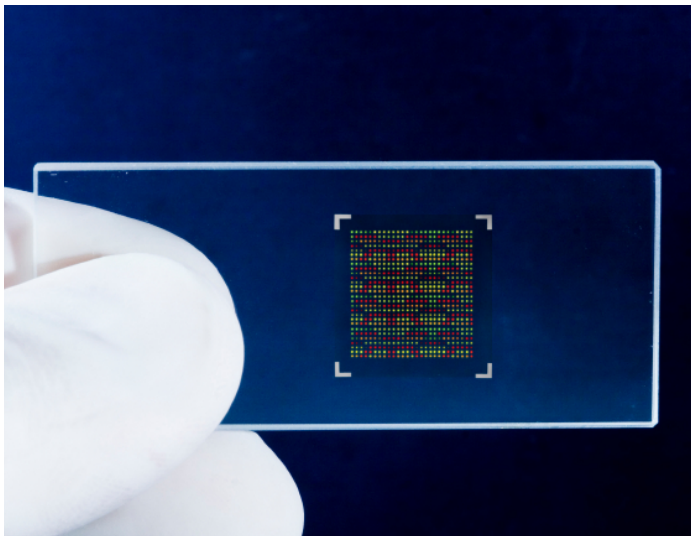


IV. Analisis Microarray

Dalam perkembangan biologi, setelah proyek pemetaan genom manusia selesai, data yang didapatkan begitu banyak disimpan dalam sebuah microchip kecil yang ukurannya seperti korek api. Pengembangan chip DNA tersebut dinamakan microarray.



Microarray merupakan chip yang berukuran kecil yang terbuat dari lempengan kaca yang berisi ribuan bahkan puluhan ribu macam gen dalam bentuk fragmen DNA yang berasal dari penggandaan cDNA. Fragmen DNA yang memuat gen tersebut dapat mengenali gen dalam suatu sampel jaringan yang dianalisis. Pola ekspresi suatu gen dalam jaringan yang berbeda pun juga dapat diamati dengan menggunakan teknik ini.

Biologi molekuler dan biomedis menggunakan *microarray* untuk mengetahui dan meneliti perbedaan penyakit. *Microarray* dapat memeriksa ribuan gen dalam waktu yang sama serta membantu mengidentifikasi gen yang terlihat pada sel yang berbeda dan mencari hubungan antara masing-masing gen. Kebanyakan sel yang ada dalam tubuh manusia berisikan gen yang sama, akan tetapi tidak semua gen terpakai di dalam setiap sel. Ada beberapa gen yang aktif atau muncul ketika

dibutuhkan saja. Teknologi *microarray* digunakan untuk mengetahui perbedaan gen yang aktif atau tidak pada suatu sel

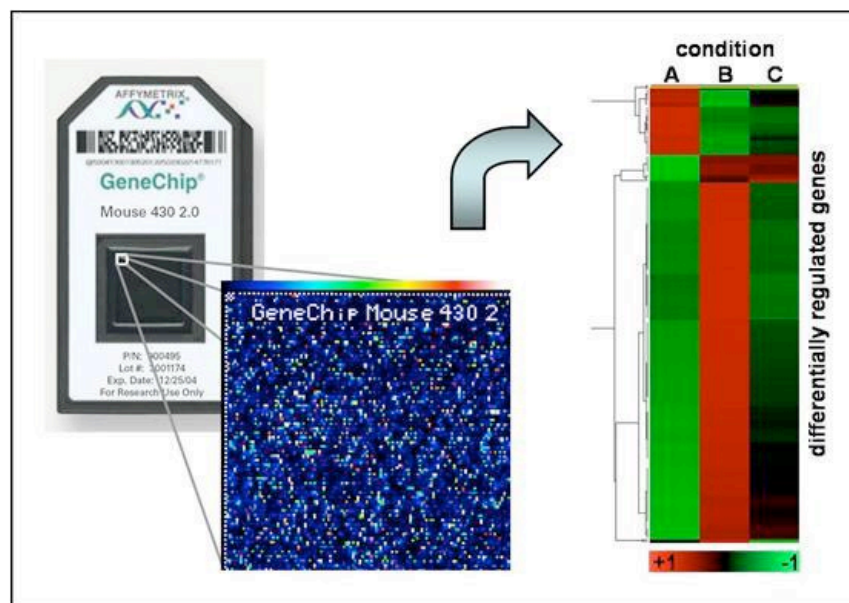
Teknologi ini memanfaatkan kumpulan array yang berjumlah ribuan yang berisi nukleotida DNA yang berfungsi sebagai probe. Probe data adalah suatu kumpulan fragmen DNA atau RNA atau protein pelacak target gen. DNA Probe yang telah dilabel akan berkomplementasi dengan target melalui proses hibridisasi sehingga dapat mendeteksi keberadaan gen tertentu. Sebenarnya prinsip kerja dari *microarray* adalah mengukur jumlah hibridisasi mRNA pada cDNA dalam chip tersebut. Hibridisasi asam nukleat adalah salah satu metode analisis yang paling sering digunakan. Tujuan metode ini adalah untuk melihat (visualisasi) sekuens asam nukleat tertentu (DNA atau RNA) dalam lingkungan/latar belakang campuran sekuens lain yang kompleks.

Reaksi hibridisasi adalah proses dimana single stand asam nukleat yang komplementer dapat dengan mudah membentuk double stand kembali. Pada reaksi hibridisasi rangkaian asam nukleat yang komplementer dengan konsentrasi rendah tetap dapat terdeteksi asalkan digunakan DNA probe sebagai indikatornya. Teknik hibridisasi ini juga dapat di gunakan untuk mencari gen yang tidak identik namun mempunyai suatu hubungan. Selain itu, DNA probe dapat digunakan untuk menyelidiki ekspresi gen (dalam reaksi hibridisasi dengan RNA). Hibridisasi DNA probe dengan RNA sel memungkinkan aktif tidaknya suatu gen. Contohnya dalam kasus Pencocokkan DNA nukleotida ke gen berbeda yang diletakkan pada satu *microarray*. mRNA kemudian diekstraksi dari sel yang disintesis ke DNA komplementer dengan *enzyme reverse* transcriptase dan diberikan label dengan tanda yang bercahaya kemudian dihibridisasi, cahaya akan membantu untuk menunjukkan gen yang aktif pada sel. Gen yang muncul antara susunan orang sakit dan susunan orang sehat dapat menunjukkan penyebab penyakit.

Oligonukleotida merupakan seberkas pendek polimer nukleotida (DNA atau RNA) yang sering digunakan sebagai primer atau sebagai penuntun probe pada berbagai teknik analisis deteksi dalam biologi molekular. Ukurannya biasanya antara 5 sampai 20 basa N (biasa ditulis 10-mer untuk oligo dengan 10 basa, "-mer" kependekan dari "primer"). Dalam analisis deteksi, oligo yang telah disambung dengan zat penghasil signal (probe) akan mengenali urutan DNA atau RNA

komplemennya. *Microarray* DNA Oligonucleotida dapat menjadi dua subkelompok: long oligonucleotide *arrays*, yang *probenya* terdiri dari 60-mer atau 50-mer sekuens DNA (contoh Illumina Beadarray), dan *short oligonucleotide arrays* yang menggunakan 25-mer (misal *Affymetrix GeneChip*) atau 30-mer dari desain urutan *probe*. Pada chip Affymetrix, masing-masing probe memiliki 8-20 pasang rangkaian DNA dengan basis tengah berubah antara pasangan cocok sempurna dan ketidakcocokan. Nilai untuk tingkat ekspresi probe diambil sebagai rata-rata di atas pasang pasangan yang cocok sempurna (PM) dan ketidakcocokan (MM). Nilai intensitas diperoleh dengan membaca dalam serangkaian file Csx Affymetrix, data mentah dari scanner Affymetrix disimpan dalam file DAT, sedangkan data yang diproses tersimpan dalam bentuk CEL, di mana kita akan bekerja dengan Paket Affy yang memiliki fasilitas untuk membaca data dari vektor menetapkan beberapa file CEL dihasilkan oleh scanner Affymetrix.

Pada umumnya analisis dengan menggunakan microarray menggunakan dua sampel yang berbeda, misalnya sel kulit normal dengan sel kanker kulit. Kedua sampel tersebut diisolasi mRNA-nya dan kemudian diletakkan dalam chip microarray. Kemudian chip tersebut diberi penanda radioaktif untuk menghasilkan warna fluoresens setelah dilakukan scanner yang terhubung dengan komputer. Kemudian komputer akan menganalisis kedua sampel tersebut berdasarkan pola warna yang ada.



Keterangan:

Titik merah = gen tersebut diekspresikan hanya dalam kondisi berpenyakit

Titik hijau = gen tersebut diekspresikan hanya dalam kondisi normal

Titik kuning = gen tersebut dinyatakan dalam kedua kondisi

Bintik hitam = tidak ada ekspresi gen dalam kedua kondisi

Contoh :

Langkah pertama adalah melakukan instalasi package *affy* dan *ALLMLL*. Package *affy* berfungsi untuk eksplorasi analisis array oligonukleotida dan *ALLMLL* menyediakan probe data dengan 20 array HGU133A and 20 array HGU133B.

```
source("http://bioconductor.org/biocLite.R")
biocLite("affy")
biocLite("ALLMLL")
```

Setelah itu, dipilih data MLL.B dari package ALLMLL yang berisi 20 sample.

```
> data(MLL.B, package = "ALLMLL")
> MLL.B
AffyBatch object
size of arrays=712x712 features (22 kb)
cdf=HG-U133B (22645 affyids)
number of samples=20
number of genes=22645
annotation=hgu133b
```

Untuk menampilkan nama slot dari data MLL.B dapat menggunakan perintah *slotNames(object)*. Dari hasil slot ini. Kita dapat mengetahui informasi dari objek yang digunakan.

```
> slotNames(MLL.B)
[1] "cdfName"          "nrow"             "ncol"             "assayData"
[5] "phenoData"        "featureData"      "experimentData"    "annotation"
[9] "protocolData"     ".__classVersion__"
```

Intensitas Probe mentah tersedia di *exprs(MLL.B)*, yang mengekstrak intensitas probe dari objek MLL.B. Jumlah baris dan kolom dari nilai-nilai ekspresi MLL.B dapat diperoleh dengan fungsi *dim*.

```
> dim(exprs(MLL.B))
[1] 506944      20
```

Dari hasil perintah *slotNames*, kita bisa mengetahui informasi tambahan seperti *cdfName*, *phenoData* dsbnya.

```
> phenoData(MLL.B)
An object of class 'AnnotatedDataFrame'
 sampleNames: JD-ALD009-v5-U133B.CEL JD-ALD051-v5-U133B.CEL ...
               JD-ALD520-v5-U133B.CEL (20 total)
  varLabels: sample
 varMetadata: labelDescription
> cdfName(MLL.B)
[1] "HG-U133B"
```

Untuk mengetahui nama dari probe data 1 hingga 10 dapat menggunakan perintah

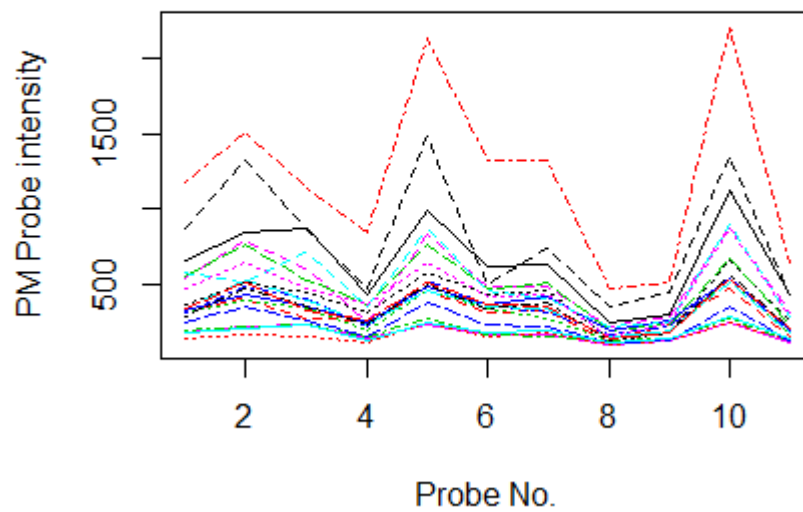
```
> probeNames(MLL.B)[1:10]
[1] "200000_s_at" "200000_s_at" "200000_s_at" "200000_s_at" "200000_s_at" "2
00000_s_at"
[7] "200000_s_at" "200000_s_at" "200000_s_at" "200000_s_at"
```

Nilai-nilai PM dan MM dikumpulkan oleh fungsi *pm* dan *mm*. Untuk mencetak nilai-nilai PM dari lima baris pertama probe dengan identifier 200000_s_at dapat menggunakan perintah berikut.

```
> pm(MLL.B,"200000_s_at")[1:5,1:2]
               JD-ALD009-v5-U133B.CEL JD-ALD051-v5-U133B.CEL
200000_s_at1                661.5                321.5
200000_s_at2                838.8                409.3
200000_s_at3                865.3                275.5
200000_s_at4                425.8                253.5
200000_s_at5                986.8                452.3
```

Dengan fungsi *matplot* tampilan cepat tentang variabilitas data di dalam dan di antara probe dapat diperoleh. Seperti pada gambar dibawah dengan menggunakan perintah :

```
matplot(pm(MLL.B,"200000_s_at"),type="l", xlab="Probe No.", ylab=
"PM Probe intensity")
```



Dari plot yang dihasilkan, dapat diamati bahwa data memiliki variabilitas yang besar. Kepadatan plot log dari nilai-nilai Probe dapat diperoleh dengan hist (MLL.B) yang akan menghasilkan plot dibawah ini. Dari plot kepadatan log dari data intensitas pada Gambar bahwa ini cukup condong ke kiri.

