

## **Pencirian kimia metabolit sekunder berkait pertahanan daripada betik menggunakan Kromatografi Cecair Spektrometri Jisim Masa Penerbangan *Quadrupole* (LCMS Q-TOF)**

[Chemical profiling of defensive secondary metabolites from papaya using Liquid Chromatography Mass Spectrometry Quadrupole - Time of Flight (LCMS Q-TOF)]

Mohd Zulkhairi Azid, Razean Haireen Mohd Razali, Razali Mirad, Siti Aisyah Mohd Noor dan Nurul Ain Anuar

### **Pengenalan**

Metabolit ialah bahan yang terhasil daripada aktiviti metabolisme suatu organisma seperti tumbuhan. Dua jenis metabolit yang dihasilkan oleh tumbuhan adalah metabolit primer dan metabolit sekunder (MS). Metabolit primer dihasilkan dalam kuantiti yang banyak dan bertanggungjawab dalam tumbesaran serta pembiakan tumbuhan. Contoh metabolit primer ialah asid amino, asid nukleik dan protein. Berbeza dengan metabolit sekunder yang biasanya dihasilkan dalam kuantiti yang amat sedikit dan pada masa-masa tertentu sebagai perlindungan terhadap kemasukan patogen seperti bakteria, fungus dan virus. Selain itu, MS juga boleh bertindak untuk menarik pendebunga bagi tujuan menyerang perosak tanaman dan bertindak sebagai molekul isyarat dalam tapak jalan tindak balas tertentu tumbuhan.

Terdapat sebanyak 100,000 metabolit yang bertindak dalam sistem pertahanan tumbuhan. MS yang terdapat dalam tumbuhan dikategorikan kepada beberapa kumpulan utama seperti terpenoid, alkaloid dan fenolik. Kumpulan MS ini secara saintifiknya mempunyai sifat antiviral, antifungi dan antibakteria.

MS daripada kumpulan terpenoid merupakan kumpulan MS yang terbesar dalam tumbuhan. Lebih 22,000 sebatian kimia daripada kumpulan ini telah direkodkan, antaranya ialah monoterpenoid dan seskuiterpenoid. Kedua-dua sebatian ini merupakan sebatian kimia utama yang ditemui dalam minyak pati tumbuhan. Selain mengeluarkan bau-bauan, minyak pati yang terhasil juga bersifat toksik terhadap fungus dan bakteria. Sebagai contoh, minyak pati daripada pokok pudina (*Mentha* spp.) diketahui mengandungi MS mentol dan menthone (monoterpenoid) yang bertindak sebagai antibakteria. Selain itu, sebatian kimia *eucalyptol* yang dipencilkan daripada spesies *Vernonia amygdalina* pula didapati toksik terhadap kumbang perosak jagung (*Sitophilus zeamais*).

MS daripada kumpulan alkaloid terdiri daripada sebatian yang mempunyai rasa pahit dan lazimnya dijumpai dalam kebanyakan pokok berbatang. Antara MS daripada kumpulan alkaloid ialah kafein, kokain dan nikotin. MS seperti kafein yang

terdapat dalam pokok kopi (*Coffea arabica*), teh (*Camellia sinensis*) dan koko (*Theobroma cacao*) didapati toksik terhadap serangga dan fungus. Kajian menunjukkan 18,000 sebatian kimia daripada kumpulan alkaloid yang terkandung dalam tumbuhan herba Cina mempunyai aktiviti antiviral. Sebagai contoh, sebatian alkaloid 7-deoxy-trans-dihydronarciclasine yang dijumpai dalam spesies *Hosta plantaginea* diketahui mempunyai aktiviti antiviral terhadap *Tobacco Mosaic Virus* (TMV) dengan  $IC_{50}$  1.80  $\mu$ M. Selain itu, kapsaisin dan terbitan kapsaisinoid yang terkandung dalam genus *Capsicum* merupakan MS aktif dalam pokok cili. Sebatian ini memberikan rasa pedas dan pijar pada cili.

MS daripada kumpulan fenolik pula terhasil daripada laluan asid shikimik dan asid malonik dalam tumbuhan. Antara sebatian kimia daripada kumpulan fenolik ialah flavonoid, tanin dan kumarin. Flavonoid adalah sebatian yang boleh bertindak sebagai antioksidan. Flavonoid juga memainkan peranan memerangkap radikal bebas dan menghalang pembentukan sel kanser dan diperakui secara saintifik mempunyai aktiviti antibakteria dan dapat menghalang perosak, antaranya adalah seperti isoflavone yang dipencilkan daripada batang pokok *Pterocarpus macrocarpus* yang dapat menghalang perosak *Spodoptera litura* dan *Reticulitermes speratus*.

Tanin pula merupakan MS yang dihasilkan oleh tumbuhan dan disimpan dalam vakuol. MS ini toksik terhadap serangga kerana ia akan terikat dengan protein air liur dan enzim pencernaan serangga dan akan menyebabkan penyahaktifan protein. Manakala, MS daripada kumpulan furankumarin pula memberikan respons terhadap patogen dan pemangsa dengan mengaktifkan cahaya ultralembayung (UV) yang sangat toksik kepada pemangsa herbivor. MS ini akan mengganggu DNA pemangsa tersebut dan mengakibatkan penghapusan sel dalam badan pemangsa.

Salah satu kaedah pencirian kimia MS adalah menggunakan Kromatografi Cecair Spektrometri Jisim Masa Penerbangan *Quadrupole* (LCMS Q-TOF). Kaedah instrumentasi ini bukan sahaja pantas dan tepat, malah MS dalam sesuatu sampel dapat dikenal pasti dengan padanan pangkalan data berdasarkan maklumat jisim molekul MS tersebut. Secara teori, LCMS Q-TOF merupakan kaedah pemisahan sebatian MS berdasarkan aliran pelarut (fasa cecair) pada turus pepejal (fasa pepejal) di mana sebatian akan diasingkan pada masa yang berbeza serta pada tekanan tertentu. Masa tahanan [*retention time* ( $t_R$ )] sesuatu sebatian MS ditentukan melalui alat pengesan seperti spektrometri jisim. Spektrometri Jisim Masa Penerbangan *Quadrupole* (Q-TOF) adalah kaedah spektrometri di mana nisbah jisim kepada cas ion ditentukan melalui masa pengukuran penerbangan. Ion dipecutkan oleh medan elektrik yang telah ditetapkan kekuatannya. Kelebihan menggunakan LCMS Q-TOF berbanding dengan instrumen lain adalah amaun sampel yang

sedikit untuk proses analisis, ketepatan yang tinggi dan masa analisis yang pantas.

MS yang dibincangkan memberi fokus kepada pencirian MS dalam betik (*Carica papaya*) yang diketahui rentan terhadap virus cincin betik. Pencirian kimia bagi menentukan MS di dalam ekstrak daun betik menggunakan LCMS Q-TOF telah dibangunkan di Makmal Fitokimia, Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran, MARDI. Berdasarkan kajian saintifik terdahulu, daun betik didapati mempunyai kandungan MS yang pelbagai. Sebagai contoh, flavonoid, saponin, steroid dan tanin. Meskipun pencirian kimia menggunakan LCMS telah banyak dijalankan, namun pembangunan yang telah dijalankan dengan sedikit pengubahsuaian diharap dapat membantu para penyelidik untuk mengetahui MS yang bertindak dalam sistem pertahanan spesies ini terhadap kemasukan virus.

### Penyediaan sampel

Sampel daun daripada betik yang telah diinokulat dengan virus cincin betik dipetik pada hari kelima (D5) dan kesepuluh (D10) selepas inokulasi dan sampel daun dihiris halus.

*Gambar 1* menunjukkan simptom virus cincin betik yang dikesan pada sampel D10. Sampel dikeringkan menggunakan kaedah sejuk dingin beku (Model; Labconco FreeZone -105 °C 4.5 L Cascade Benchtop, Amerika Syarikat) selama tiga hari. Sampel dikisar sehingga menjadi serbuk halus dengan menggunakan pengisar mikro (Model; Ika Werke MF 10 Basic, Jerman). Sampel disimpan di dalam peti sejuk pada suhu 4 °C sehingga proses pengeskrakan dijalankan.

### Pengeskrakan sampel

Sebanyak 0.1 g serbuk D5 dan D10 yang telah dikisar ditimbang. Sampel daun diekstrak menggunakan campuran beberapa pelarut organik pada nisbah 20:79:1 (metanol: isopropanol: asid asetik) di dalam tiub pengempas. Sampel dieskrak menggunakan pengeskrak ultrasonik selama satu jam sebelum diemparkan pada kelajuan 10,000 putaran/minit (rpm) selama 10 minit dan dua lapisan akan terhasil. Lapisan atas ditapis dan dikeringkan dengan kaedah sejuk dingin beku. Ekstrak yang telah dikeringkan dilarutkan dengan campuran 85% air dan 15% asetonitril (ACN) sebelum dianalisis menggunakan LCMS Q-TOF.

### Parameter LCMS Q-TOF

Sebanyak 5 µl sampel yang telah ditapis dianalisis menggunakan sistem Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies) yang disambungkan dengan Agilent 6540 Accurate-Mass Q-TOF. Sampel diletakkan



*Gambar 1. Pokok betik yang menunjukkan simptom virus cincin betik*

di dalam bekas sampel dan sistem ditetapkan pada suhu 4 °C bagi menjamin kestabilan sampel sepanjang proses analisis dijalankan. Parameter bagi proses pemisahan MS untuk ekstrak betik adalah seperti dalam *Jadual 1*. Manakala, parameter bagi pengesanan (*detector*) spektrometri jisim adalah seperti dalam *Jadual 2*.

Jadual 1. Parameter bagi LC untuk proses analisis menggunakan LCMS Q-TOF

Kolum	<i>Kinetex reverse phase C18 (4.6 mm × 100 mm; 2.6 m, Phenomenex)</i>
Pelarat	A: 0.1% Asid formik dalam air B: 0.1% Asid formik dalam asetonitril (ACN)
Kadar aliran	0.5 mL/minit Permulaan aliran: 5% pelarat B dan ditingkatkan secara linear kepada 85%
Masa pemisahan	25 minit dengan 10 minit masa selepas aliran ( <i>post run</i> )

Jadual 2. Parameter MS untuk proses analisis menggunakan LCMS Q-TOF

Mode	Positif <i>Electrospray ionization (ESI)</i>
Tekanan	45 psi
Aliran gas nitrogen	10 L/minit pada suhu 300 °C
<i>QTOF Acquisition</i>	Auto MS/MS ( <i>data-dependent</i> ) <i>High Resolution (4 GHz), 2 spektra/saat</i>
<i>Mass to charge ratio (m/z)</i>	50 – 1000

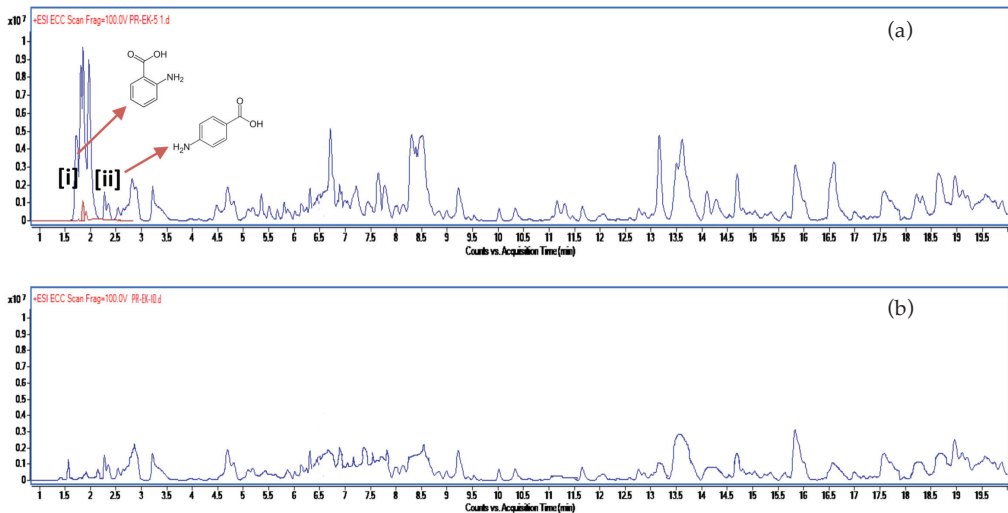
Analisis jisim molekul yang diperolehi dianalisis menggunakan perisian *Mass Hunter Qualitative*. MS yang diperolehi berdasarkan jisim molekul dibandingkan dengan pangkalan data sedia ada [*Metlin-Scripps, PCDL (Mass Hunter Personal Compound Database and Library - Agilent Technologies)*].

### **Pencirian MS daripada betik**

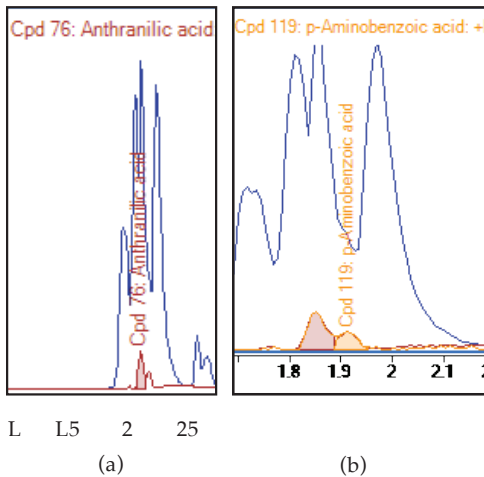
Analisis daripada LCMS Q-TOF dan perbandingan dengan pangkalan data mendapati sebanyak 265 MS daripada betik telah diperincikan. Berdasarkan pangkalan data *Metlin-Scripps, PCDL*, beberapa MS yang terlibat dalam sistem pertahanan tumbuhan telah dikenal pasti pada sampel daun D5 dan D10. *Rajah 1* menunjukkan kromatogram bagi sampel daun betik pada D5 dan D10 yang dikaitkan dengan kebanyakan sistem pertahanan tumbuhan. Berdasarkan perbandingan berat jisim molekul MS [i] dan [ii] dengan padanan daripada pangkalan data, MS [i] dan [ii] masing-masing dikenal pasti sebagai asid antranilik (AA) dan *p*-aminobenzoik asid (*p*ABA).

*Rajah 2* menunjukkan pengembangan kromatogram bagi AA dan *p*ABA dalam daun betik. Berdasarkan rajah tersebut, masa tahanan [*retention time (t<sub>R</sub>)*] bagi AA dan *p*ABA adalah dikesan pada 1.851 minit dan 1.915 minit.

Kajian ini mengesan AA dan *p*ABA pada hari kelima (D5) selepas betik diinokulat dengan virus cincin betik. Pada ketika ini tiada sebarang simptom virus cincin betik yang dapat diperhatikan. Walau bagaimanapun, AA dan *p*ABA tidak dikesan dalam sampel yang menunjukkan simptom virus cincin betik iaitu pada hari kesepuluh selepas inokulasi. Berdasarkan keputusan ini, AA dan *p*ABA jelas dapat dikaitkan dengan peranannya dalam memberi pertahanan terhadap virus di dalam betik. Berdasarkan kajian oleh penyelidik-penyelidik lain, kedua-dua MS, AA dan *p*ABA yang merupakan asid benzoik dikaitkan dengan sistem pertahanan tumbuhan. AA merupakan prekursor bagi penghasilan MS lain dalam sistem pertahanan tumbuhan. Sebagai contoh, terbitan N-metilantranilik asid ditemui dalam rembesan pertahanan tumbuhan *Typhloiulus orpheus*. Manakala, *p*ABA pula merupakan MS daripada kumpulan asid benzoik ataupun dikenali sebagai vitamin B<sub>x</sub>. Dalam kajian lain, serangan daun pokok cili (*Capsicum annuum*) yang telah diinokulat dengan bakteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*) dan virus mozek timun didapati berkurang dengan aplikasi *p*ABA. Selain itu, tanaman tomato (*Solanum lycopersium*) juga didapati resistan terhadap bakteria *Pseudomonas syringae* pv setelah dirawat dengan *p*ABA.



Rajah 1. Kromatogram LCMS Q-TOF bagi ekstrak daun betik yang telah diinokulat dengan virus cincin betik. Kromatogram (a) daun pada hari kelima (D5) dan (b) daun pada hari kesepuluh (D10)



Rajah 2. Pengembangan kromatogram LCMS Q-TOF untuk daun betik pada D5; (a) MS AA,  $t_R$ : 1.851 minit; (b) MS pABA,  $t_R$ : 1.915 minit

Pelbagai kaedah bagi penentuan MS telah dijalankan oleh penyelidik dunia dalam mengenal pasti kandungan MS yang bertindak dalam sistem pertahanan tumbuhan. Antara kaedah analisis yang pernah dijalankan adalah menggunakan *Gas Chromatography Mass Spectrometry* (GC-MS) dan *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR). Namun kaedah analisis menggunakan LCMS Q-TOF yang telah dibangunkan mempunyai kelebihan dari segi penyediaan sampel yang sedikit, masa yang lebih cepat dan penentuan MS yang tepat. Parameter yang dibangunkan dengan sedikit pengubahsuaian ini diharap dapat memberi panduan kepada para penyelidik yang ingin membuat pencirian metabolit sekunder berkaitan pada masa hadapan.

## Kesimpulan

Penentuan metabolit sekunder yang bertindak dalam sistem pertahanan tumbuhan menggunakan LCMS Q-TOF merupakan teknik yang sesuai untuk digunakan kerana keputusan yang tepat. Selain mendapat padanan berdasarkan pangkalan data sedia ada, teknik ini juga hanya memerlukan sampel yang sedikit bagi proses analisis. Pengubahsuaian dari segi kaedah pengekstrakan dan parameter LCMS Q-TOF merupakan pembangunan yang telah dicapai dalam kajian ini. Oleh itu, hasil penemuan ini diharap dapat membantu para penyelidik dalam menentukan metabolit sekunder yang dikehendaki.

## Bibliografi

- Adeyemi, M.M.H. (2011). *A Review of Secondary Metabolites from Plant Materials for Post Harvest Storage* 6(2): 94 – 102
- Bodner, M., Vagalinski, B., Makarov, S.E. dan Raspotnig, G. (2017). Methyl N-methylantranilate: major compound in the defensive secretion of *Typhloiulus orpheus* (Diplopoda, Julida). *Chemoecology* 27(4): 171 – 175
- Goodwin, P.H., Trueman, C., Loewen, S.A. dan Tazhoor, R. (2018). Variation in the responsiveness of induced resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato by *Solanum lycopersicum* treated with para-aminobenzoic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 104: 31 – 39
- Razean Haireen, M.R., Zulkhairi, A.M., Razali, M., Rogayah, S., Mohd Shukri, M.A., Mohd Azhar, H. dan Nurul Ain, A. (2019). Screening of PRSV-P resistance and profiling of defensive secondary metabolites in *Carica papaya* and interspecific hybrid of *Vasconcellea*. *Asian Journal of Biotechnology and Genetic Engineering* 2(4): 1 – 11
- Morimoto, M., Fukumoto, H., Hiratani, M., Chavasiri, W. dan Komai, K. (2006). Insect antifeedants, pterocarpan and pterocarpol, in heartwood of *Pterocarpus macrocarpus* Kruz. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 70(8): 1864 – 1868

- Shubham, S., Mishra, R., Gautam, N., Nepal, M., Kashyap, N. dan Dutta, K. (2019). *EC DENTAL SCIENCE Research Article Phytochemical Analysis of Papaya Leaf Extract: Screening Test 3*: 485 – 490
- Song, G.C., Choi, H.K. dan Ryu, C.M. (2013). The folate precursor para-aminobenzoic acid elicits induced resistance against Cucumber mosaic virus and *Xanthomonas axonopodis*. *Annals of Botany* 111(5): 925 – 934
- Wang, Y.H., Zhang, Z.K., Yang, F M., Sun, Q.Y., He, H.P., Di, Y.T. dan Hao, X.J. (2007). Benzylphenethylamine alkaloids from *Hosta plantaginea* with inhibitory activity against tobacco mosaic virus and acetylcholinesterase. *Journal of Natural Products* 70(9): 1458 – 1461

### Ringkasan

Tumbuhan menghasilkan metabolit sekunder apabila dalam keadaan tekanan biotik seperti serangan oleh patogen (fungus dan bakteri). Kumpulan metabolit sekunder seperti alkaloid, terpenoid dan fenolik merupakan metabolit sekunder yang berperanan penting dalam sistem pertahanan tumbuhan. Pencirian kimia metabolit sekunder menggunakan LCMS Q-TOF merupakan kaedah pencirian yang tepat dan cepat berdasarkan padanannya dengan pangkalan data sedia ada. Selain itu, amaun sampel bagi analisis juga adalah sedikit. Pencirian kimia metabolit sekunder daripada spesies *Carica papaya* yang telah diinokulat dengan virus cincin betik telah dijalankan bagi menentukan metabolit yang berpotensi dalam mempertahankannya daripada serangan virus tersebut. Berdasarkan analisis LCMS Q-TOF yang dijalankan, dua metabolit sekunder yang bertindak terhadap serangan virus cincin betik ialah asid antranilik dan *p*-aminobenzoik asid. Pencirian kimia kedua-dua metabolit sekunder tersebut ditentukan berdasarkan padanan data jisim molekul dengan pangkalan data sedia ada. Pencirian kimia metabolit sekunder menggunakan LCMS Q-TOF yang telah dibangunkan dengan sedikit pengubahsuaian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai panduan bagi membantu para penyelidik dalam menentukan metabolit sekunder dalam tumbuhan lain pada masa akan datang.

### Summary

Plants produce secondary metabolites under biotic stress such as infestation by pathogens (fungus and bacteria). Secondary metabolites such as alkaloids, terpenoids and phenolics are amongst the important secondary metabolites for defense system in plants. LCMS Q-TOF is such a fast and accurate method used for chemical characterization of secondary metabolites based on its similarity to the existing database. In addition, only small amount of sample is needed for sample preparation in the analysis. In this study, the potential defensive secondary metabolites of *Carica papaya* towards papaya ringspot virus attack was determined by chemical characterization using LCMS Q-TOF. Results of the analysis showed that two secondary metabolites; anthranilic acid and *p*-aminobenzoic acid were present in *Carica papaya* as a response to the virus attack. This was based on the similarity of its molecular mass to the existing database. Development of this chemical characterization of secondary metabolites using LCMS Q-TOF with some modification hopefully will benefit other researchers in determining secondary metabolites of other plants in the future.

**Pengarang**

Mohd Zulkhairi Azid

Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM

43400 Serdang, Selangor

E-mel: zulkhairi@mardi.gov.my

Razali Mirad dan Siti Aisyah Mohd Noor

Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM

43400 Serdang, Selangor

Razeen Haireen Mohd Razali (Dr.) dan Nurul Ain Anuar

Pusat Penyelidikan Tanaman Industri

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM

43400 Serdang, Selangor