



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

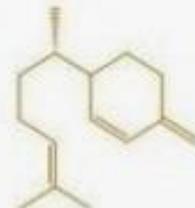
Sesquiterpene Hydrocarbons



ar-Curcumene

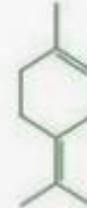


α -Zingiberene



β -Sesquiphellandrene

Monoterpene Hydrocarbons



Terpinolene

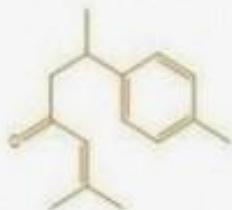


α -Phellandrene



p-Cymene

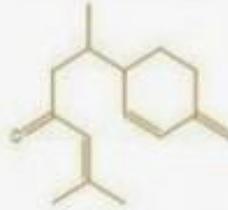
Oxygenated Sesquiterpenes



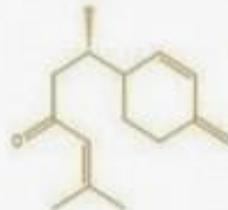
ar-Turmerone



α -Turmerone



β -Turmerone

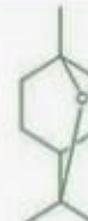


Curione



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)

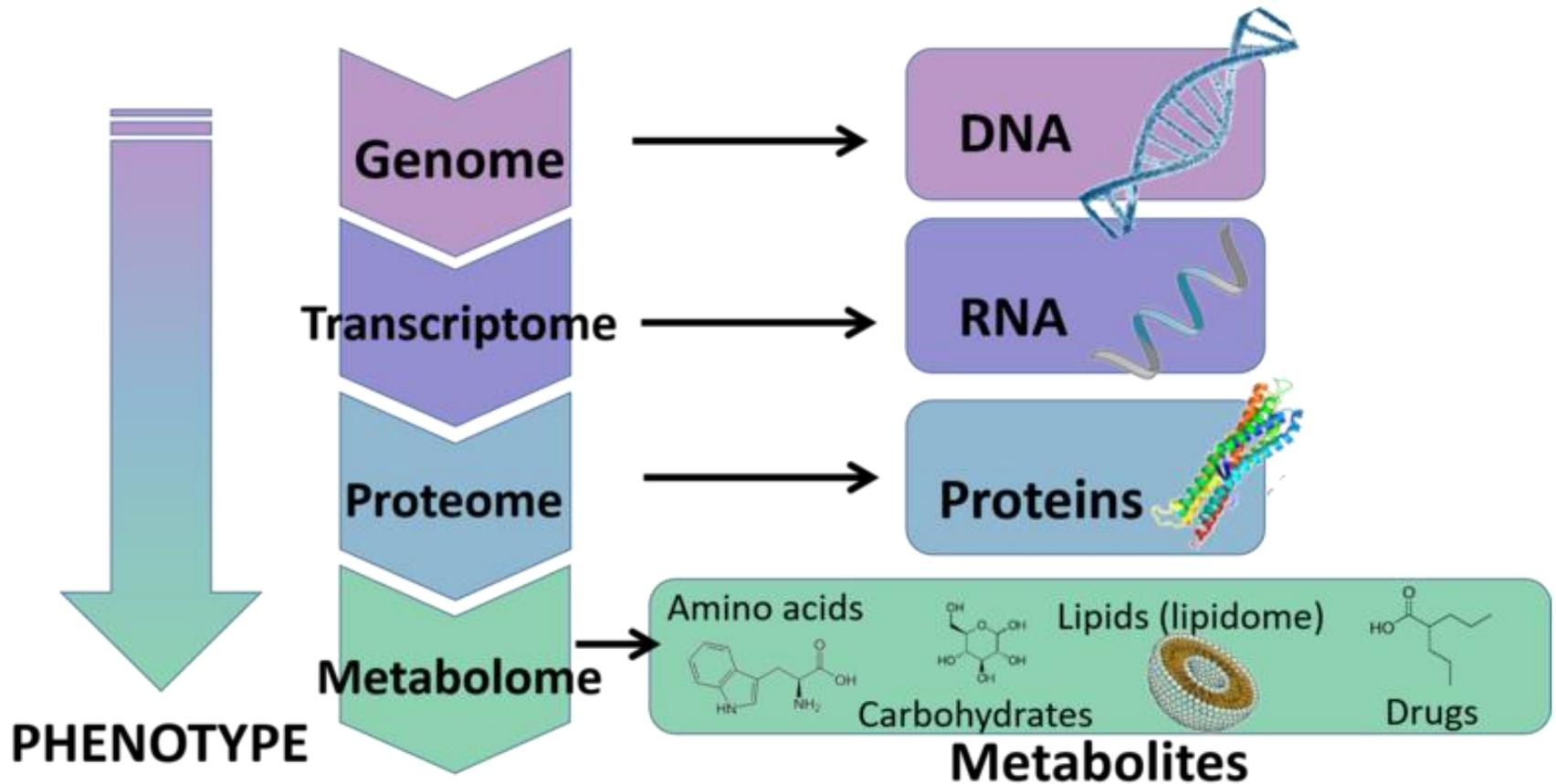
Metabolomic

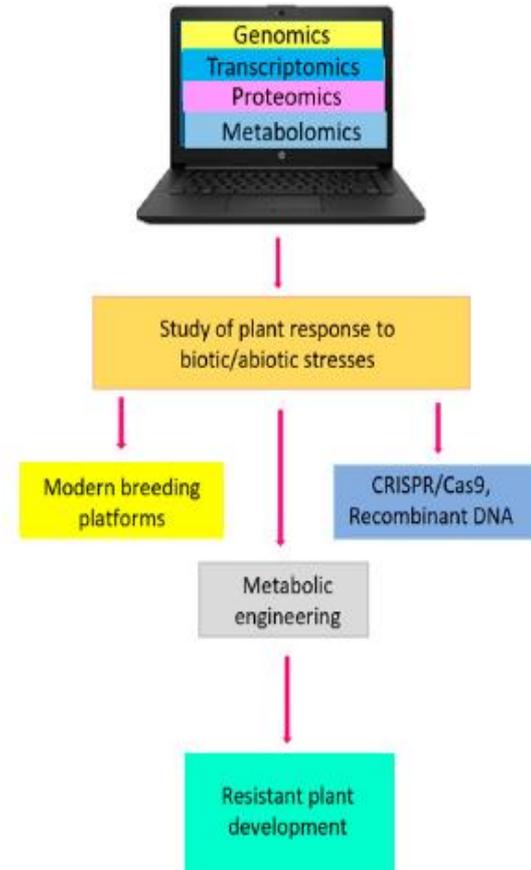
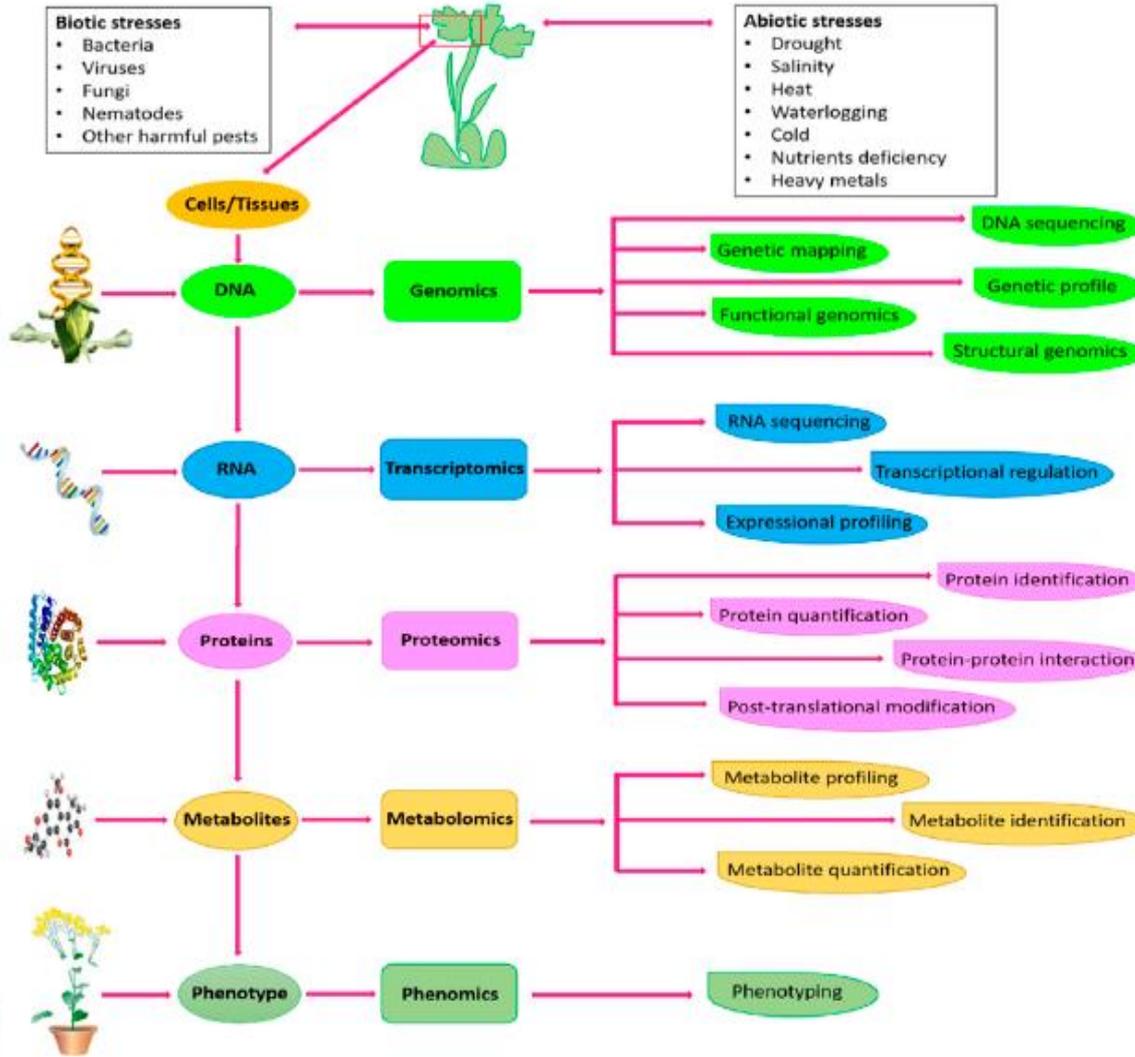
- Metabolomik: High throughput analysis
- Studi secara sistematis tentang profil senyawa kimia yang dihasilkan oleh suatu proses reaksi dalam organisme tertentu
- Studi yang mempelajari profil metabolit yang berupa senyawa dengan ukuran kecil (BM: 100-1000).
- Ilmu yang mempelajari senyawa kimia (metabolit)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

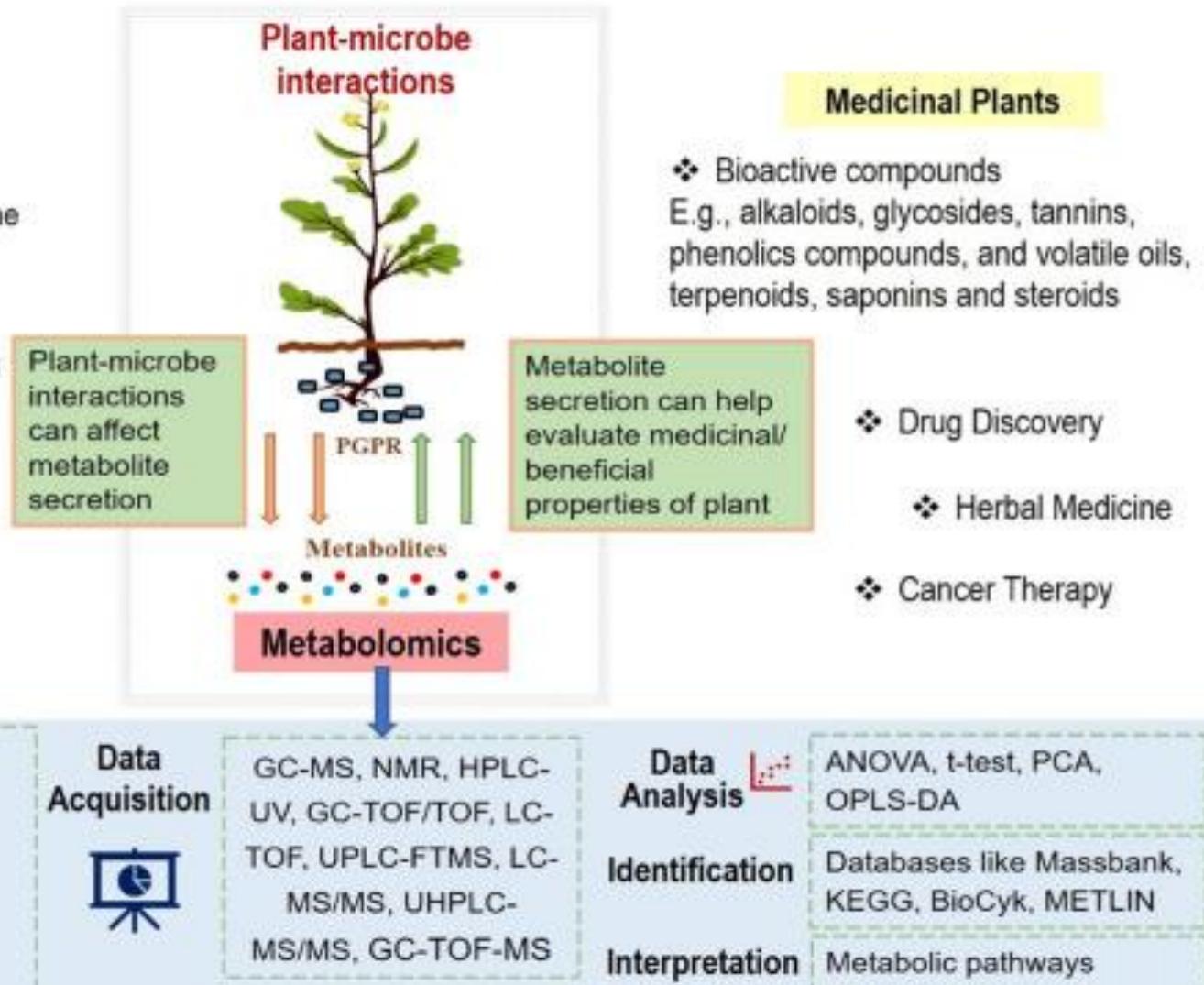
ANOVA, t-test, PCA, OPLS-DA

Identification

Databases like Massbank, KEGG, BioCyk, METLIN

Interpretation

Metabolic pathways



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

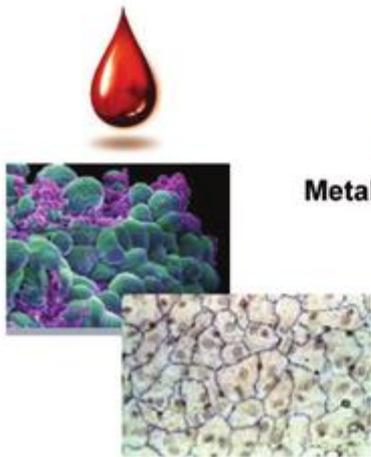
- deteksi produk palsu
 - komponennya berasal dari spesies tanaman yang sama namun memiliki konsentrasi senyawa aktif yang lebih rendah
- memonitor pengaruh lingkungan selama masa pertumbuhan dan panen
- Untuk memprediksi bioaktivitas serta mekanisme kerja produk,
 - memberikan gambaran terhadap aktivitas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

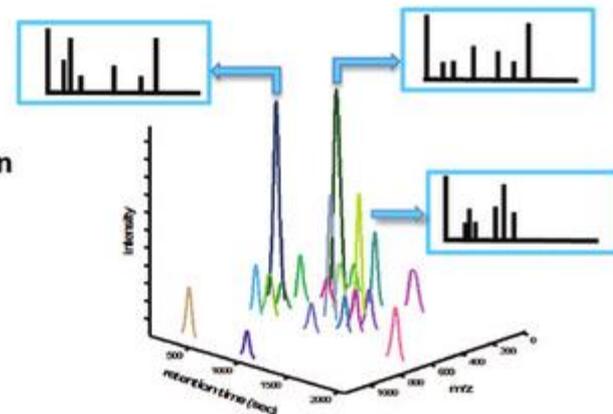
- preparasi sampel,
- analisa dengan berbagai instrument
- pengolahan data,
- analisis data



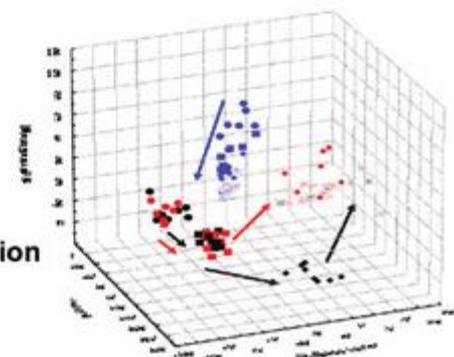
Metabolite extraction



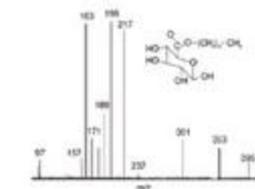
Data acquisition



Features selection



Identification & quantitation of metabolites



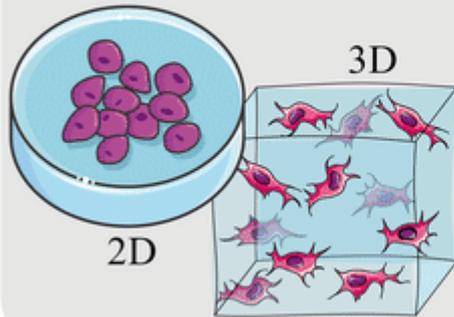
metabolite	A	B	C
4.2	3.4	6.0	
4.0	3.2	5.6	
3.8	3.0	5.2	
3.6	2.8	4.8	
3.4	2.6	4.4	
3.2	2.4		
	2.2		

Control vs. Experimental

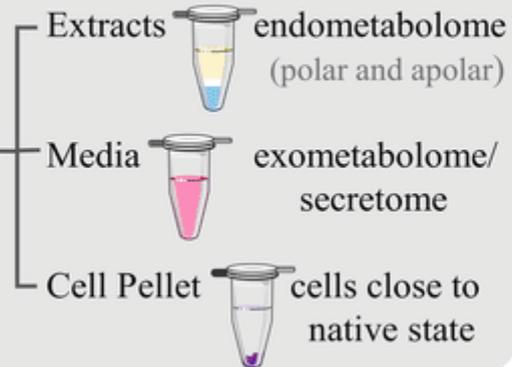
Pathway analysis & reconstruction



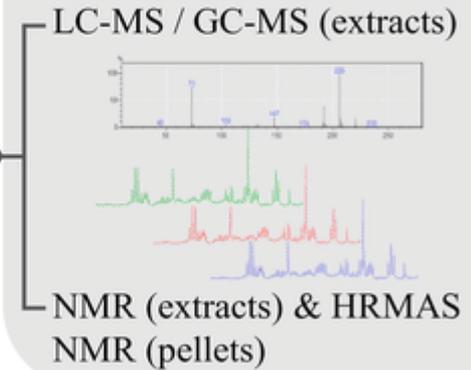
1. Cell Culture



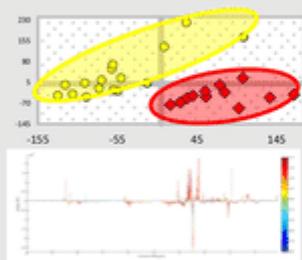
2. Sample Preparation



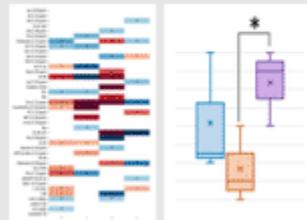
3. Data Acquisition



4. Statistical Analysis

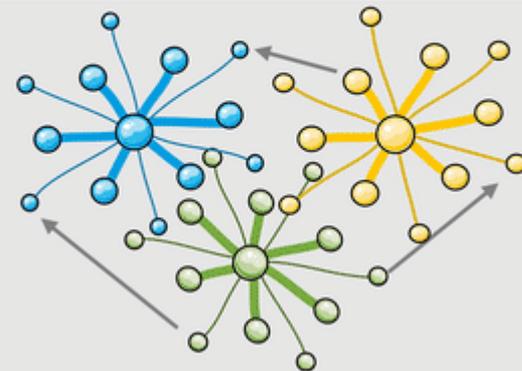


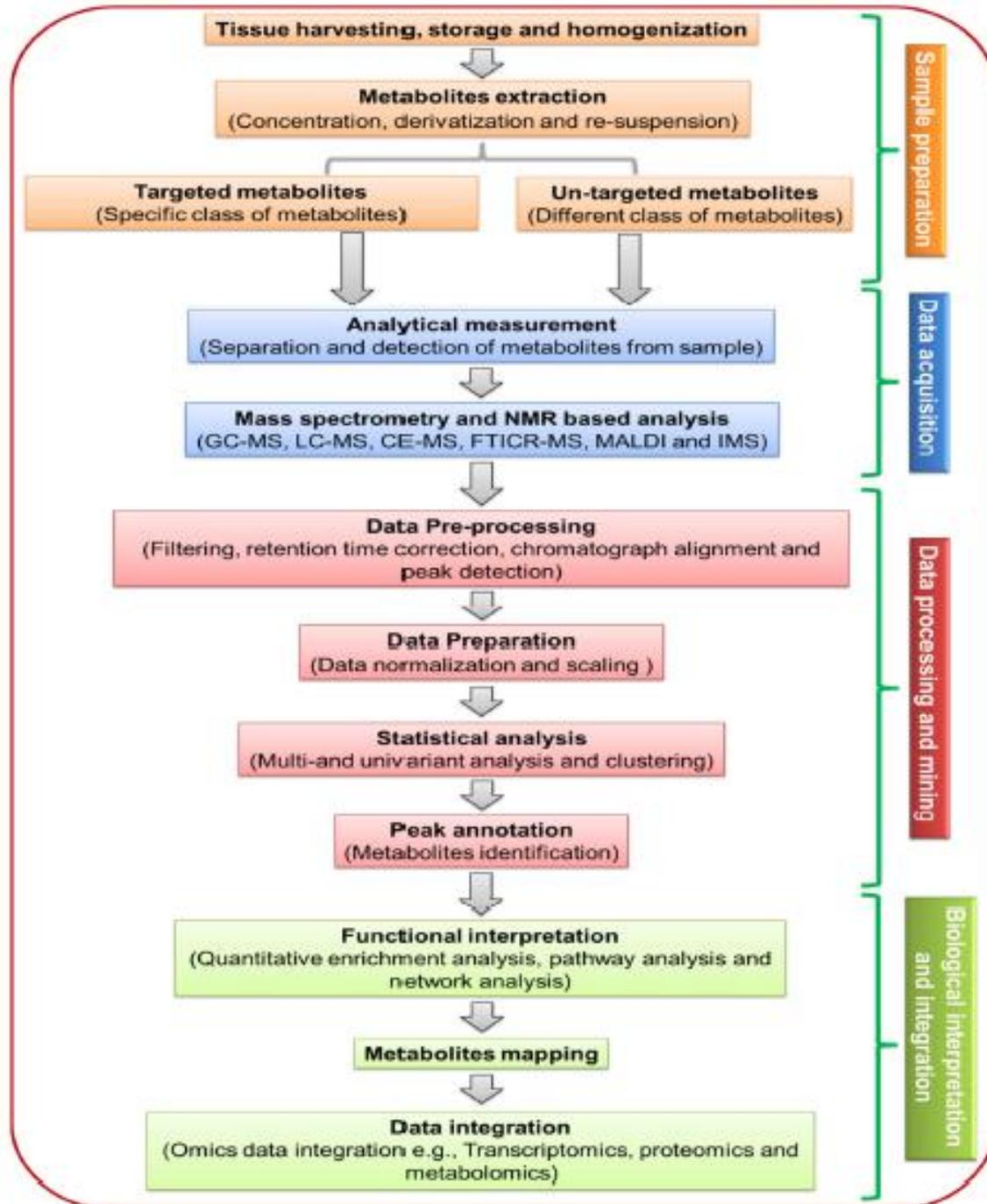
Multivariate
Analysis



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

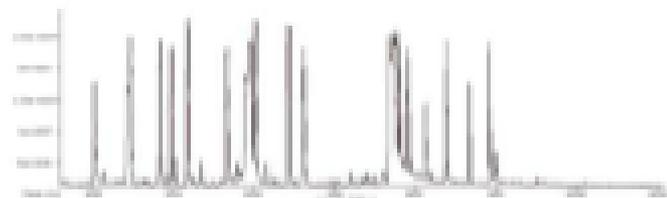
Analisis dengan Instrumen

- 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



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

Memerlukan pengenceran sampel dan

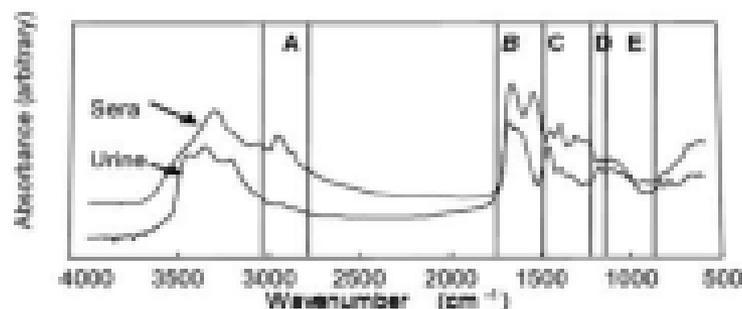
isolasi metabolit lebih lanjut (SPE, ekstraksi cari-cair)

METABOLOM

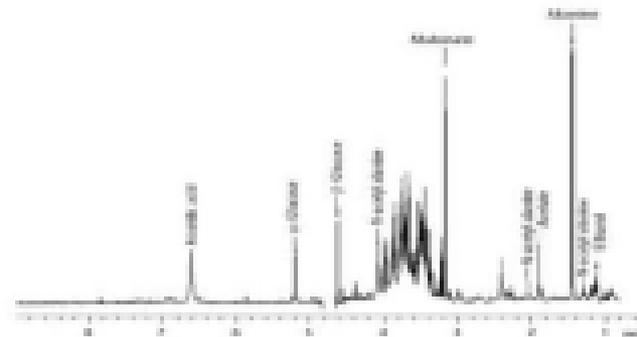
Metabolite Fingerprinting

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.

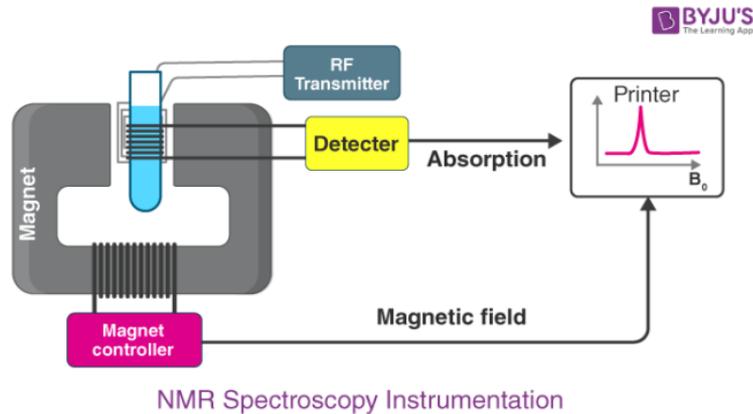
FTIR



NMR

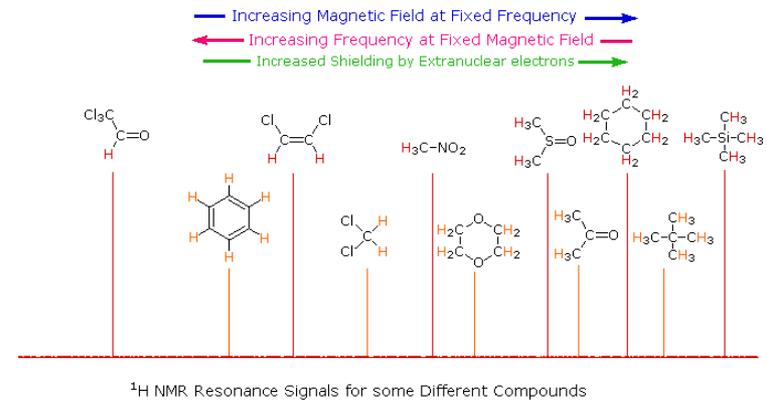


NMR Spectroscopy



BYJU'S
The Learning App

© Byjus.com

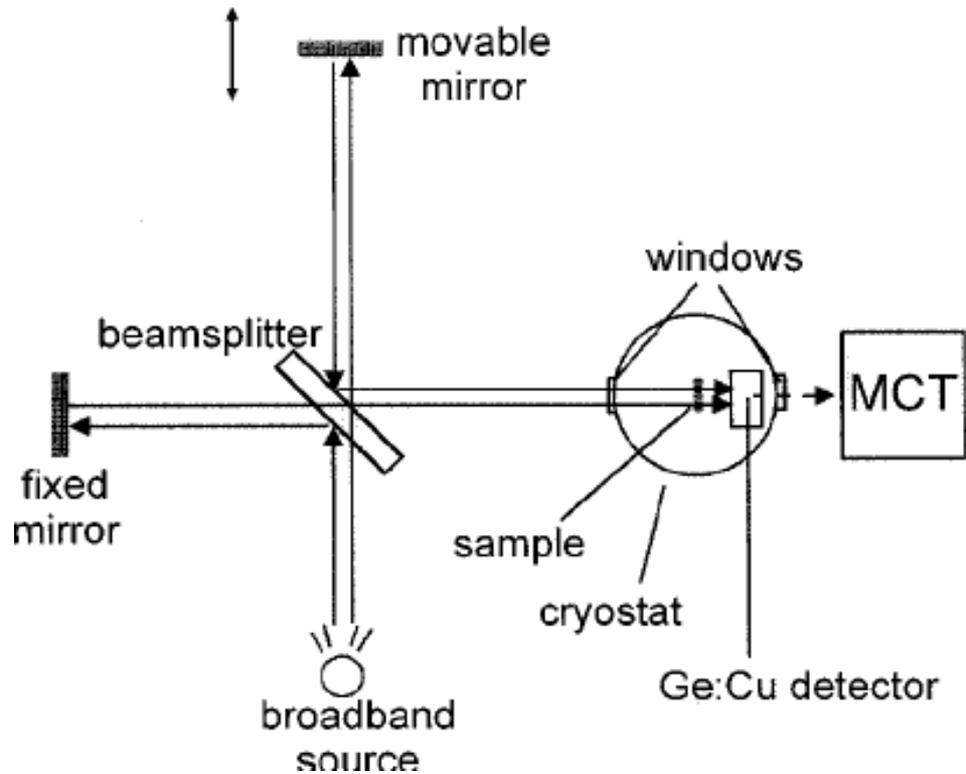


- Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy adalah adalah teknik spektroskopi untuk mengamati medan magnet lokal di sekitar inti atom.
- NMR Spektroskopi didasarkan pada pengukuran penyerapan radiasi elektromagnetik → perbedaan molekul menghasilkan perbedaan medan magnet.

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

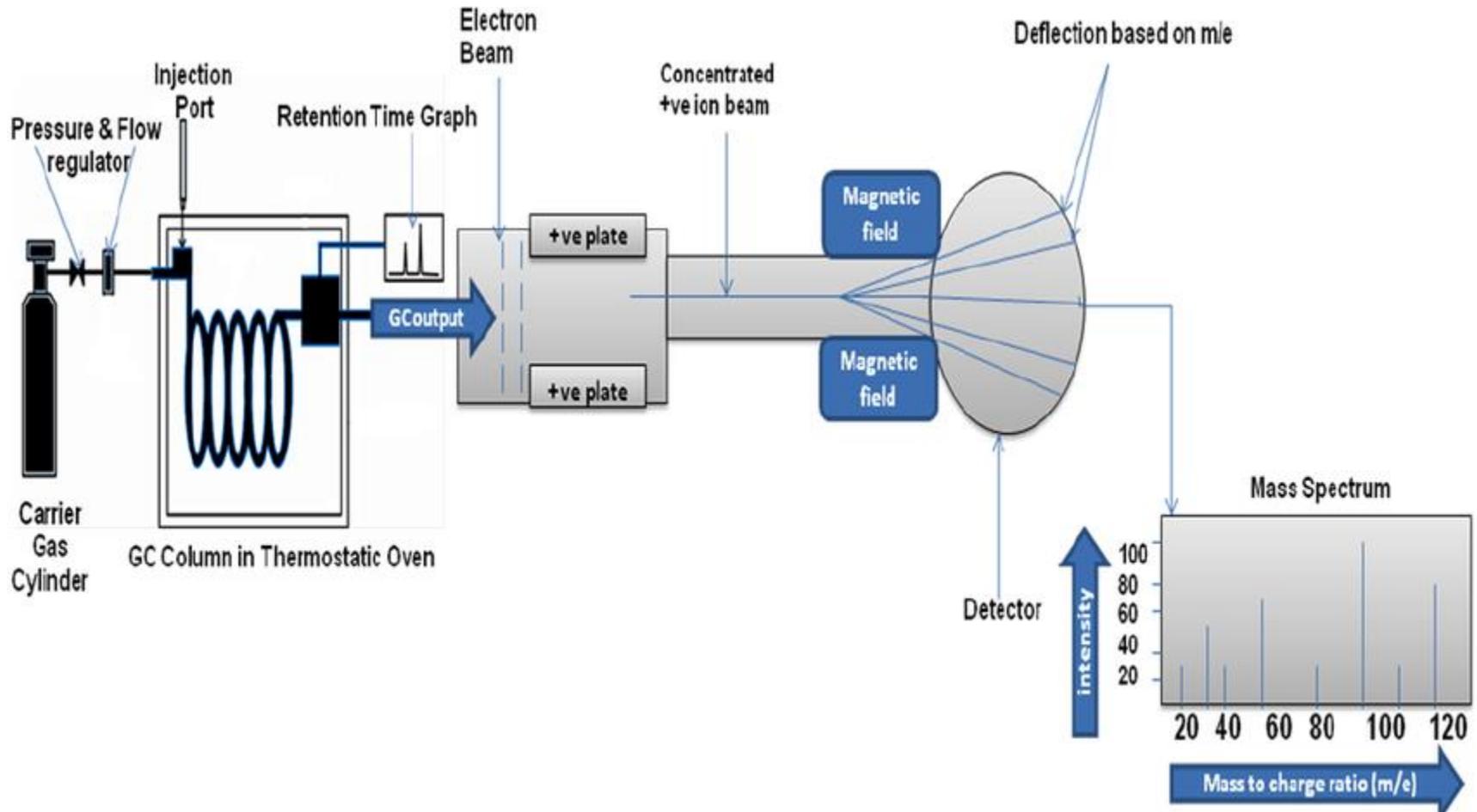
GC-MS

- 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



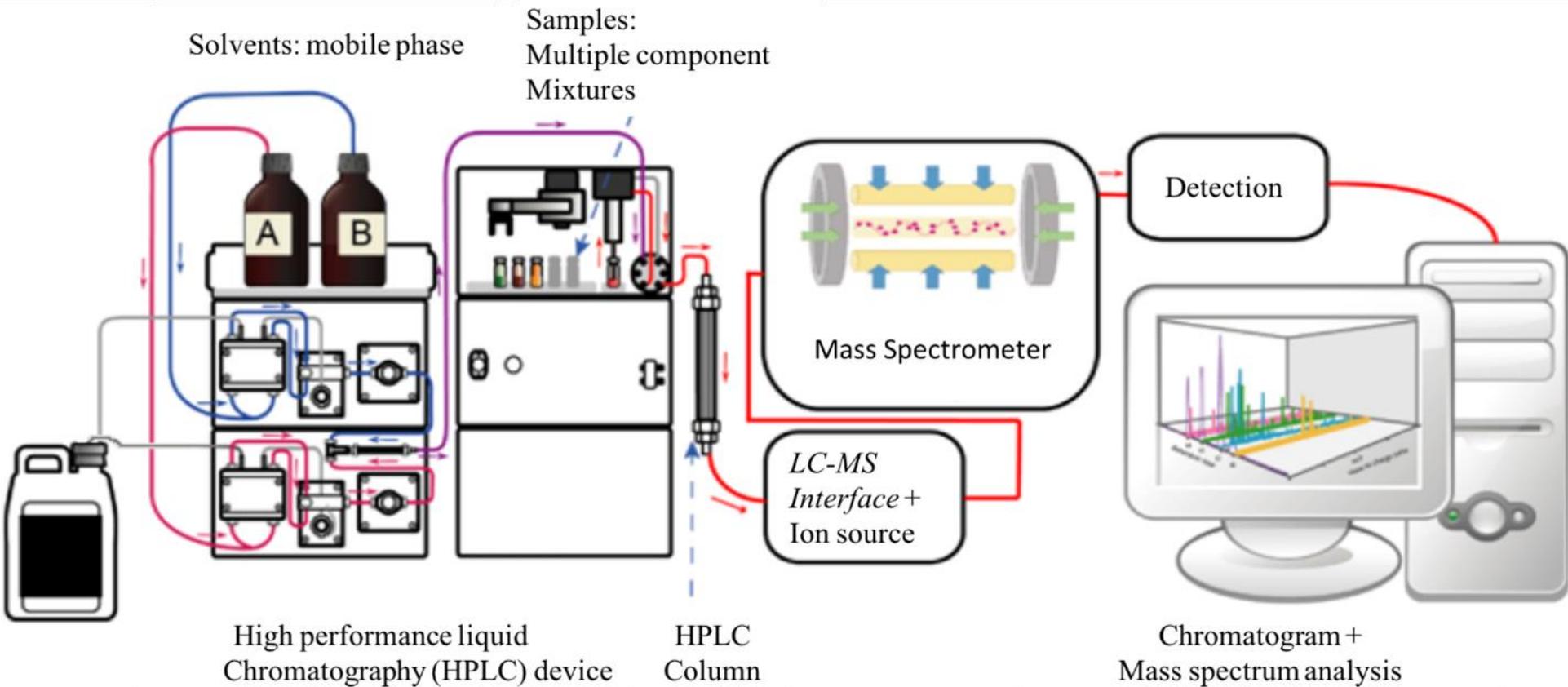
LC-MS

- 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



Metode	Kelebihan	Kekurangan
GC-MS	<p>Volume sampel 0.1-0.2 mL</p> <p>Sensitifitas baik (batas deteksi 0.5μL)</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 μL</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>

Metode	Kelebihan	Kekurangan
NMR	<p>Waktu analisis cepat</p> <p>Tidak destruktif</p> <p>Volume sampel 10-100 μL</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	www.metaboanalyst.ca/	Statistical analysis
MetaboSearch	http://omics.georgetown.edu/metabosearch.html	Data annotation
MeltDB 2.0	https://meltdb.cebitec.uni-bielefeld.de	Data processing
metaP-server	http://metabolomics.helmholtz-muenchen.de/metap2/	Data analysis
MetExplore	http://metexplore.toulouse.inra.fr	Pathway analysis
Metabox	https://github.com/kwanjeeraw/metabox	Analysis workflow
METLIN	https://metlin.scripps.edu/	Metabolite annotation
MetAlign	www.metalign.nl	Data processing & statistical analysis
MetiTree	http://www.metitree.nl/	Data annotation
Metab	www.metabolomics.auckland.ac.nz/index.php/downloads	Workflow analysis
MetabR	http://metabr.r-forge.r-project.org/	R package
MetaboAnalystR	https://github.com/xialab/MetaboAnalystR	R package
Lilikoi	https://github.com/lanagarmire/lilikoi	R package

