

Week 3 - Case Analysis

A. Pendahuluan

Perkembangan teknologi *high-throughput* seperti *microarray* dan *Next-Generation Sequencing* (NGS) telah memungkinkan identifikasi ribuan gen secara simultan. Namun, teknologi ini menghasilkan daftar data yang sangat besar, sehingga diperlukan metode bioinformatika untuk menerjemahkan data numerik tersebut ke dalam pemahaman biologis yang bermakna. Analisis ekspresi gen sering kali menghasilkan daftar *Differentially Expressed Genes* (DEGs), yaitu gen-gen yang mengalami perubahan ekspresi signifikan secara statistik antara dua kondisi biologis yang berbeda.

Untuk memahami mekanisme di balik DEGs tersebut, digunakan pendekatan analisis fungsional melalui *Gene Ontology* (GO) dan KEGG *Pathway Analysis*.

1. **Gene Ontology (GO)**: menyediakan kosakata terstruktur untuk mendeskripsikan peran gen dalam tiga domain utama:
 - a. **Biological Process** (BP): Fenomena biologis yang dicapai melalui satu atau lebih rangkaian aktivitas molekuler (misal: mitosis, metabolisme purin, atau respon imun).
 - b. **Molecular Function** (MF): Aktivitas fisik atau kimia dari produk gen pada tingkat molekuler (misal: aktivitas katalitik, pengikatan reseptor/binding, atau aktivitas transporter).
 - c. **Cellular Component** (CC): Lokasi spesifik di dalam struktur sel tempat produk gen aktif (misal: mitokondria, ribosom, atau nukleus).
2. **KEGG Pathway**: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* merupakan database referensi yang memetakan gen ke dalam jalur metabolisme, jalur persinyalan, dan proses seluler. KEGG merepresentasikan interaksi molekuler kompleks di dalam sel yang menggambarkan bagaimana gen-gen bekerja sama dalam satu sistem sistemik.

Aplikasi Klinis dan Personalized Drug Therapy: Integrasi dari analisis GO dan KEGG bertujuan untuk mendukung pengembangan *Personalized Drug Therapy* (Kedokteran Presisi). Dengan mengetahui jalur biologis spesifik yang terganggu pada individu tertentu, klinisi dapat menentukan target pengobatan yang lebih akurat dan personal berdasarkan profil genetik unik pasien, bukan lagi menggunakan pendekatan "satu obat untuk semua orang" (*one-size-fits-all*).

B. Metode Analisis

Metode dalam praktikum ini dibagi menjadi dua tahap utama: identifikasi fungsional gen melalui analisis *enrichment* dan visualisasi jalur biologis secara interaktif.

1. Persiapan Data dan Lingkungan Kerja (R & Bioconductor)

Sebelum melakukan analisis jalur, dilakukan persiapan data menggunakan bahasa pemrograman R untuk menghasilkan daftar gen yang terekspresi secara diferensial (*Differentially Expressed Genes* atau DEGs).

- a. **Instalasi Perangkat Lunak:** Menyiapkan **R** sebagai mesin pemrosesan data dan **RStudio** sebagai antarmuka kerja (*interface*).
- b. **Manajemen Paket (Bioconductor):** Menginstal BiocManager untuk mengakses pustaka khusus bioinformatika yang tidak tersedia di repositori CRAN standar.
- c. **Pemuatan Library Utama:**
 - 1) limma: Digunakan sebagai mesin statistik untuk membangun model linear, menghitung *P-value*, dan menentukan DEG.
 - 2) GEOquery: Digunakan untuk mengunduh dataset ekspresi gen secara langsung dari database NCBI Gene Expression Omnibus (GEO).
 - 3) ggplot2 & pheatmap: Digunakan untuk memvisualisasikan distribusi data melalui *volcano plot* dan *heatmap*.
- d. **Pra-pemrosesan Data:** Data mentah dikonversi ke skala log2 untuk menstabilkan varians dan memastikan data memenuhi asumsi model statistik.
- e. **Gene ID Conversion:** Melakukan pemetaan (*mapping*) ID probe (misalnya format Illumina atau Affymetrix) ke dalam *Gene Symbol* atau *Entrez ID* agar dapat dikenali oleh sistem anotasi fungsional.

2. Analisis Fungsional dengan g:Profiler

Analisis ini bertujuan untuk menentukan apakah suatu istilah *Gene Ontology* (GO) atau jalur KEGG muncul lebih sering dari yang diharapkan secara kebetulan (*Enrichment Test*).

- a. **Input Query:** Mengakses laman **g:Profiler**, kemudian memasukkan daftar ID gen (misal: ID Illumina) yang telah diurutkan berdasarkan nilai *Log Fold Change* (LogFC) ke dalam kolom *Query*.
- b. **Konfigurasi Parameter:** Organisme pilih *Homo sapiens*.
- f. **Eksekusi:** Klik **Run Query** untuk menjalankan algoritma statistik.
- g. **Evaluasi Hasil:** Hasil dievaluasi melalui **Manhattan Plot**. Jalur dengan nilai padj terkecil (paling signifikan) diidentifikasi,

3. Visualisasi Jalur dengan KEGG Mapper – Color Tool

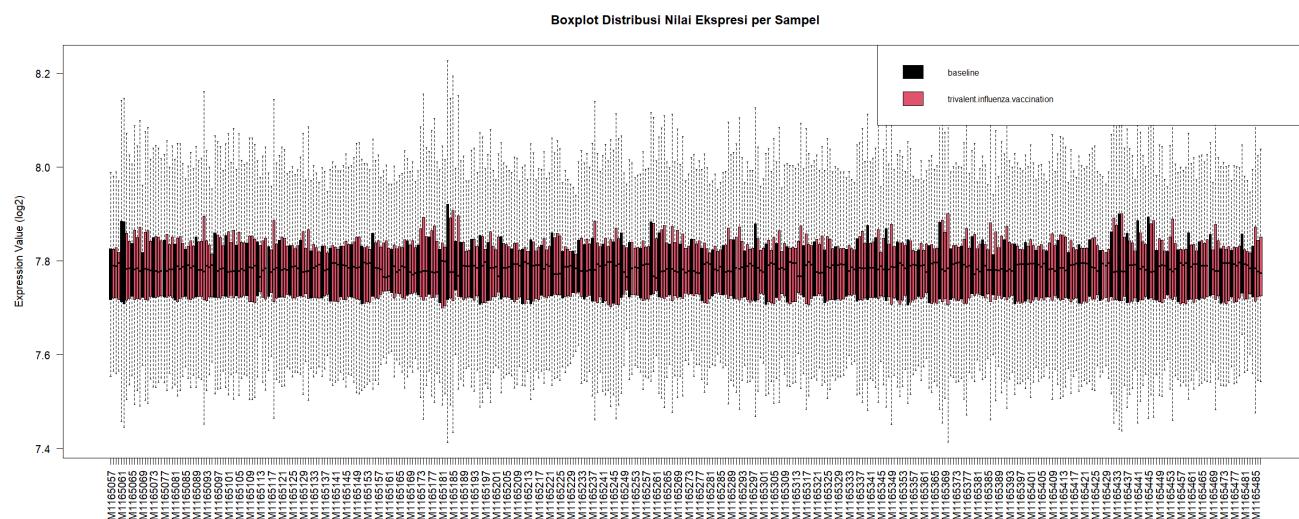
Tahap ini bertujuan untuk memetakan gen-gen terpilih ke dalam diagram jalur koordinasi seluler guna melihat interaksi antar gen secara visual.

- a. **Akses Tool:** Membuka menu KEGG Mapper – Color Tool.
- b. **Pewarnaan Gen (Color Specification):** Memasukkan daftar ID gen ke kotak input dengan menambahkan keterangan warna secara manual:
 - 1) ID_GEN red: Untuk gen yang mengalami peningkatan ekspresi (*upregulated*).
 - 2) ID_GEN yellow: Untuk gen yang mengalami penurunan ekspresi (*downregulated*).
- c. **Konfigurasi Mapping:** Mencentang opsi **Include aliases** untuk memastikan ID Illumina dapat dipetakan secara akurat ke dalam ID internal database KEGG.
- d. **Visualisasi:** Klik **Exec** untuk menghasilkan peta jalur (pathway) yang berwarna, yang menunjukkan posisi gen dalam sistem biologis yang relevan.

C. Hasil dan Interpretasi

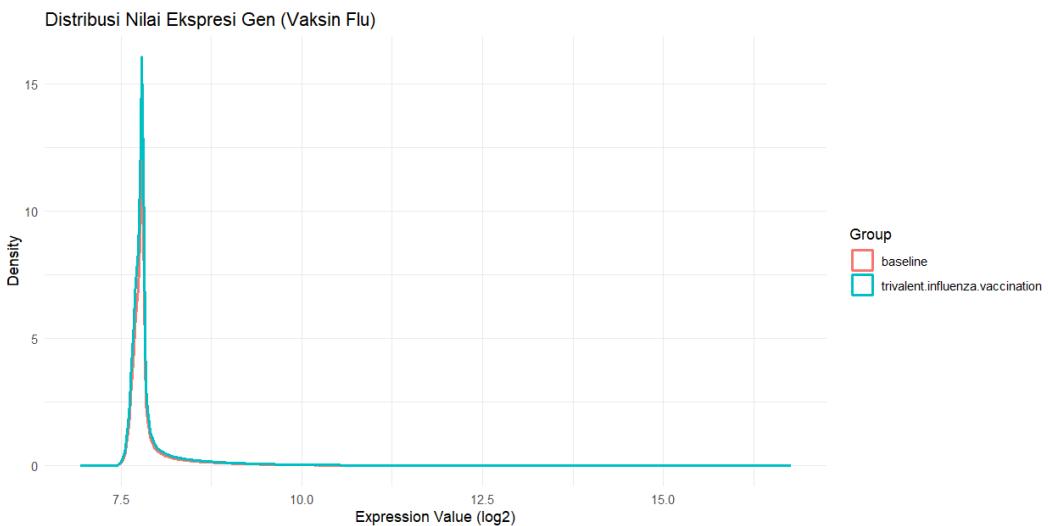
Modul	: Analisis Ekspresi Gen Respon Vaksin Flu
Dataset	: GSE48018 (Vaccine vs Baseline)
Platform	: Microarray (Illumina HumanHT-12 V4.0 - GPL10558)
Tujuan	: Mengidentifikasi Differentially Expressed Genes (DEG)

1. Boxplot



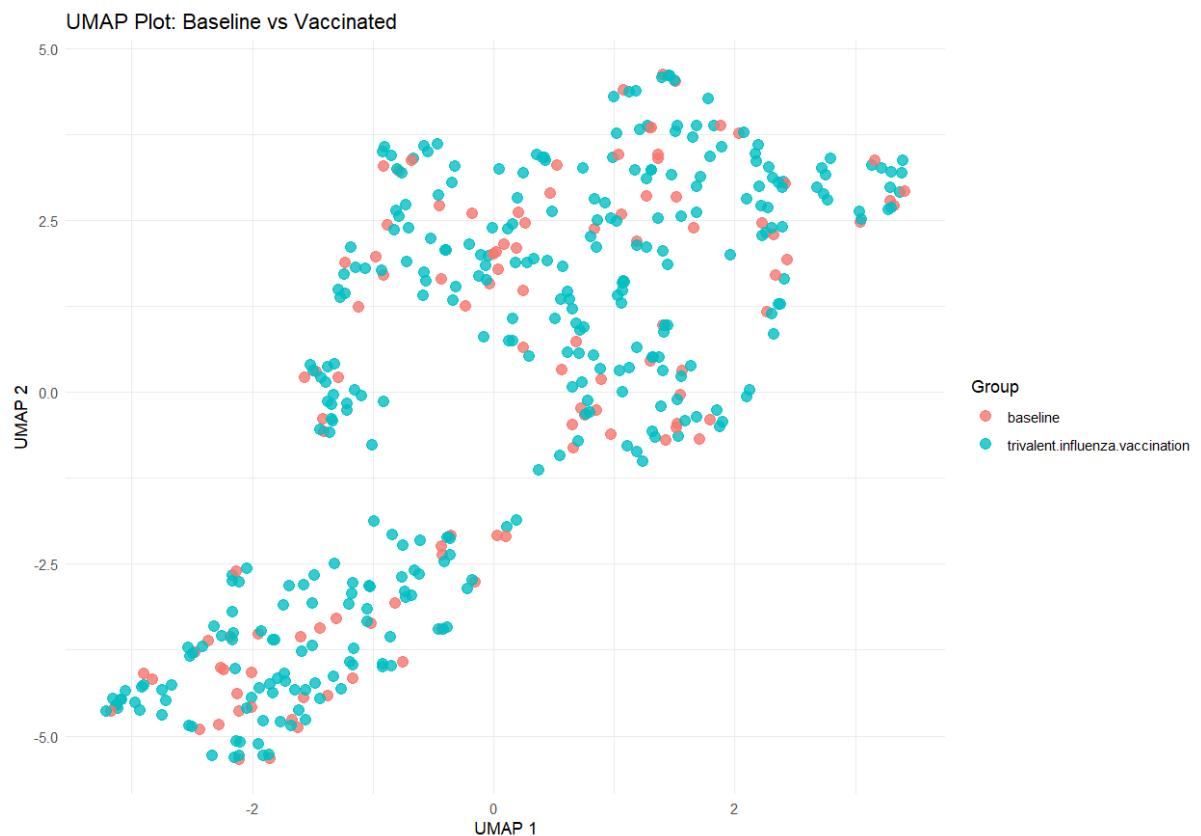
Interpretasi: Tinggi kotak dan garis median antar sampel terlihat sejajar (rata), artinya **proses normalisasi berhasil**. Hal ini memastikan bahwa perbedaan ekspresi yang muncul nanti benar-benar karena faktor biologis, bukan karena kesalahan teknis alat.

2. Density Plot



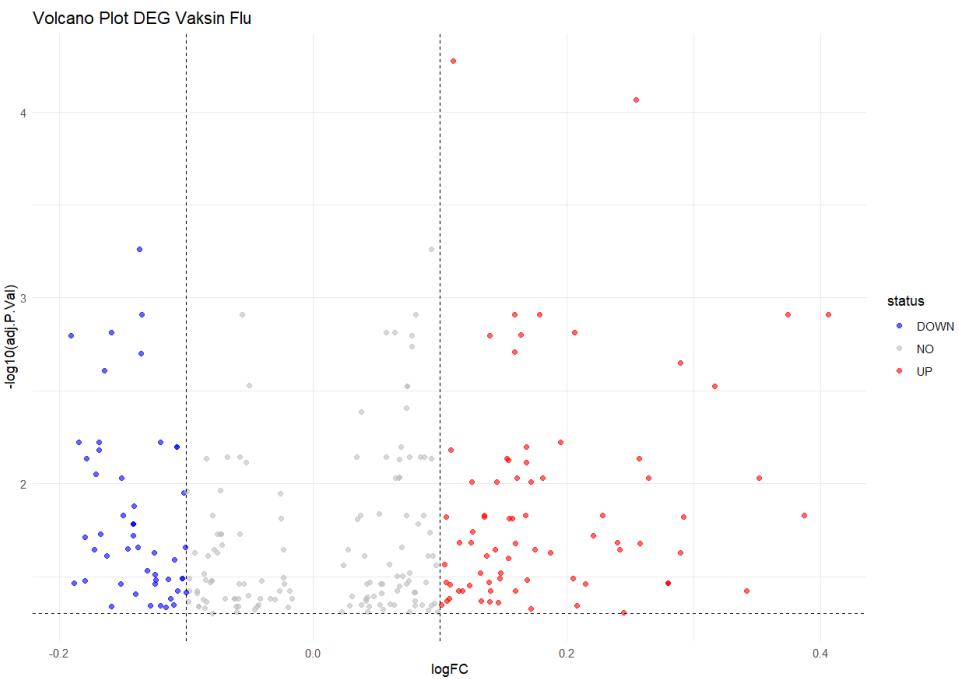
Interpretasi: Kurva menumpuk di area yang sama, berarti **distribusi data sudah seragam** dan siap untuk dianalisis lebih lanjut menggunakan model linear (*limma*).

3. UMAP Plot



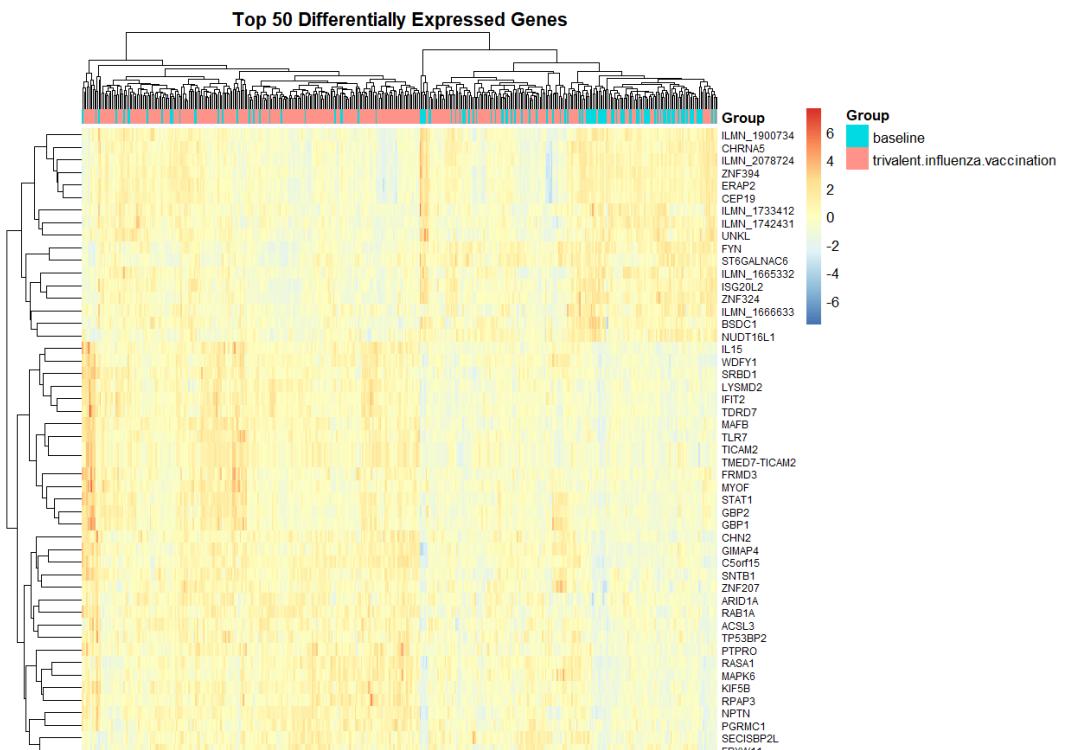
Interpretasi: Titik-titik berkelompok sesuai warnanya, berarti **ada perbedaan profil genetik yang nyata** antar kelompok tersebut. Ini membuktikan bahwa perlakuan memberikan efek yang konsisten.

4. Volcano Plot



Interpretasi: Gen yang berada di pojok kanan atas (merah) adalah gen yang naik signifikan, sedangkan di pojok kiri atas (biru) adalah gen yang turun signifikan. Titik abu-abu adalah gen yang tidak berubah secara bermakna.

5. Heatmap (urutan DEG teratas)



Interpretasi: Heatmap memungkinkan kita melihat pola genetik. Terdapat blok warna merah yang konsisten pada kelompok pasien tertentu, gen-gen tersebut bisa dijadikan **biomarker** untuk diagnosis atau target terapi terpersonalisasi.

6. Gen Up-regulated

No	ID	adj,P,Val	P,Value	t	B	logFC	Gene,symbol	Gene,title
1	ILMN_2123312	0,00159	5,89E-07	5,07	509.181	0,191	ERAP2	endoplasmic reticulum aminopeptidase 2
2	ILMN_1716105	0,03427	1,15E-04	3,89	0,06112	0,1886	NLRP12	NLR family pyrin domain containing 12
3	ILMN_2288483	0,006	3,71E-06	4,69	3.325	0,1848	CEP19	centrosomal protein 19
4	ILMN_2070052	0,03325	1,05E-04	3,92	0,14386	0,1803		
5	ILMN_1903914	0,01945	4,03E-05	4,15	104.942	0,1798		
6	ILMN_2361104	0,00730	7,41E-06	4,54	266.291	0,1788	ZMAT3	zinc finger matrin-type 3
7	ILMN_1784737	0,02262	5,45E-05	4,08	0,7643	0,1728	S1PR4	sphingosine-1-phosphate receptor 4
8	ILMN_2235745	0,00885	1,02E-05	4,47	235.916	0,1714		
9	ILMN_2249920	0,006	3,99E-06	4,67	325.539	0,1692	FYN	FYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase
10	ILMN_2115949	0,00661	5,20E-06	4,61	300.184	0,1692	ZNF394	zinc finger protein 394

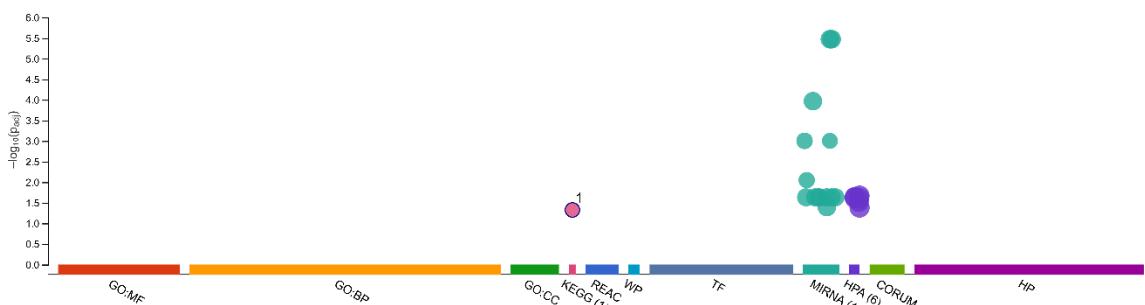
7. Gen Down-Regulated

No	ID	adj,P,Val	P,Value	t	B	logFC	Gene,symbol	Gene,title
1	ILMN_1739428	0,00123	2,60E-07	-5,2	588.061	-0,406	IFIT2	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 2
2	ILMN_2388547	0,01477	2,44E-05	-4,3	152.606	-0,387	EPSTI1	epithelial stromal interaction 1 (breast)
3	ILMN_1777325	0,00123	2,08E-07	-5,3	609.853	-0,374	STAT1	signal transducer and activator of transcription 1
4	ILMN_2114568	0,00933	1,23E-05	-4,4	218.193	-0,351	GBP5	guanylate binding protein 5
5	ILMN_1729749	0,03767	1,39E-04	-3,8	-0,12266	-0,341	HERC5	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5
6	ILMN_1701114	0,00297	1,65E-06	-4,9	410.236	-0,316	GBP1	guanylate binding protein 1
7	ILMN_2148785	0,01517	2,63E-05	-4,3	145.414	-0,291	GBP1	guanylate binding protein 1

8	ILMN_1769520	0,02354	5,83E-05	-4,1	0,69971	-0,289	UBE2L6	ubiquitin conjugating enzyme E2 L6
9	ILMN_1774077	0,00224	1,06E-06	-5	452.613	-0,289	GBP2	guanylate binding protein 2
10	ILMN_2261600	0,03427	1,14E-04	-3,9	0,06527	-0,279	FCGR1B	Fc fragment of IgG receptor Ib

8. Gene Ontology (GO)

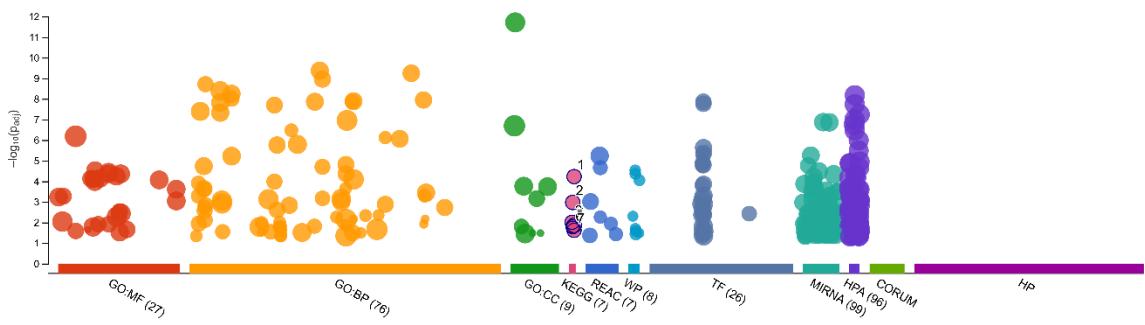
a. Manhattan Plot dari gen Down-Regulated



version e113_eg59_p19_6be52918
date 22/02/2026, 21.30.55
organism hsapiens

g:Profiler

b. Manhattan Plot dari gen Down-Regulated



version e113_eg59_p19_6be52918
date 22/02/2026, 21.35.19
organism hsapiens

g:Profiler

Manhattan plot ini memvisualisasikan hasil pengayaan fungsional dari daftar gen (DEGs) yang dianalisis.

- a. **Sumbu X:** Menunjukkan sumber database fungsional yang digunakan, seperti GO (Biological Process, Molecular Function, Cellular Component) dan KEGG.
- b. **Sumbu Y:** Menunjukkan tingkat signifikansi statistik dalam skala $-\log_{10}(\text{padj})$. Semakin tinggi titik pada grafik, semakin kecil nilai p-value-nya, yang berarti jalur tersebut semakin signifikan secara biologis.
- c. **Interpretasi:** Titik tertinggi pada area berwarna pink (KEGG) menunjukkan jalur **Influenza-A** dan **NOD-like receptor signaling pathway** sebagai jalur yang paling dominan dipengaruhi oleh daftar gen yang dimasukkan.

3. KEGG Pathway

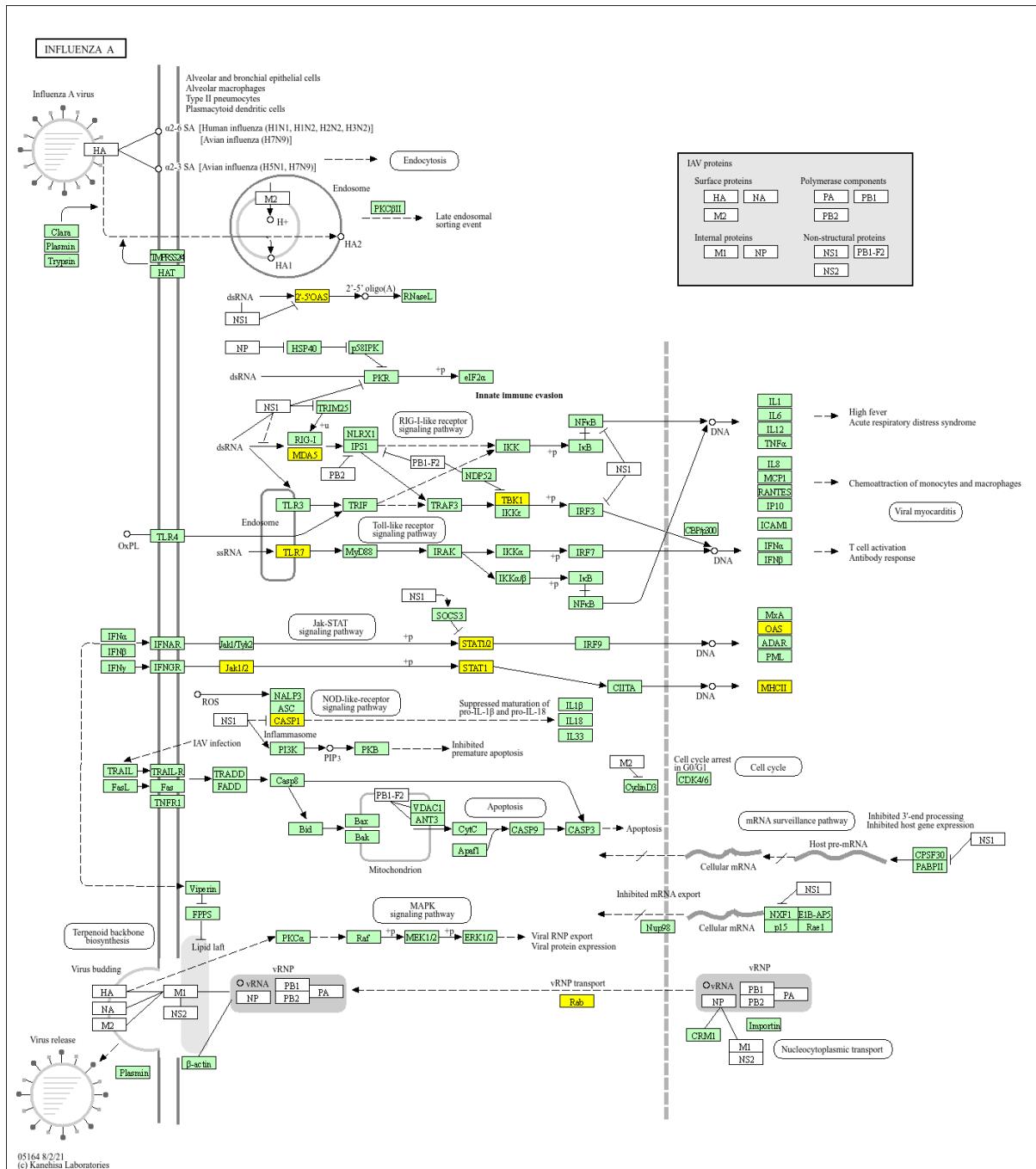
Gen up-regulated berwarna merah

Gen down-regulated berwarna kuning

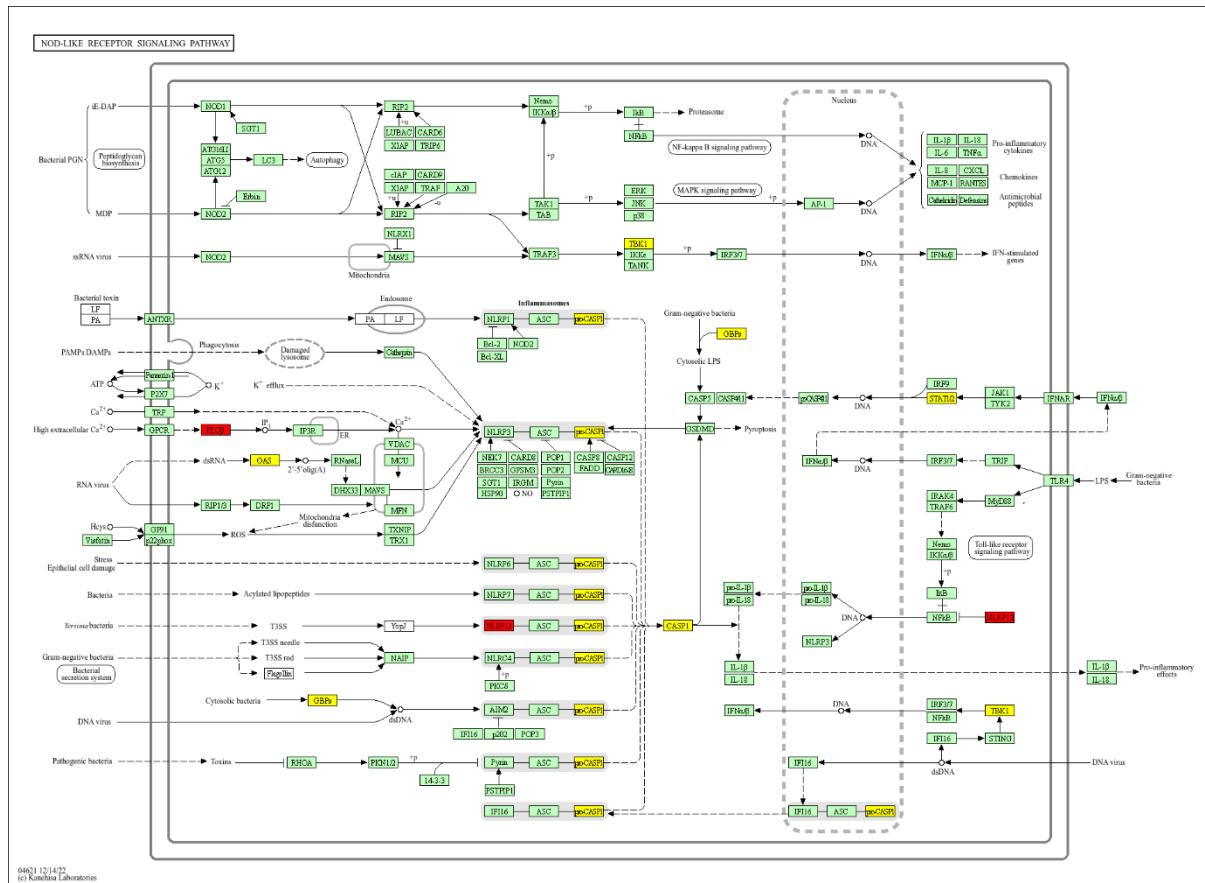
Visualisasi ini menggunakan *KEGG Color Tool* untuk memetakan DEGs ke dalam jalur metabolisme spesifik.

- a. **Warna Merah:** Merepresentasikan gen yang mengalami peningkatan ekspresi (*upregulated*) atau memiliki nilai LogFC positif.
- b. **Warna Biru:** Merepresentasikan gen yang mengalami penurunan ekspresi (*downregulated*) atau memiliki nilai LogFC negatif.
- c. **Kotak Kuning/Tanpa Warna:** Menunjukkan komponen dalam jalur tersebut yang tidak ditemukan dalam daftar gen input atau tidak mengalami perubahan ekspresi yang signifikan.
- d. **Interpretasi:** Sebaran warna pada peta jalur memberikan gambaran visual apakah suatu mekanisme seluler sedang diaktifkan atau ditekan secara keseluruhan.

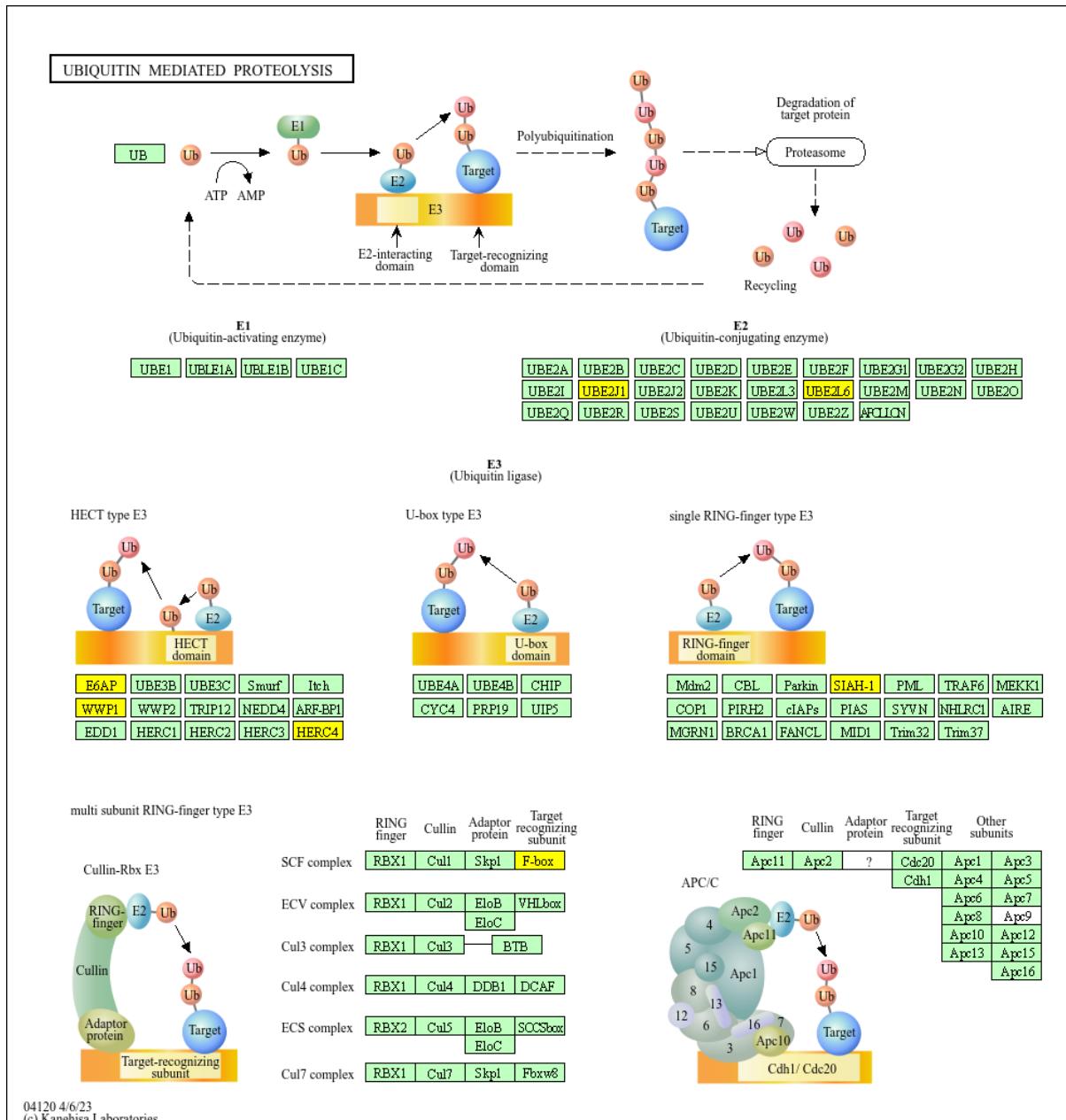
a. hsa05164 Influenza A (10)



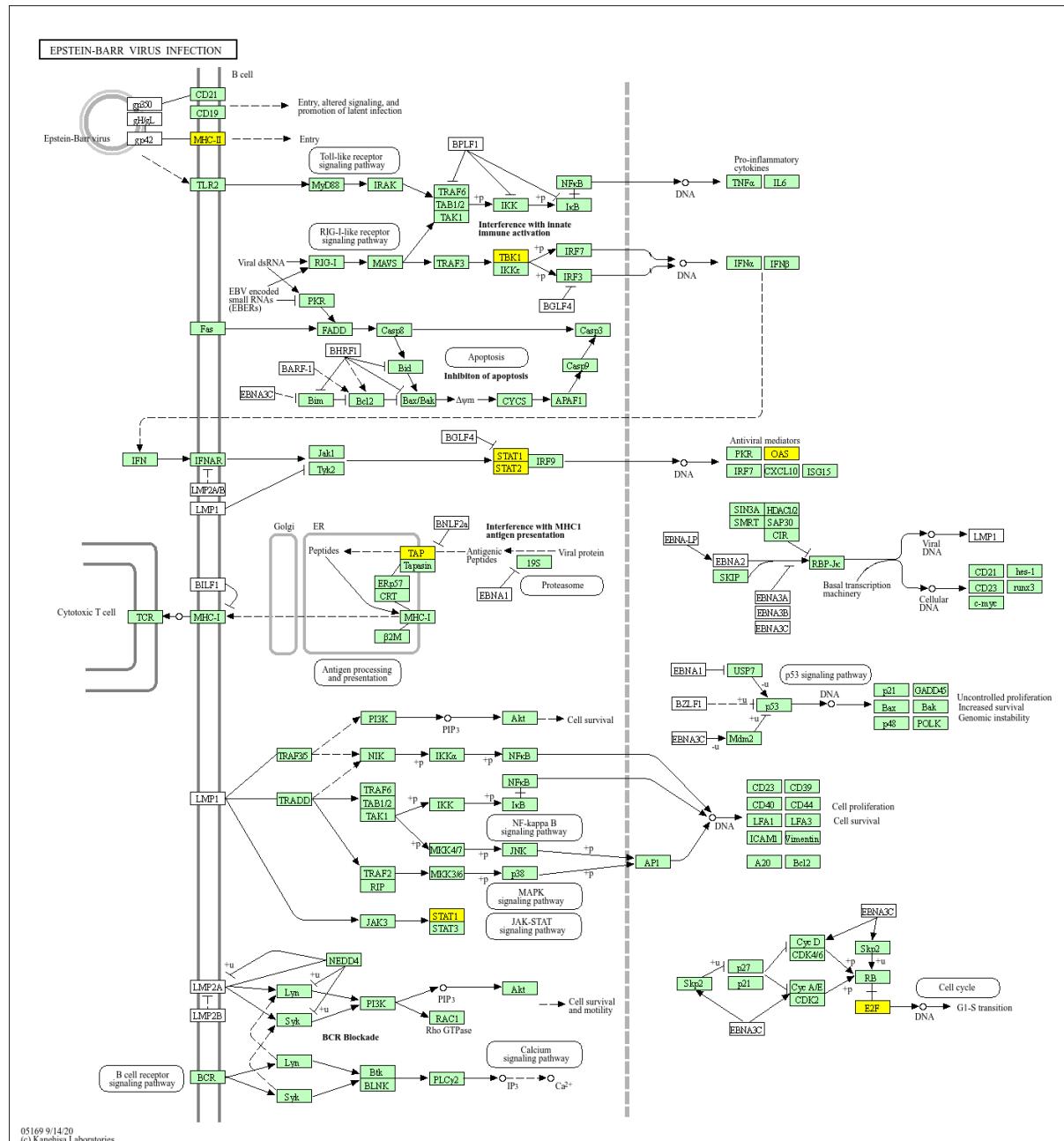
b. hsa04621 NOD-like receptor signaling pathway (11)



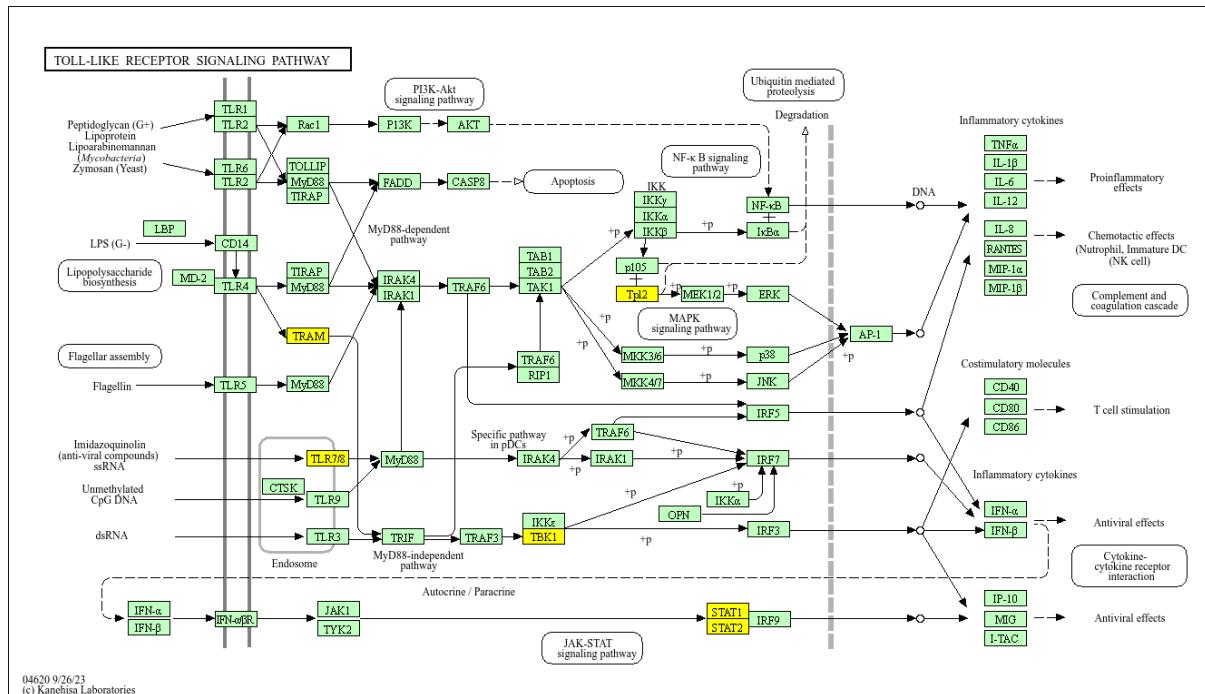
c. hsa04120 Ubiquitin mediated proteolysis (7)



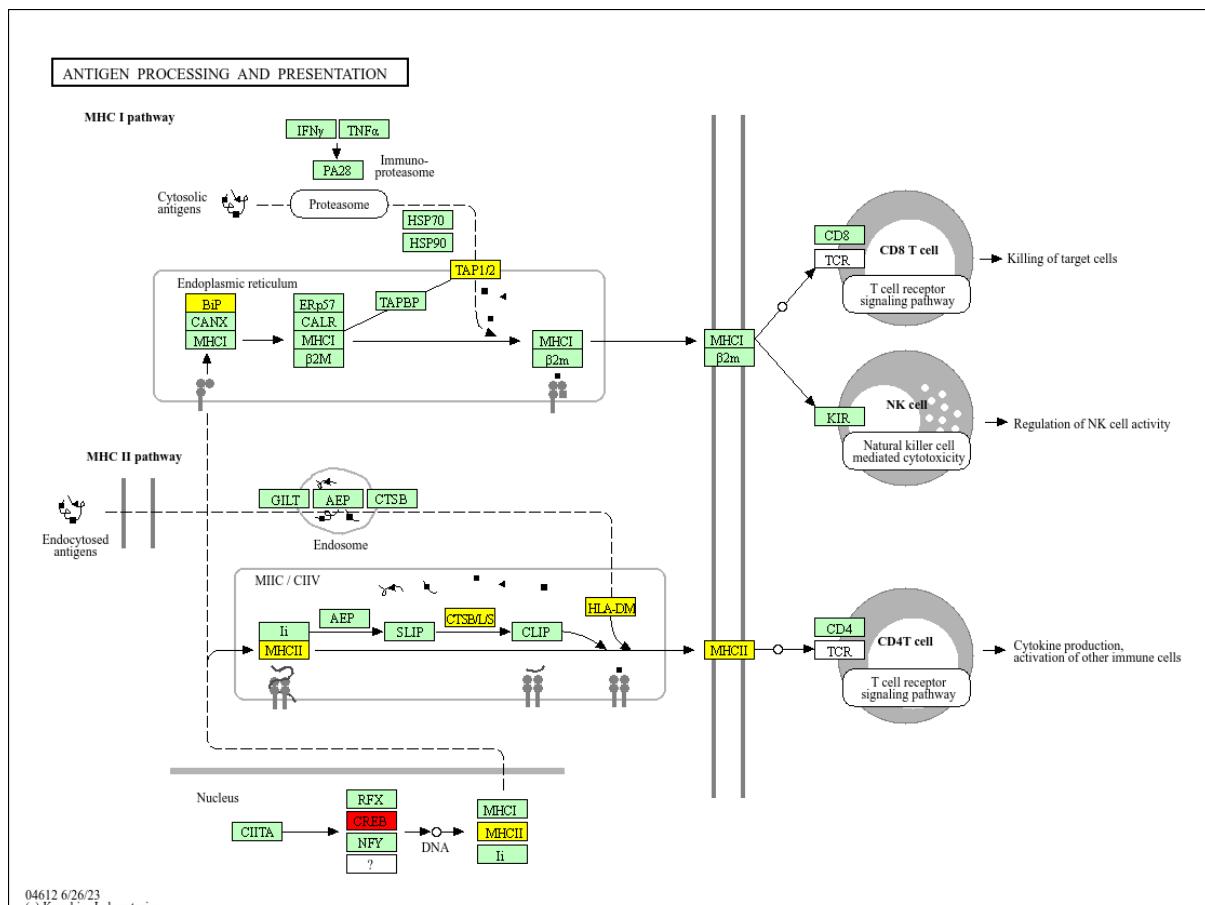
d. hsa05169 Epstein-Barr virus infection (8)



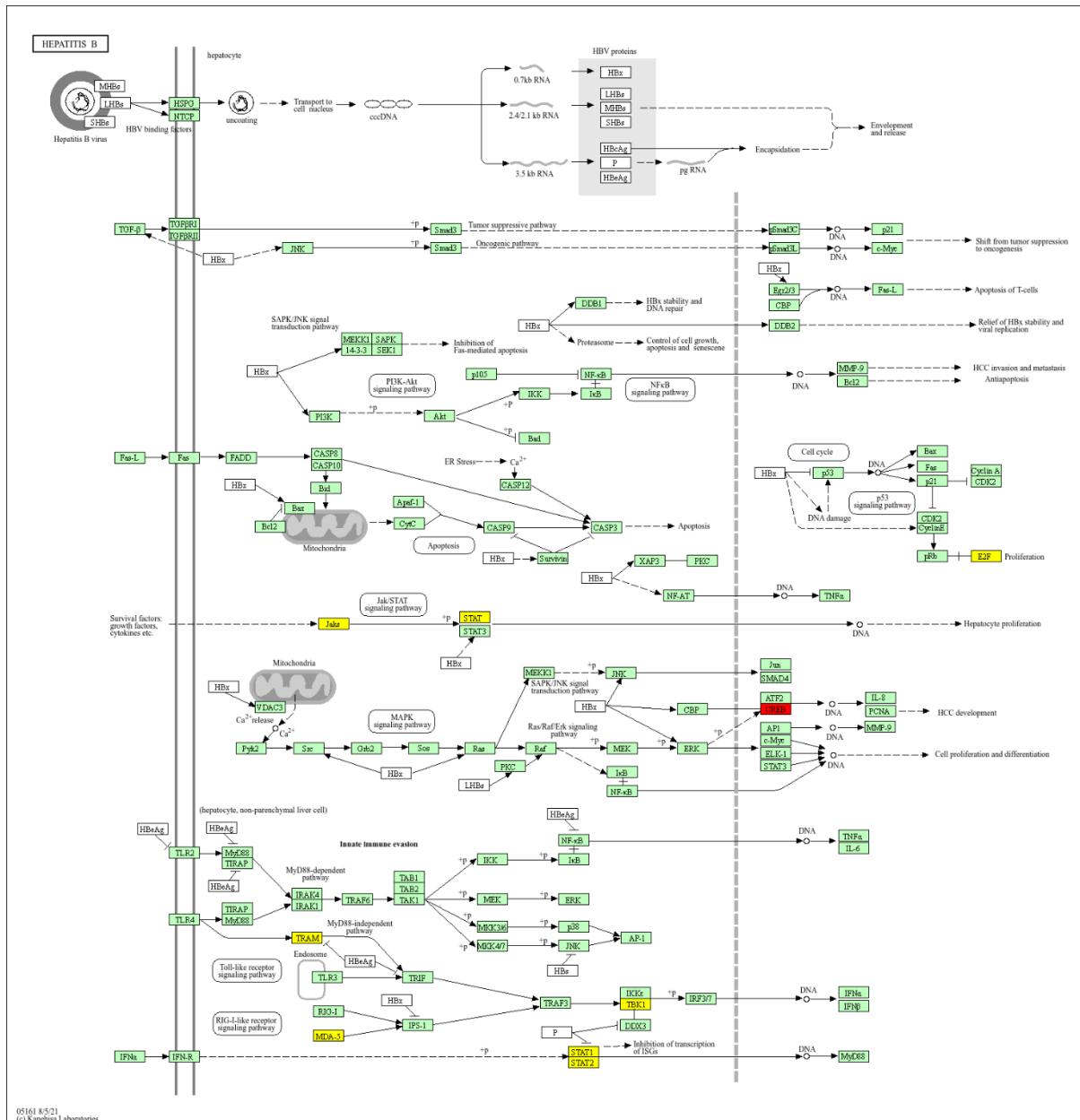
e. hsa04620 Toll-like receptor signaling pathway (6)



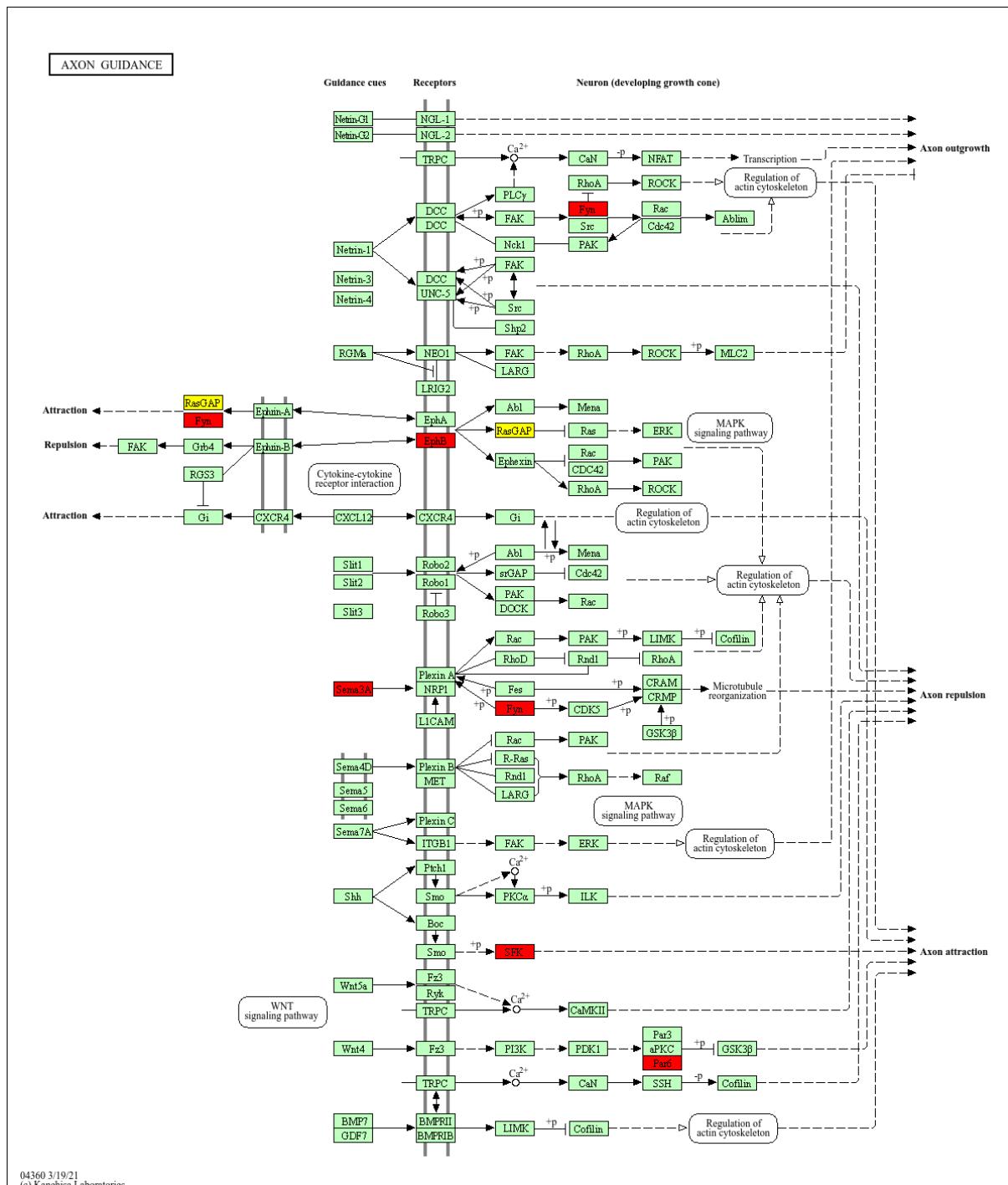
f. hsa04612 Antigen processing and presentation (6)



g. hsa05161 Hepatitis B (8)



h. hsa04360 Axon guidance (6)



Berdasarkan analisis *enrichment* dari dataset GSE48018, respons transkriptomik terhadap vaksin influenza didominasi oleh jalur imun bawaan dan pemrosesan antigen, yang menunjukkan bahwa vaksin berhasil memicu respons imun yang efektif.

Pertama, jalur NOD-like receptor dan Toll-like receptor signaling bertindak sebagai sensor awal tubuh terhadap antigen vaksin. Aktivasi jalur ini memicu pelepasan sinyal inflamasi yang penting untuk memulai pertahanan tubuh dan membentuk memori imun jangka panjang. Aktivasi reseptor imun bawaan pada tahap awal ini krusial untuk menghasilkan respons imun vaksin yang efektif (Schroder dan Tschopp, 2010).

Kedua, jalur pemrosesan dan presentasi antigen menunjukkan bagaimana protein vaksin dipecah menjadi fragmen kecil dan dipamerkan di permukaan sel imun. Proses ini memungkinkan sel T mengenali antigen dan memicu respons spesifik, termasuk produksi antibodi oleh sel B, yang merupakan jembatan antara sistem imun bawaan dan adaptif (Janeway et al., 2001).

Ketiga, jalur respons terhadap Influenza A menunjukkan bahwa tubuh merespons antigen vaksin seolah-olah menghadapi virus influenza yang nyata. Aktivasi jalur ini memastikan pembentukan pertahanan spesifik yang efektif, sehingga transcriptomic tubuh mencerminkan simulasi infeksi oleh vaksin (Franco et al., 2013; Wexner Medical Center, 2022).

Keempat, jalur Axon Guidance, meski awalnya dikaitkan dengan sistem saraf, berperan dalam memandu migrasi sel imun, misalnya sel dendritik menuju kelenjar getah bening untuk menyerahkan antigen kepada sel T. Dengan demikian, jalur ini mendukung koordinasi sel imun selama respons vaksin (Pasterkamp dan Giger, 2009).

Secara keseluruhan, jalur-jalur yang teraktivasi mencerminkan respons imun yang lengkap: dari pengenalan antigen, pemrosesan dan presentasi antigen, hingga aktivasi pertahanan spesifik terhadap virus influenza. Hal ini menegaskan bahwa vaksin berhasil memicu mekanisme protektif tubuh. Dengan mengetahui jalur yang dominan aktif, strategi *adjuvant* atau terapi imun dapat dirancang untuk memperkuat respons awal ini, meningkatkan efektivitas vaksin, terutama pada individu dengan respons imun rendah (Li et al., 2014).

D. Kesimpulan

- 1. Respons Imun Lengkap:** Jalur yang teraktivasi menunjukkan respons imun menyeluruh: mulai dari pengenalan antigen, pemrosesan dan presentasi antigen, hingga aktivasi pertahanan spesifik terhadap virus influenza. Hal ini menegaskan bahwa vaksin berhasil memicu mekanisme protektif tubuh.

2. **Visualisasi Jalur:** Pemetaan jalur menggunakan **KEGG Color Tool** memperlihatkan aktivitas jalur secara visual, memudahkan pemahaman tentang bagaimana sel imun bekerja selama respons terhadap vaksin.
3. **Aplikasi Klinis:** Mengetahui jalur yang dominan aktif membuka peluang strategi **personalized therapy**, di mana intervensi atau perawatan dapat diarahkan untuk mendukung jalur imun tertentu, meningkatkan efektivitas dan meminimalkan efek samping.

Daftar Pustaka

1. Franco, L. M., Shaw, C. A., & Belmont, J. (2013). *Time series of global gene expression after trivalent influenza vaccination in humans (GSE48018)*. GEO.
2. Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (5th ed.). New York: Garland Science.
3. Li, S., Roushaphel, N., Duraisingham, S., Romero-Steiner, S., Presnell, S., Davis, C., Pulendran, B. (2014). *Molecular signatures of antibody responses derived from a systems biology study of five human vaccines*. Nat Immunol, 15, 195–204.
4. Pasterkamp, R. J., & Giger, R. J. (2009). *Semaphorin function in neural plasticity and disease*. Curr Opin Neurobiol, 19(3), 263–273.
5. Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). *The inflammasomes*. Cell, 140(6), 821–832.
6. Wexner Medical Center. (2022). *Transcriptional immune responses to influenza vaccination*. Journal of Infectious Diseases.