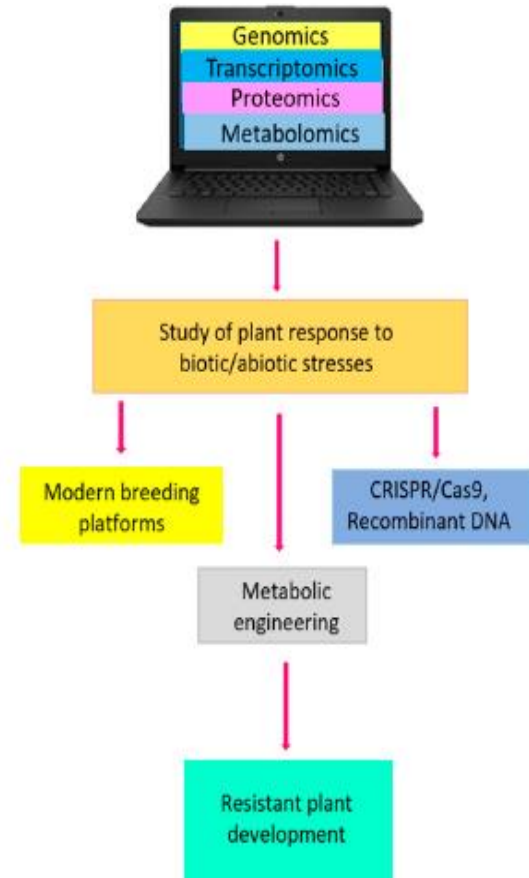
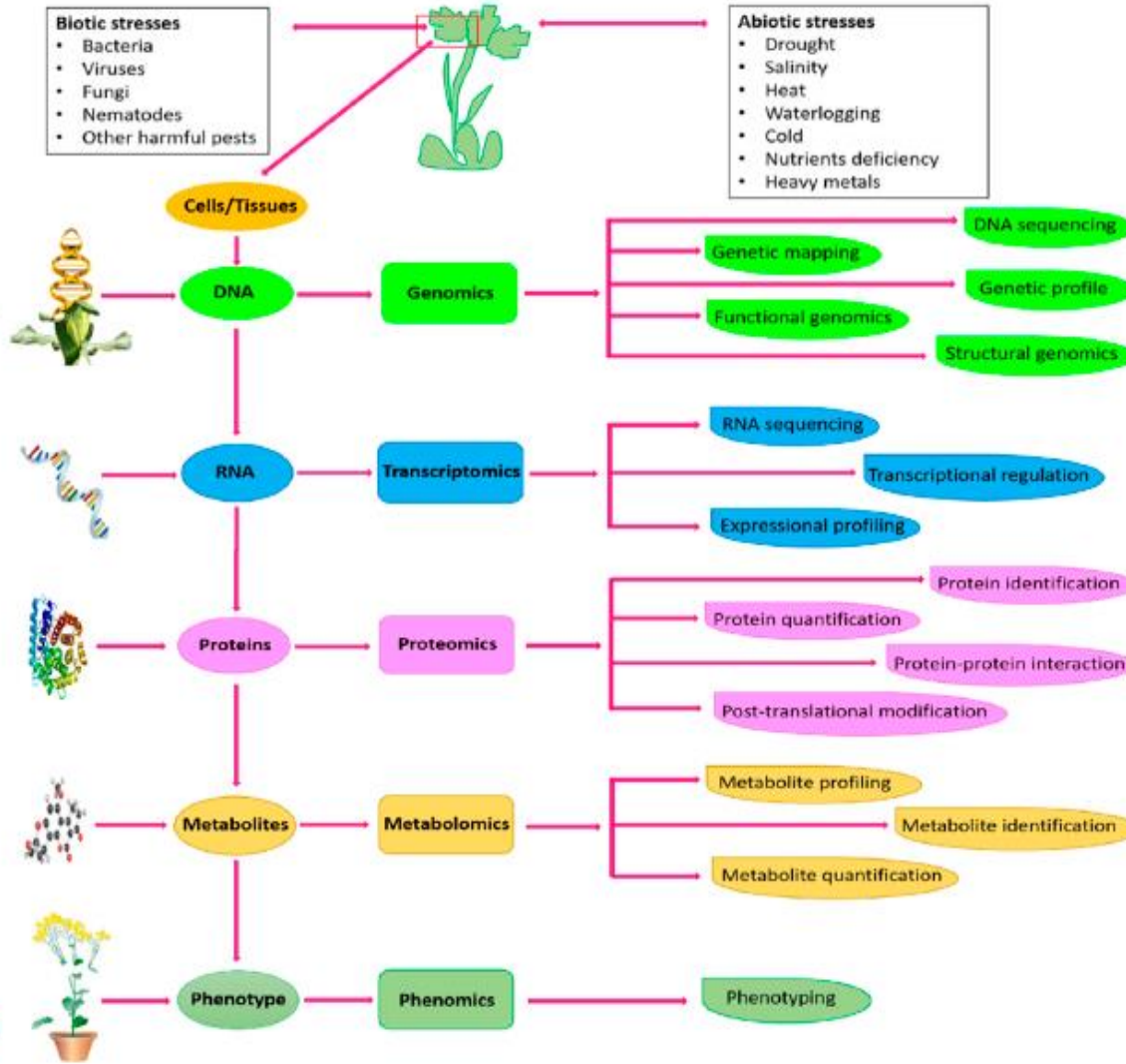
# Metabolomic?

- Metabolit: senyawa kimia yang terdapat dalam sel, jaringan, atau organisme
- Metabolit merupakan hasil ekspresi gen yang berasal dari interaksi antara sistem genom dengan lingkungan
  - Metabolit primer: gula, asam amino, asam lemak
  - Metabolit sekunder: terpen, flavonoid, artemisinin
- Metabolome: Kumpulan senyawa kimia (senyawa metabolit antara, hormon, molekul signal, dan metabolit sekunder) yang berada dalam suatu system sel, jaringan, atau organisme → metabolite collection



Metabolit merupakan hasil ekspresi gen yang berasal dari interaksi antara sistem genom dengan lingkungan







# Pendekatan dalam analisis metabolomic

- Analisis Tertarget
  - Analisis kuantitatif dan kualitatif terhadap sejumlah metabolit target yang telah ditentukan sebelumnya
- Metabolite Profiling
  - Analisis yang dilakukan terhadap semua metabolit yang ada dalam sampel baik yang telah diketahui maupun yang belum pernah teridentifikasi sebelumnya
- Metabolite Fingerprint
  - analisis sidik jari terhadap semua komponen senyawa yang ada dalam sampel untuk membedakan kelompok sampel yang ada, namun tidak mempersyaratkan identifikasi senyawasenyawa tersebut

# Manfaat Ilmu Metabolomic

## Applications

### Abiotic Stress Management

- Drought
- Heat
- Irradiation
- Salt
- Heavy Metals
- Ozone

### Biotic Stress Management

- Pathogens
- Insects
- Herbivores

### Nutritional Assessment

- Proteins
- Carbohydrates
- Vitamins
- Fats
- Minerals

## Identification

### Plant Tissue Preparation

- Sample crushing
- Centrifugation
- Phase separation
- Concentrating sample using vacuum
- Derivatization

### Data Acquisition



GC-MS, NMR, HPLC-UV, GC-TOF/TOF, LC-TOF, UPLC-FTMS, LC-MS/MS, UHPLC-MS/MS, GC-TOF-MS

### Data Analysis

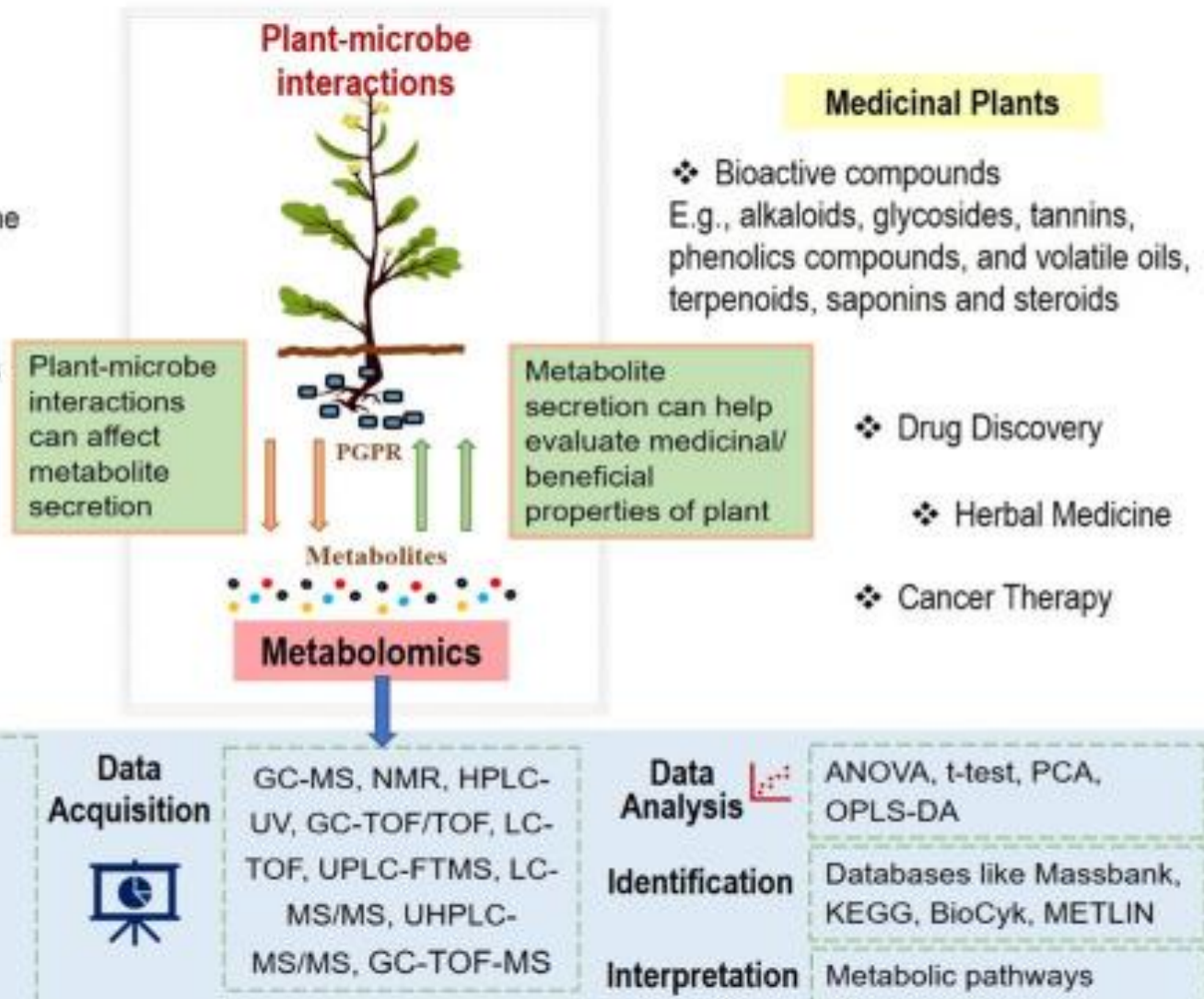
ANOVA, t-test, PCA, OPLS-DA

### Identification

Databases like Massbank, KEGG, BioCyk, METLIN

### Interpretation

Metabolic pathways



## Medicinal Plants

- ❖ Bioactive compounds  
E.g., alkaloids, glycosides, tannins, phenolics compounds, and volatile oils, terpenoids, saponins and steroids

- ❖ Drug Discovery
- ❖ Herbal Medicine
- ❖ Cancer Therapy

# Manfaat Plant Metabolomic

Mempelajari :

- Penyakit pada tanaman
- Mekanisme defense terhadap serangga dan penyakit lain
- Mekanisme stress tanaman (kekeringan, racun tertentu)
- Fungsi genetic tanaman
- Metabolit primer dan sekunder pada tanaman
- **Metabolit sekunder yang penting untuk dimanfaatkan sebagai obat**

# Manfaat Metabolomic di bidang farmasi

- deteksi produk palsu
  - komponennya berasal dari spesies tanaman yang sama namun memiliki konsentrasi senyawa aktif yang lebih rendah
- memonitor pengaruh lingkungan selama masa pertumbuhan dan panen
- Untuk memprediksi bioaktivitas serta mekanisme kerja produk,
  - memberikan gambaran terhadap aktivitas farmakologis tanaman obat
- Meningkatkan konsentrasi metabolit yang diinginkan → pengembangan obat

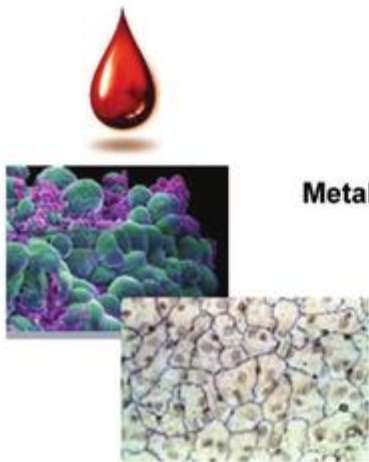
# Contoh Studi Metabolomic

- Membandingkan aktivitas antibakteri ekstrak teh hitam terfermentasi dan tanpa perlakuan
  - Ekstrak teh terfermentasi memiliki profil metabolit yang berbeda dengan ekstrak teh hitam tanpa perlakuan
  - Senyawa yang membedakan secara signifikan adalah **glukosamin, 4-guanidinobutanoat dan asam glutarat**
  - The terfermentasi juga memiliki kadar senyawa fenolik (katekin) menyebabkan stres oksidatif bakteri → peningkatan aktivitas antibakteri

# Langkah Analisis Metabolomic

- preparasi sampel,
- analisa dengan berbagai instrument
- pengolahan data,
- analisis data

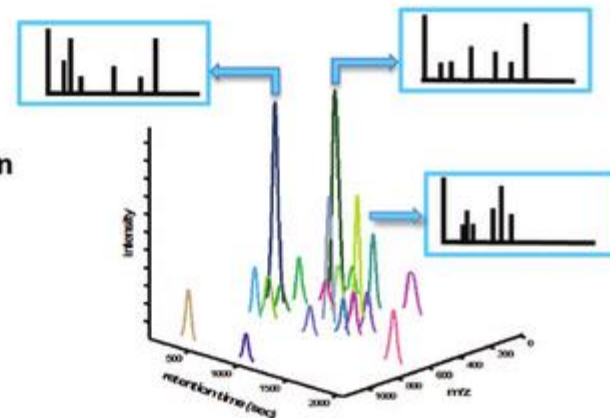




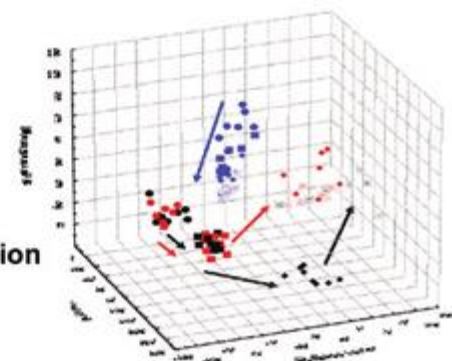
Metabolite extraction



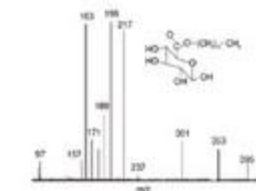
Data acquisition



Features selection



Identification & quantitation of metabolites



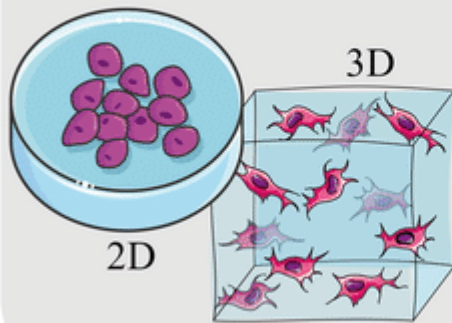
metabolite	A	B	C
4.2	3.4	6.0	
4.0	3.2	5.6	
3.8	3.0	5.2	
3.6	2.8	4.8	
3.4	2.6	4.4	
3.2	2.4		
	2.2		

Control vs. Experimental

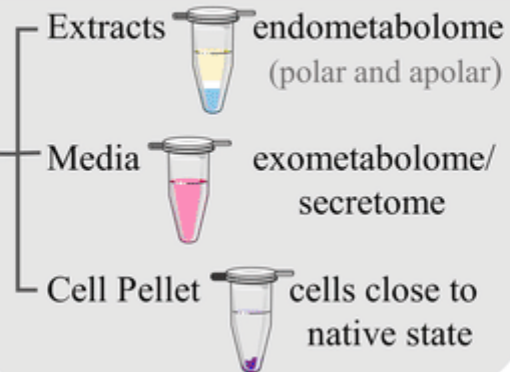
Pathway analysis & reconstruction



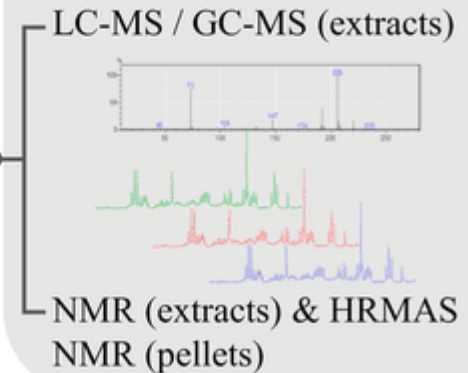
## 1. Cell Culture



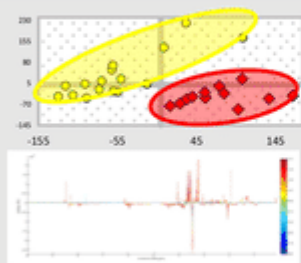
## 2. Sample Preparation



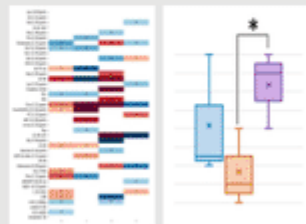
## 3. Data Acquisition



## 4. Statistical Analysis



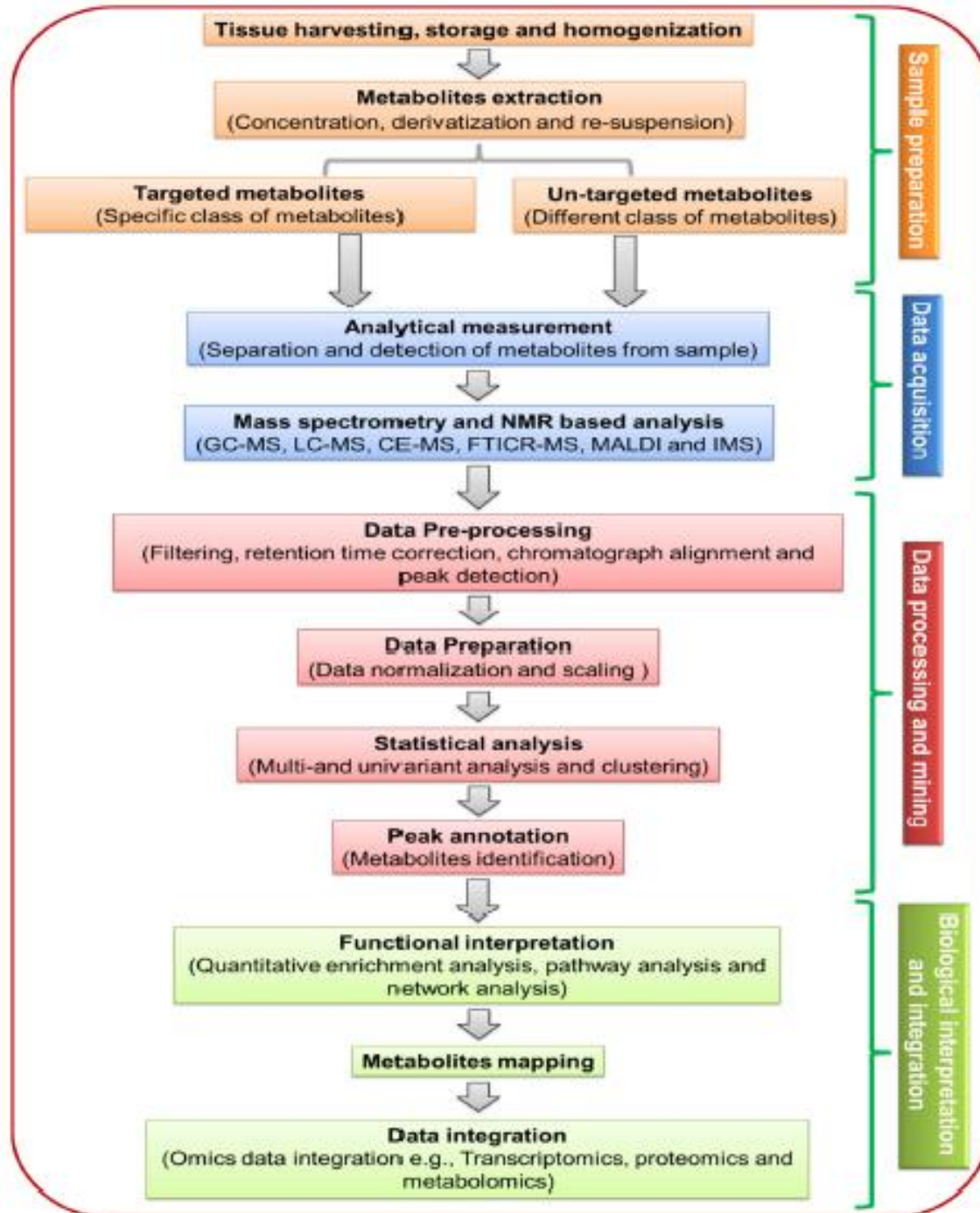
Multivariate  
Analysis



Univariate  
Analysis

## 5. Biochemical Interpretation





# Preparasi Sampel

- Metode penting untuk mendapat hasil yang dipercaya.
- Bisa digunakan ultrasound extraction dan mechanical grinding
- Waktu dan metode pengambilan sampel sangat mempengaruhi keterulangan hasil Analisa
- Waktu pemanenan, tempat tumbuh, bagian tanaman yang digunakan akan mempengaruhi komposisi metabolit yang terdeteksi.

# Preparasi Sampel

- Harus menggunakan pelarut yang sesuai untuk aplikasi dalam analisis pengukuran
- Untuk metabolite fingerprinting sebaiknya menggunakan campuran pelarut (polar/non polar) mampu mengekstrak seluruh komponen
  - contoh: kloroform:metanol:air
- Pelarut tidak boleh mempengaruhi stabilitas metabolit
- Bisa dilakukan pembekuan sampel → reaksi enzymatic kurang dari 1 detik

# Analisis dengan Instrumen

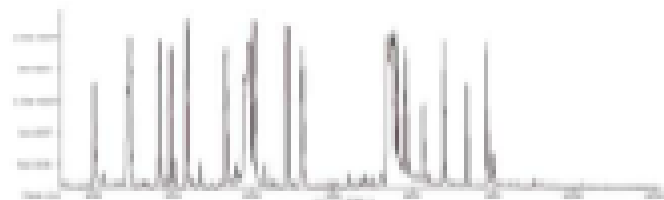
- Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)
- Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)
- Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)
- Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)



## Metabolite Profiling dan Metabolite Target Analysis

Otomatis, sensitifitas deteksi tinggi, memerlukan pemisahan senyawa, kuantifikasi dan identifikasi metabolit. Waktu analisis berkisar 5-140 menit.

### GC-MS



### LC-MS



Memerlukan pengenceran sampel dan

isolasi metabolit lebih lanjut (SPE, ekstraksi cari-cair)

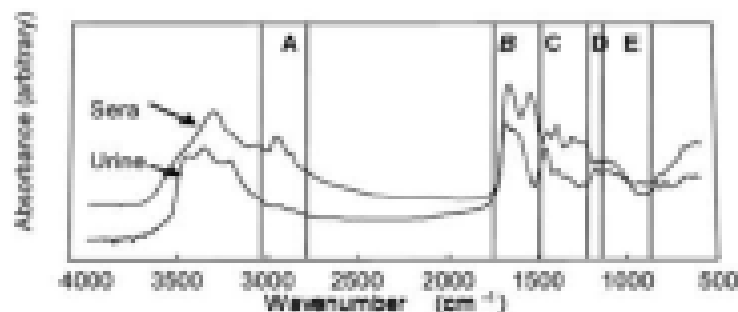
Analisa untuk senyawa-senyawa yang mudah menguap dan stabil terhadap panas, terkadang memerlukan derivatisasi.

## METABOLOM

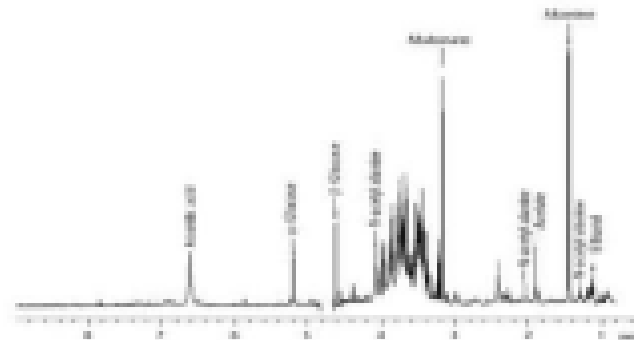
### Metabolite Fingerprinting

Analisis komponen senyawa secara global dengan preparasi sampel yang minimum, banyak digunakan untuk klasifikasi sampel. Kemampuan untuk identifikasi dan kuantifikasi senyawa terbatas, kecuali analisa dengan NMR.

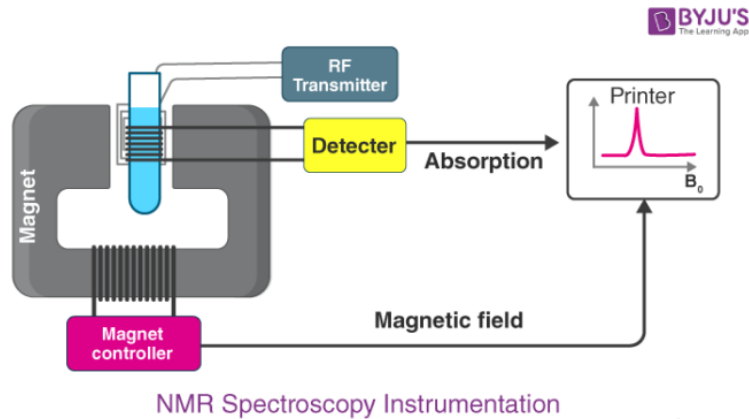
### FTIR



### NMR

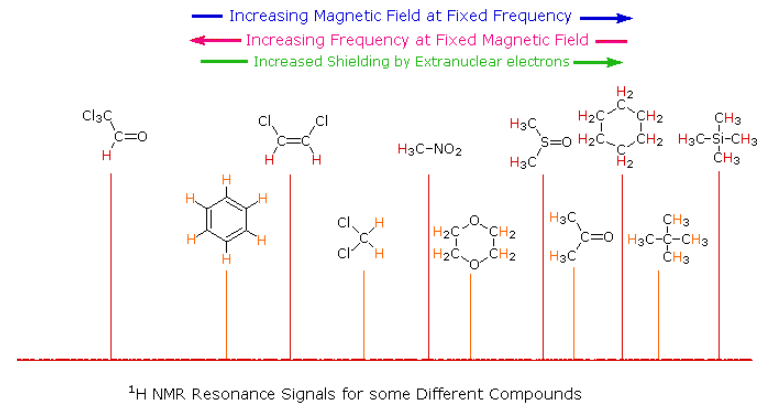


# NMR Spectroscopy



BYJU'S  
The Learning App

© Byjus.com

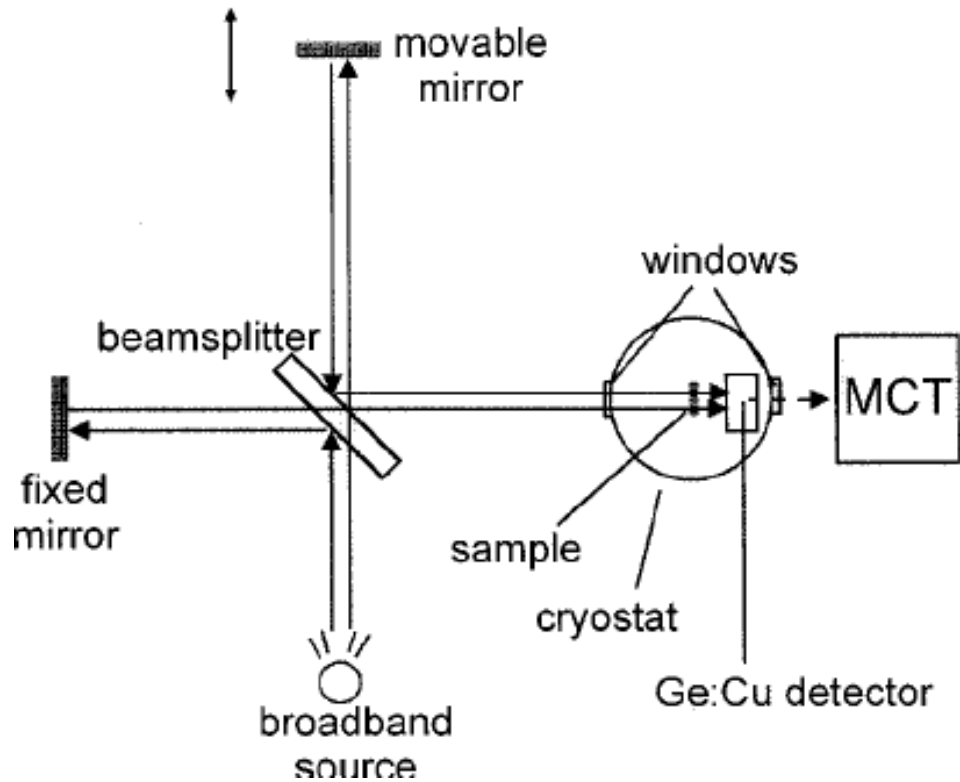


- Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy adalah adalah teknik spektroskopi untuk mengamati medan magnet lokal di sekitar inti atom.
- NMR Spektroskopi didasarkan pada pengukuran penyerapan radiasi elektromagnetik → perbedaan molekul menghasilkan perbedaan medan magnet.

# NMR Spectroscopy

- Digunakan untuk Analisa campuran kompleks → tidak sinyal tidak dipengaruhi oleh senyawa lain
- Kurang sensitif dibanding MS
  - NMR: micromolar; MS: picomolar
- Dapat digunakan untuk mendeksi pemalsuan produk herbal serta asal daerah tanaman tersebut → kontrol kualitas produk herbal
- Dapat menentukan prosentase yang dibutuhkan dari setiap bagian tanaman yang dibutuhkan dalam formulasi sediaan → standarisasi produk herbal

# FT-IR



- Fourier-Transform Infrared Spectroscopy
- Detection of unknown metabolites analysis conducted based on mass to charge ratio ( $m/z$ ) ion chemistry high-resolution MALDI (matrix assisted laser desorption)

# FT-IR

- mengkorelasikan absorpsi dan vibrasi cahaya pada panjang gelombang tertentu dari gugus fungsi senyawa untuk identifikasi metabolit.
- sensitivitas dan selektifitasnya yang rendah
- tidak dapat digunakan untuk analisa sampel yang mengandung air

# MS (Mass Spektrofotometri)

- analisis yang memberikan data kualitatif dan kuantitatif
- Sensitifitas, selektifitas, dan resolusi tinggi
- Pengerjaan cepat
- Ada GC-MS dan LC-MS



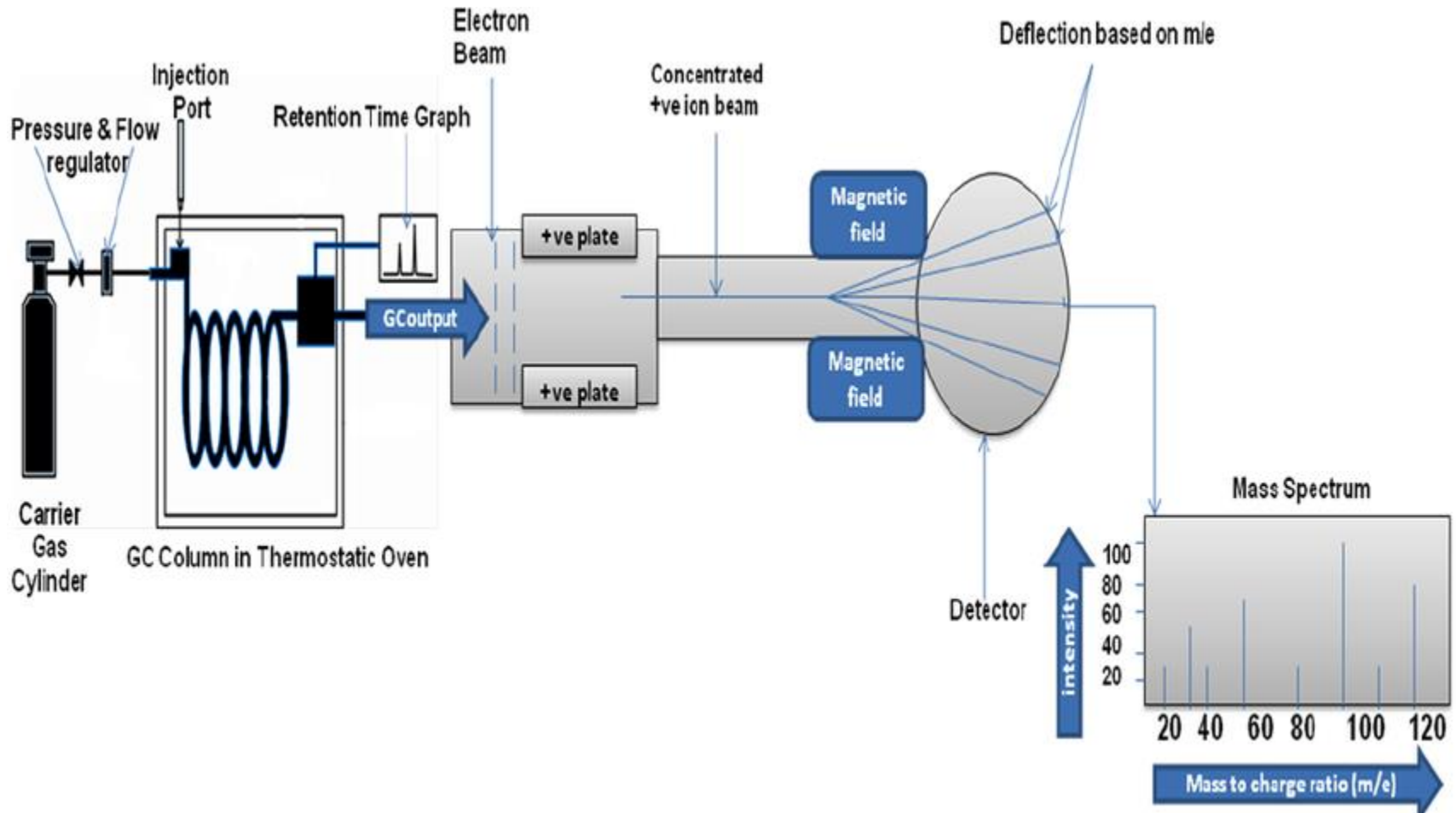
# GC-MS

- Gas Chromatography Mass Spectrophotometry
- Good for hydrophobic and polar compounds such as vitamins, organic acids, sugars, hydrocarbons and essential oils having a low molecular weight (asam organik, asam amino, gula, amin aromatik, asam lemak)
- Ionization method: Electron impact (EI)

# GC-MS

- menganalisis campuran senyawa yang mudah menguap atau senyawa dengan derivat yang mudah menguap dan stabil terhadap panas → derivatisasi untuk senyawa yang tidak mudah menguap (meningkatkan volatilitas dan stabilitas termal)
- Hasil analisis metabolomik *Caulophyllum robustum* dengan GC-MS menunjukkan bahwa aporphinoid dan quinolizidine merupakan senyawa alkaloid mayor dalam sampel dan senyawa ini berpotensi untuk dijadikan indikator pada kontrol kualitas
- Contoh lain: analisis metabolit primer beberapa spesies *Glycyrrhiza* → hasil analisis tersebut dapat digunakan untuk membedakan spesies tersebut.

# GC-MS



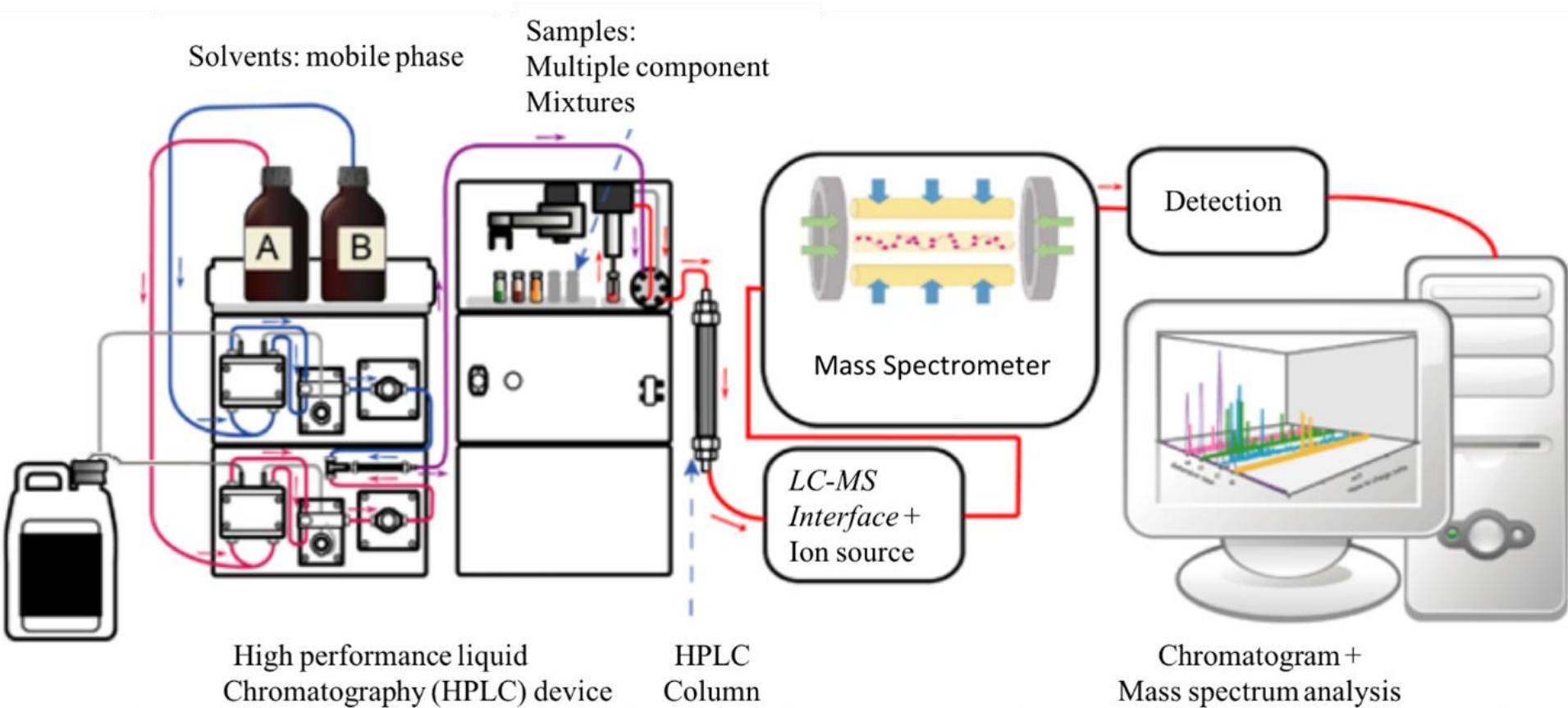
# LC-MS

- Liquid Chromatography-Mass Spectrophotometry
- Good for detection of polar compounds (gula dan asam-asam organik non-aromatik)
- Suitable for secondary metabolite analysis like vitamins, glucosinolates, flavonoids and carotenoids;
- Ionization method:
  - Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)
  - electrospray ionization (ESI)

# LC-MS

- Sensitifitas lebih tinggi dari GC-MS
- Memungkinkan analisis senyawa yang tidak stabil terhadap panas
- Preparasi sampel juga lebih sederhana
- Terbatas dalam mendeteksi senyawa non-target
- Contoh aplikasi:
  - membedakan varian dan area tumbuh *Glycyrrhiza glabra*
  - penentuan marker yang sesuai untuk kontrol kualitas pada produk herbal yang mengandung *Ginkgo biloba*

# LC-MS



<b>Metode</b>	<b>Kelebihan</b>	<b>Kekurangan</b>
GC-MS	<p>Volume sampel 0.1-0.2 mL</p> <p>Sensitifitas baik (batas deteksi 0.5<math>\mu</math>L)</p> <p>Database dan software yang dibutuhkan sudah banyak tersedia</p> <p>Pemisahan senyawa baik</p> <p>Reprodusibilitas data baik</p>	<p>Destruktif (sampel tidak dapat diperoleh kembali)</p> <p>Untuk analisis senyawa tertentu perlu dilakukan derivatisasi</p> <p>Tidak dapat digunakan untuk analisis senyawa yang tidak stabil suhu tinggi</p> <p>Waktu analisa 10-40 menit per sampel</p>
LC-MS	<p>Volume sampel 10-100 <math>\mu</math>L</p> <p>Sensitifitas tinggi (batas deteksi 0.5 nM)</p> <p>Dapat digunakan untuk analisis banyak senyawa organik dan beberapa molekul anorganik</p>	<p>Destruktif</p> <p>Waktu analisis 15-40 menit per sampel</p>

<b>Metode</b>	<b>Kelebihan</b>	<b>Kekurangan</b>
NMR	<p>Waktu analisis cepat</p> <p>Tidak destruktif</p> <p>Volume sampel 10-100 <math>\mu</math>L</p> <p>Tidak memerlukan derivatisasi</p>	<p>Sensitifitas rendah</p> <p>Tidak dapat mengidentifikasi senyawa anorganik dan garam</p> <p>Volume sampel 0.1-0.5 mL</p>
FTIR	<p>Analisis cepat</p> <p>Analisis sidik jari komposisi kimia sampel</p> <p>Tidak memerlukan proses derivatisasi</p>	<p>Spektra kompleks</p> <p>Lebih dari satu puncak perkomponen</p> <p>Identifikasi metabolit hampir tidak mungkin</p> <p>Memerlukan pengeringan</p>



# Analysis data

**Table 2.** List of bioinformatics and statistical tools for plant metabolomics workflow.

Tool	Weblink	Major Function
MetaboAnalyst	<a href="http://www.metaboanalyst.ca/">www.metaboanalyst.ca/</a>	Statistical analysis
MetaboSearch	<a href="http://omics.georgetown.edu/metabosearch.html">http://omics.georgetown.edu/metabosearch.html</a>	Data annotation
MeltDB 2.0	<a href="https://meltDB.cebitec.uni-bielefeld.de">https://meltDB.cebitec.uni-bielefeld.de</a>	Data processing
metaP-server	<a href="http://metabolomics.helmholtz-muenchen.de/metap2/">http://metabolomics.helmholtz-muenchen.de/metap2/</a>	Data analysis
MetExplore	<a href="http://metexplore.toulouse.inra.fr">http://metexplore.toulouse.inra.fr</a>	Pathway analysis
Metabox	<a href="https://github.com/kwanjeeraw/metabox">https://github.com/kwanjeeraw/metabox</a>	Analysis workflow
METLIN	<a href="https://metlin.scripps.edu/">https://metlin.scripps.edu/</a>	Metabolite annotation
MetAlign	<a href="http://www.metalign.nl">www.metalign.nl</a>	Data processing & statistical analysis
MetiTree	<a href="http://www.metitree.nl/">http://www.metitree.nl/</a>	Data annotation
Metab	<a href="http://www.metabolomics.auckland.ac.nz/index.php/downloads">www.metabolomics.auckland.ac.nz/index.php/downloads</a>	Workflow analysis
MetabR	<a href="http://metabr.r-forge.r-project.org/">http://metabr.r-forge.r-project.org/</a>	R package
MetaboAnalystR	<a href="https://github.com/xialab/MetaboAnalystR">https://github.com/xialab/MetaboAnalystR</a>	R package
Lilikoi	<a href="https://github.com/lanagarmire/lilikoi">https://github.com/lanagarmire/lilikoi</a>	R package

