

Teknologi metabolomik dalam pertanian (Metabolomic technology in agriculture)

Sanimah Simoh, Alizah Zainal dan Zuraida Ab Rahman

Pengenalan

Pada amnya metabolomik didefinisikan sebagai pengukuran dan penganalisan secara komprehensif dan *high throughput* semua metabolit yang terkandung dalam sesuatu sel, tisu, organ, organisma atau sistem yang sedang dikaji dalam suatu tempoh masa yang spesifik. Saintis juga sering kali mendefinisikan metabolomik sebagai kajian pemprofilan secara sistematik semua metabolit yang mempunyai berat molekul bersaiz kecil (<1 kDalton – <1.5 kDalton) yang terdapat dalam sistem yang dikaji. Semua metabolit ini atau ‘metabolom’ akan menyediakan satu cap jari kimia yang unik kepada setiap organisma.

Kajian berkenaan metabolit atau ‘metabolomik’ ini menerangkan tentang proses biokimia serta peranan biologi metabolit dalam sesuatu organisma. Dalam era pascagenomik, metabolomik ialah komplemen kepada transkriptomik dan proteomik kerana penyelidik akan dapat memahami dengan lebih mendalam dan menyeluruh status fisiologi dan maklumat sesuatu organisma atau sistem yang dikaji hasil daripada interaksi ketiga-tiga teknologi omik ini. Perkembangan teknologi omik secara keseluruhannya mengubah sudut pandangan mereka yang terlibat dalam bidang ini bukan setakat melihat sesuatu sistem biologi pada peringkat gen, tetapi juga melihat interaksinya dengan parameter lain seperti protein dan metabolit.

Metabolomik membolehkan kadar penyaringan sampel dipertingkatkan secara pantas. Oleh itu, data dan informasi yang dihasilkan adalah banyak. Ini berbeza daripada pendekatan analisis sampel secara tradisional. Seperti juga dua teknologi omik terdahulu, metabolomik bergantung kepada keupayaan teknologi analitikal terkini seperti spektrometri massa dan spektroskopi yang mempunyai resolusi tinggi dan berupaya mengukur sejumlah besar metabolit dengan pantas. Memandangkan data yang diperoleh menggunakan peralatan teknologi analitikal terkini (contohnya GC-MS/MS, LC-MS/MS, NMR) adalah kompleks, besar dan banyak (metadata), biasanya ia akan digandingkan dengan bioinformatik yang menggunakan pelbagai algoritma dan perisian terkini yang dipanggil analisis data multivariansi atau *chemometric* sebagai alat statistik untuk membantu penganalisan dan interpretasi data sebelum pengenalpastian metabolit dapat dijalankan.

Peranan metabolomik dalam pertanian

Teknologi metabolomik masih berada pada peringkat awal pembangunannya. Walau bagaimanapun, ia telah diguna secara meluas dalam bidang tertentu seperti pertanian, sains pemakanan, sains persekitaran dan farmaseutikal. Perkembangan dan aplikasi metabolomik dijangka terus meningkat secara pantas dan dinamik seiring dengan perkembangan teknologi analitikal dan bioinformatik. Pendapatan berasaskan metabolomik di pasaran global dianggarkan bernilai USD343 juta dalam tahun 2012 dan nilai ini dijangka mencecah USD1.5 bilion menjelang 2017.

Metabolomik memainkan peranan yang begitu besar dalam penyelidikan yang melibatkan tanaman memandangkan tumbuhan mengandungi pelbagai kelas metabolit dengan struktur molekul dan entiti kimia yang lebih kompleks dibandingkan dengan mamalia dan mikroorganisma. Dianggarkan metabolit yang terkandung di dalam tumbuhan melebihi 200,000. Diversiti metabolom yang begitu luas di dalam tumbuhan menyebabkan kombinasi beberapa peralatan teknologi analitikal perlu digunakan dan sekarang ini pendekatan tersebut telah diguna secara meluas dalam kajian metabolomik.

Dalam bidang pertanian, metabolomik telah berjaya diaplikasi dalam pelbagai cabang disiplin dan antaranya adalah:

- i) untuk menilai tahap keselamatan atau mengenal pasti *substantial equivalence* sesuatu tumbuhan terubah suai genetik
- ii) sebagai langkah pengawalan kualiti untuk tanaman atau produk berasaskan herba
- iii) mengenal pasti penanda kimia dalam pemilihan varieti atau kultivar yang terbaik untuk pembiakbakaan tanaman

Metabolomik juga telah diaplikasi untuk memahami bagaimana sesuatu tanaman memberi tindak balas terhadap tekanan persekitaran seperti kemarau, banjir atau perubahan cuaca yang mendadak. Dalam usaha untuk meningkatkan nutrisi tanaman, genotip yang stabil juga boleh dikenal pasti menggunakan metabolomik untuk menghasilkan tanaman yang menghasilkan sebatian bioaktif yang penting secara konsisten. Dalam industri makanan, teknologi ini telah diguna secara meluas untuk mengenal pasti komposisi nutrien atau kompaun yang hadir dalam rantai pemprosesan makanan tersebut.

Kajian metabolomik terhadap 29 varieti kentang yang berbeza genetik telah dijalankan oleh sekumpulan penyelidik di luar negara menggunakan peralatan GC-MS. Beberapa metabolit yang bernilai tinggi hanya hadir dalam kultivar kentang yang spesifik sahaja. Kajian ini akhirnya menjurus kepada penghasilan kultivar yang rendah kandungan

akrilamid (akrilamid akan menjejaskan kualiti kentang yang digunakan oleh industri pemprosesan jika kandungannya terlalu tinggi). Dalam kajian lain, penyelidik mengenal pasti beberapa metabolit daripada kumpulan asid amino (isoleusina, tirosina dan fenilalanina) berada pada kuantiti yang lebih tinggi dalam beberapa kultivar kentang dan asid amino ini akan mempengaruhi rasa, aroma serta menghasilkan kesan kehitaman selepas diproses. Metabolomik juga telah diaplikasi dalam tomato iaitu salah satu tanaman terpenting di dunia serta tumbuhan model untuk penyelidikan. Pelbagai platform teknologi seperti NMR, LC-MS dan GC-MS telah digunakan untuk menilai perubahan profil metabolit di dalam tomato sama ada varieti yang biasa ditanam atau varieti liar termasuk yang telah dilakukan modifikasi genetik.

Metabolomik ke atas bijirin juga telah dijalankan terutama terhadap padi, gandum dan jagung. Kajian metabolomik ke atas padi telah dijalankan terhadap 68 varieti padi daripada koleksi padi dunia untuk mengenal pasti fenotip metaboliknya. Penanda bio (*biomarker*) dalam pelbagai peringkat perkembangan pokok padi juga telah berjaya dikenal pasti. Kajian menggunakan NMR berjaya menemukan perubahan profil metabolit terhadap tiga genotip gandum terubah suai genetik adalah disebabkan oleh kesan persekitaran dan bukannya disebabkan modifikasi genetik tanaman gandum tersebut. Kajian juga telah dijalankan terhadap impak perubahan iklim terhadap kandungan metabolit tanaman ini. Gandum yang ditanam bawah tahap karbon dioksida (CO_2) yang tinggi menunjukkan profil metabolit yang serupa dengan yang ditanam bawah tahap CO_2 biasa (ambien) kecuali pada penghasilan flavonoidnya.

Pendekatan metabolomik juga telah digandingkan dengan kajian pengekspresan gen untuk tanaman jagung. Beberapa gen dikenal pasti terlibat dalam trait bernilai tinggi dalam jagung dan berpotensi sebagai penanda bio yang boleh diguna pakai dalam program pembiakbakaan tanaman ini. Kajian metabolomik terhadap buah-buahan juga telah dijalankan antaranya ke atas epal, strawberi dan anggur. Dengan menggunakan pendekatan metabolomik berasaskan GC-MS, kultivar epal dapat dibezakan dan metabolit yang spesifik yang menjurus kepada trait komersial seperti kandungan antioksidan, fenolik dan antosianin dapat dikenal pasti. Kajian metabolomik terhadap beberapa peringkat kematangan buah yang memberi impak kepada kualiti juga telah dilakukan untuk buah strawberi. Korelasi data metabolomik dan analisis rangkaian (*network analysis*) berjaya mengenal pasti metabolit spesifik yang mempunyai pertalian rapat dengan tapak jalan metabolik tertentu. Beberapa tapak jalan metabolik seperti biosintesis ester, asid trikarboksilik (TCA), tapak jalan asid shikimik dan metabolisme asid amino mengalami perubahan yang ketara semasa peringkat perkembangan buah strawberi.

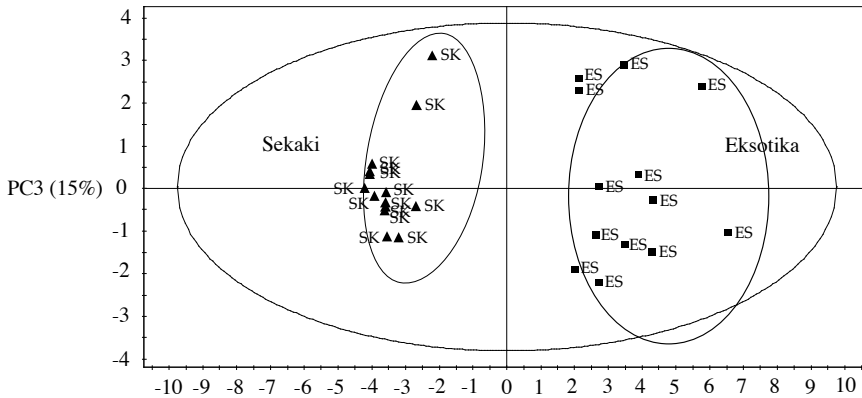
Pendekatan metabolomik dalam penyelidikan di MARDI

Penyelidikan menggunakan pendekatan metabolomik telah dijalankan secara aktif di Pusat Penyelidikan Bioteknologi, MARDI terhadap beberapa jenis tanaman. Buah-buahan seperti betik, belimbing, pitaya dan herba seperti *phyllanthus*, kunyit hitam dan temu hitam adalah antara tanaman yang menjadi tumpuan. Tekstur, aroma dan warna daripada buah-buahan menjadi faktor penyumbang yang menjadi daya tarikan kepada pengguna dan ciri ini adalah penting untuk tujuan eksport. Semua ciri atau kualiti trait di atas boleh ditentukan dengan mengkaji status metabolom tanaman tersebut.

Kajian metabolomik yang dijalankan di MARDI bukan hanya terhad untuk mengenal pasti metabolit atau kompaun bioaktif dalam tanaman yang dikaji, tetapi biasanya digandingkan dengan kajian pengekspresan gen untuk memahami dengan lebih mendalam sistem biologi tanaman tersebut. Untuk tujuan itu, kajian metabolomik yang digandingkan dengan pengekspresan gen (*transcriptomics*) terhadap betik Eksotika iaitu antara varieti betik popular di Malaysia telah dijalankan. Sejumlah 54 metabolit yang terdiri daripada metabolit primer dan sekunder telah berjaya dikenal pasti daripada betik Eksotika yang berada dalam indeks kemasakan kelima (indeks yang paling optimum dan sesuai untuk dimakan). Ini termasuk metabolit dalam kumpulan asid amino dan asid organik, asid lemak tepu/tak tepu, gula dan gula beralkohol, fenolik ringkas, asid askorbik (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E) dan sterol tumbuhan termasuk stigmasterol, β -sitosterol dan kampesterol. Gandingan data transkriptomik dan metabolomik menunjukkan 29 metabolit mempunyai pertalian rapat dengan gen yang diramal (*Jadual 1*).

Jadual 1. Antara metabolit yang berkait rapat dengan gen yang diramal hasil analisis metabolomik dan transkriptomik

Metabolit daripada analisis metabolomik	Enzim putatif yang dikodkan oleh gen yang diramal daripada analisis transkriptomik	Tapak jalan KEGG
Beta sitosterol/ campesterol	Delta24-sterol reductase (DWARF) (EC 1.3.1.72)	Biosintesis steroid
Stigmasterol	C-22 sterol desaturase (CYP710A) (-)	Biosintesis steroid
Vitamin E (α -tokoferol)	Vitamin E Deficient 1 (VTE1); Tocopherol cyclase (-)	Biosintesis ubiquinone/ terpenoid-quinone lain
Gama tokoferol	Gamma-tocopherol O-methyltransferase (G-TMT) (EC 2.1.1.95)	Biosintesis ubiquinone/ terpenoid-quinone lain
Kolesterol	Sterol delta7 reductase (DWARF) (EC 1.3.1.21)	Biosintesis steroid
Asid askorbik	Ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.5)	Metabolisme glutathione/ Ascorbate dan aldarate

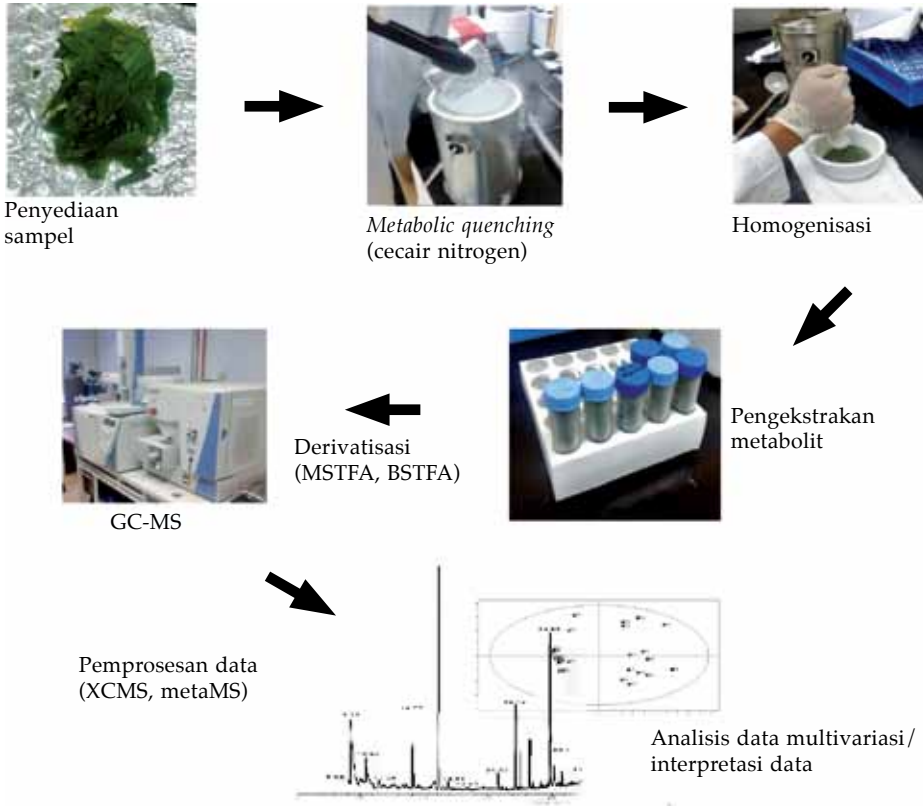


Rajah 1. Analisis data multivariansi menunjukkan perbezaan profil metabolit yang ketara antara varieti betik Eksotika dengan Sekaki

Pemprofilan metabolit juga dijalankan secara komprehensif menggunakan GC-MS untuk mengkaji perbezaan metabolit antara dua varieti betik tempatan iaitu Eksotika dan Sekaki dan juga untuk mengenal pasti perbezaan kandungan metabolit untuk lima peringkat kemasakan (indeks kemasakan 1, 2, 4, 5 dan 6) dalam setiap varieti. Analisis data multivariansi menunjukkan replikasi sampel dalam setiap varieti berkelompok rapat dalam varieti mereka sendiri, sementara Eksotika jelas terpisah daripada Sekaki. Ini menunjukkan terdapatnya perbezaan profil metabolit yang ketara antara kedua-dua varieti tersebut (Rajah 1).

Metabolit yang menjadi penyumbang utama kepada perbezaan ini terdiri daripada kumpulan asid amino (alanina, threonina, glisina, serina), gula/gula alkohol (glukosa, galaktosa, myo-inositol), sterol tumbuhan (campesterol, stigmasterol, beta sitosterol), vitamin E dan vitamin C di mana kandungan semua metabolit tersebut lebih tinggi di dalam varieti Eksotika berbanding dengan Sekaki. Analisis metabolomik terhadap lima peringkat kemasakan Eksotika dan Sekaki juga dikaji. Terdapat perbezaan profil metabolit yang ketara untuk kedua-dua varieti betik tersebut antara setiap peringkat kemasakan. Dalam varieti Eksotika, metabolit yang terlibat dalam tapak jalan metabolit primer seperti asid amino dan asid organik dikenal pasti hadir dalam aras yang lebih tinggi di peringkat awal kemasakan sementara metabolit yang terlibat dalam tapak jalan metabolit sekunder seperti campesterols, colchichine, scopolin dan vitamin C hadir dalam aras yang lebih tinggi di peringkat akhir kemasakan. *Gambar rajah 1* menunjukkan langkah penting eksperimen metabolomik menggunakan kaedah GC-MS daripada penyediaan sampel sehingga interpretasi data.

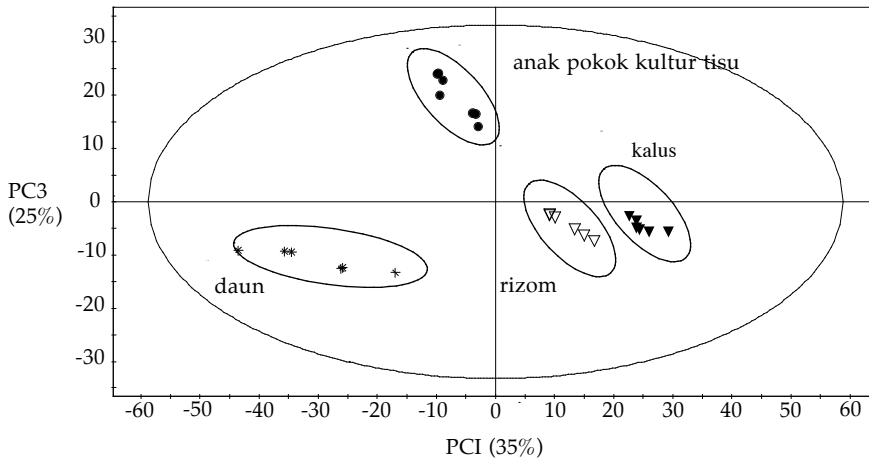
Kajian metabolomik terhadap ulam raja juga telah dijalankan dalam usaha untuk mengenal pasti kompaun bioaktif yang berpotensi memberi kesan terhadap aktiviti



Gambar rajah 1. Langkah utama dalam penyelidikan menggunakan pendekatan metabolomik menggunakan GC-MS

perencatan enzim α -glukosidase di dalam herba ini. Enzim α -glukosidase memainkan peranan penting terhadap penyakit diabetes. Kajian ini telah dijalankan dengan menggunakan peralatan GC-MS serta perisian *open source* (XCMS) untuk pemrosesan data metabolit sebelum cap jari kimia (*chemical finger printing*) ulam raja diperoleh menggunakan analisis data multivariansi. Kompaun bioaktif yang mempunyai pertalian rapat dengan aktiviti perencatan enzim α -glukosidase ini dikenal pasti menggunakan analisis data multivariansi secara OPLS (*orthogonal partial least square*)

Pendekatan metabolomik terhadap dua jenis herba iaitu temu hitam dan kunyit hitam untuk mengenal pasti kompaun bioaktif yang memainkan peranan utama dalam aktiviti antikanser juga telah dijalankan. Kajian ini digandingkan dengan kajian efikasi ekstrak herba tersebut terhadap titisan sel kanser serta kajian transkriptomik. Temu hitam didapati mengandungi lebih banyak metabolit daripada kumpulan terpenoid dibandingkan dengan kunyit hitam. Cycosilogifolene dan borneol merupakan terpenoid utama yang dikenal pasti masing-masing di dalam temu hitam dan kunyit hitam.



Rajah 2. Analisis data multivariansi menunjukkan perbezaan profil metabolit antara rizom, kalus, daun dan anak pokok kultur tisu daripada temu hitam

Analisis data multivariansi secara *principal component analysis* (PCA) menunjukkan kumpulan rizom, daun, anak pokok kultur tisu dan kalus temu hitam jelas terpisah antara satu sama lain. Ini menunjukkan kandungan metabolit dan profil yang berbeza antara rizom, daun, anak pokok kultur tisu dan kalus (Rajah 2). Melalui analisis ini, metabolit utama yang menyumbang kepada perbezaan profil tersebut boleh dikenal pasti dan seterusnya boleh dijadikan asas untuk menggunakan sumber organ atau bahagian tanaman yang terbaik untuk dijadikan ekstrak/formulasi tertentu untuk ujian efikasi atau tujuan pengkulturan tisu.

Penghargaan

Penghargaan khas ditujukan kepada Kementerian Pertanian dan Industri Asas Tani atas penganugerahan geran penyelidikan No. 05-03-08-SF1051 dan No. 03-05-08-SF1024. Setinggi penghargaan juga ditujukan terhadap semua ketua projek dan kolaborator serta kakitangan sokongan yang terlibat dalam melaksanakan kajian yang dinyatakan dalam artikel ini.

Bibliografi

- Bajad, S. dan Shulaev, V. (2007). Highly-parallel metabolomics approaches using LC-MS² for pharmaceutical and environmental analysis. *Trends in Analytical Chemistry* 26: 625 – 636
- Baker, J.M., Hawkins, N.D., Ward, J.L., Lovegrove, A., Napier, J.A., Shewry, P.R. dan Beale, M.H. (2006). A metabolomic study of substantial equivalence of field-grown genetically modified wheat. *Plant Biotechnology Journal* 4: 381 – 392
- Beckmann, M., Enot, D.P., Overy, D.P. dan Draper, J. (2007). Representation, comparison, and interpretation of metabolome fingerprint data for total composition analysis and quality trait investigation in potato cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 3444 – 3451

- Cuthbertson, D., Andrews, P.K., Reganold, J.P., Davies, N.M. dan Lange, B.M. (2012). Utility of metabolomics toward assessing the metabolic basis of quality traits in apple fruit with an emphasis on antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 8552 – 8560
- Dixon, R.A., Gang, D.R., Charlton, A.J., Fiehn, O., Kuiper, H.A., Reynolds, T.L., Tjeerdema, R.S., Jeffery, E.H., Germa, J.B., Ridley, W.P. dan Siber, J.N. (2006). Applications of metabolomics in agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8984 – 8994
- Dobson, G., Shepherd, T., Verrall, S.R., Griffiths, W.D., Ramsay, G., McNicol, J.W., Davies, H.V. dan Stewart, D. (2008). Phytochemical diversity in tubers of potato cultivars and landraces using a GC-MS metabolomics approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 10280 – 10291
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48: 155 – 171
- Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, W.B., Harrigan, G.G. dan Kell, D.B. (2004). Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in Biotechnol* 22: 245 – 252
- Jaganath, I.B. dan Sanimah, S. (2012). Kepesatan kemajuan teknologi omiks untuk penambahbaikan nilai nutrisi pada tanaman dan penghasilan produk novel untuk industri kesejahteraan kesihatan. *Buletin Teknologi MARDI* 2: 323 – 330
- Kusano, M., Fukushima, A., Kobayashi, M., Hayashi, N., Jonsson, P. dan Moritz, T. (2007). Application of a metabolomic method combining one-dimensional and two-dimensional gas chromatography-time of flight/mass spectrometry to metabolic phenotyping of natural variants in rice. *J. Chromatogr B. Analyt Technol Biomed Life Sci.* 855: 71 – 79
- Levine, L.H., Kasahara, H., Kopka, J., Erban, A., Fehrle, I. dan Kaplan, F. (2008). Physiologic and metabolic responses of wheat seedlings to elevated and super-elevated carbon dioxide. *Advances in Space Research* 42: 1917 – 1928
- Oikawa, A., Matsuda, F., Kusano, M., Okazaki, Y. dan Saito, K. (2012). Rice metabolomics. *Rice* 1: 63 – 71
- Patti, G., Yanes, O. dan Siuzdak, G. (2012). Metabolomics: the apogee of the omic trilogy. *Nature Review of Molecular Cell Biology* 13: 263 – 269
- Stewart, D., Shepherd, L.V.T., Hall, R.D. dan Fraser, P.D. (2011). Crops and tasty, nutritious food-how can metabolomics help. *Annual Plant Reviews* 43: 181 – 217
- Wen, W., Li, D., Li, X., Gao, Y., Li, W., Li, H., Liu, H., Chen, W., L.J. dan Yan, J. (2013). Metabolome-based genome-wide association study of maize kernel leads to novel biochemical insights. *Nature Communications* 5: 3448 – 3472
- Zhang, J., Wang, X., Yu, O., Tang, J., Gu, X., Wan, X. dan Fang, C. (2010). Metabolic profiling of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) during fruit development and maturation. *Journal of Experimental Botany* 62: 1103 – 1118

Ringkasan

Metabolomik merupakan salah satu platform sains terpenting dalam teknologi omik selain dua omik terdahulu iaitu transkriptomik dan proteomik. Pada masa kini, pendekatan metabolomik telah diaplikasi dalam pelbagai bidang termasuk kajian fungsi gen, analisis persekitaran, sains tanaman dan diagnostik klinikal. Dalam bidang pertanian, metabolomik boleh diaplikasi dalam pembiakbakaan tanaman. Ini kerana trait tanaman yang bernilai seperti rasa, aroma dan hasil yang tinggi selalunya berkait rapat dengan status dan komposisi metabolit dalam tanaman tersebut. Aplikasi teknologi ini bergantung sepenuhnya

kepada platform teknologi analitikal terkini antaranya *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR), *Liquid Chromatography-Mass Chromatography* (LC-MS), *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) dan *Fourier-Transform Infra Red* (FTIR) serta penggunaan bioinformatik yang dipanggil analisis data multivariasi atau *chemometric*. Metabolomik merupakan pendekatan terkini yang digunakan untuk memahami secara lebih komprehensif komposisi biokimia yang bersifat dinamik serta status fisiologi sesuatu sistem yang sedang dikaji terutamanya jika digandingkan dengan teknologi omik yang lain. Artikel ini membincangkan peranan dan aplikasi metabolomik khususnya dalam bidang pertanian serta beberapa penyelidikan berkaitan dengan teknologi ini yang telah dijalankan di MARDI.

Summary

Metabolomics is one of the most important science platform in the omics technology, apart from the previous omics namely transcriptomics and proteomics. Nowadays, the metabolomic approach has been applied in various fields including in the studies of gene function, environmental analysis, agricultural science and clinical diagnostics. In the field of agriculture, for instance, metabolomics can be applied in crops breeding. This is due to the fact that valuable traits of crops such as taste, aroma and high yield are often closely related with the status and composition of metabolite in the crops. This technological application depends fully on the latest analytical technology platform, such as Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Liquid Chromatography-Mass Chromatography (LC-MS), Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and Fourier-Transform Infra Red (FTIR), also the use of bioinformatics called the multivariate data analysis or chemometric. Metabolomics is one of the latest approaches used to understand comprehensively the dynamic nature of bio-chemical composition and the physiological status of a system being studied, especially if integrated with other omics technologies. This article discusses on the role and application of the metabolomics, especially in the field of agriculture, also in several researches pertinent to technology that are carried out at MARDI.

Pengarang

Sanimah Simoh

Pusat Penyelidikan Bioteknologi, Ibu Pejabat MARDI, Serdang,

Peti Surat 12301, 50774 Kuala Lumpur

E-mel: sanimah@mardi.gov.my

Alizah Zainal

Pusat Penyelidikan Bioteknologi, Ibu Pejabat MARDI, Serdang,

Peti Surat 12301, 50774 Kuala Lumpur

Zuraida Ab Rahman

Pusat Penyelidikan Bioteknologi, Ibu Pejabat MARDI, Serdang,

Peti Surat 12301, 50774 Kuala Lumpur