

Aplikasi DNA Microarray dalam Riset Kanker

Farida Falaivi
Supri Irianti Handayani

Departemen Patologi Anatomi
Fakultas Kedokteran
Universitas Indonesia

ABSTRAK

Perkembangan genomik telah membuka banyak jawaban mengenai fungsi DNA pada manusia. Pada dasawarsa 90-an Pat Brown dan kawan-kawan mengembangkan teknik *DNA microarray*. Teknologi microarray ini kita mampu memperoleh ribuan ekspresi gen dari satu sampel dalam satu waktu. *Microarray* ada dalam berbagai jenis. Jenis klasik yang dikembangkan pertama kali adalah *spotted microarray* yang saat ini masih banyak digunakan di laboratorium. Selain itu teknologi ini juga telah diproduksi secara pabrikan dan telah dikomersialkan khususnya *affymetrix GeneChip* dan *ink jet printing microarray*. Langkah-langkah yang harus diperhatikan dalam menggunakan teknologi ini, terutama pada teknik hibridisasi sehingga kita memperoleh data yang baik dan bisa dilakukan analisa pada data tersebut. Alat ini juga menggunakan proses komputerisasi yang canggih baik dalam proses, scanning maupun analisa data. *Microarray* telah digunakan dalam berbagai bidang baik biologi molekuler, farmakologi dan kesehatan khususnya kanker. *Microarray* digunakan untuk diagnosis, prognosis maupun dalam menentukan terapi. Teknologi ini sangat bermanfaat, tetapi masih mempunyai kekurangan, sehingga masih terus disempurnakan khususnya pada langkah analisa data.

Kata kunci : DNA, microarray, kanker.

PENDAHULUAN

DNA adalah molekul yang mengandung informasi genetik yang dibutuhkan untuk perkembangan dan fungsi dari suatu organisme. DNA pada perjalannya jika terjadi variasi ataupun mutasi dapat menyebabkan penyakit genetik dan kanker yang sangat merugikan kehidupan manusia.² Menemukan dan mengartikan informasi genetik pada DNA, serta memahami bagaimana molekul tersebut dapat mengatur keragaman hidup merupakan tujuan utama dari semua ilmuwan serta dapat memberikan keuntungan pada ilmu kesehatan, sehingga pada akhirnya kita dapat mengetahui dan memahami banyak penyakit serta bagaimana cara mengobati dan mencegahnya.¹

Dahulu para ilmuwan harus bekerja keras untuk mendapatkan sedikit data yang dapat membantu untuk menegakkan hipotesis. Pemeriksaan genom membutuhkan waktu yang lama dan hanya memperoleh sedikit data yang berkaitan dengan genom, sehingga para ilmuwan pada masa itu menjadi kurang produktif.

Setelah perkembangan era genomik, teknologi DNA Microarrays memberikan perubahan pada berbagai bidang ilmu khususnya bidang biologi. DNA microarray memungkinkan kita memperoleh kemampuan untuk dapat melihat ribuan ekspresi gen dalam satu observasi. Hal ini kita namakan profil ekspresi gen, semua penting¹ karena merupakan set dari ekspresi gen yang menentukan fenotip dari suatu sel.³

Sebelum tahun 1995, seorang peneliti hanya dapat mengeksplorasi sedikit ekspresi gen dalam satu waktu. Dua grup peneliti dari universitas Stanford yang di ketuai oleh Patrick Brown, MD, PhD mengembangkan teknologi microarray.⁴ Microarray Stanford adalah sebuah slide kaca dengan ribuan titik-titik halus yang mengekspresikan gen, dan menerangkan sampai di level berapa gen dapat diekspresikan.^{5,6}

DNA microarray merupakan pemeriksaan DNA dengan urutan: 1) mempersiapkan sampel dan meletakannya pada permukaan padat 2) dilakukan teknik hibridisasi 3) scanning dengan menggunakan laser dan data yang diperoleh dikumpulkan serta dianalisa.⁷ Teknologi ini dapat memprofil setiap gen yang ada, dimana satu pasien dapat menghasilkan >25.000 data, sehingga membuat para ilmuwan mengalami kesulitan dalam menganalisa data tersebut. Saat ini banyak metode yang telah dikembangkan untuk membantu menganalisa data yang didapat, walaupun masih belum sempurna.⁸

Penemuan DNA microarray sangat membantu perkembangan berbagai bidang khususnya kesehatan. Aplikasi ini masih mempunyai banyak potensi untuk dapat digunakan dalam identifikasi penyakit genetik yang kompleks, deteksi mutasi atau polymorfisme, penemuan obat baru serta penggunaannya dalam ilmu toksikologi.⁴ Bidang onkologi juga telah aktif menggunakananya sejak tahun 2000 dan cukup sukses menggunakan microarray untuk membedakan jenis dan mengidentifikasi jenis sel kanker, prognosis dan diharapkan suatu hari nanti kita dapat mengobati kanker sesuai dengan ekspresi gen.⁹

DNA microarray saat ini masih berusaha dikembangkan terutama dalam cara analisa data yang didapat dari hasil eksperimen.⁸ Makin banyaknya penggunaan teknologi ini pada berbagai macam penelitian, menjadi alasan pembahasan dari makalah ini. Tulisan ini bermaksud membahas secara umum tentang DNA microarray serta penggunaan aplikasinya terutama dengan penyakit kanker.

Tipe DNA microarray

Beberapa jenis DNA microarray telah digunakan dalam banyak penelitian.¹⁰ DNA microarray dibagi dalam beberapa kategori yaitu 1) berdasarkan metode pelabelan yang digunakan 2) probe yang digunakan serta 3) teknologi

yang digunakan. Dalam tulisan akan dibahas berdasarkan teknologi yang dipakai pada microarray yaitu *robotic spotting*, *photolithographic* dan *inkjet printing*. Teknologi *robotic spotting* digunakan oleh *spotted microarray*.¹¹ Teknologi *photolithographic* dapat kita lihat pada *GeneChip* *Affymetrix* dan *Nimblegen*. *Inkjet Printing* digunakan oleh *Agilent microarray* dan *Canon*.¹² Semua tipe efektif dalam menghasilkan data genomik, tetapi masing-masing tipe mempunyai kelebihan dan kekurangan.¹ Kami hanya akan membahas tiga *microarray* yang paling banyak digunakan saat ini.

1. Spotted Microarray

Spotted microarray adalah microarray pertama yang masih digunakan sampai saat ini.¹³ Pertama kali dikembangkan oleh Pat Brown dan teman-teman di laboratorium Stanford.¹⁴ Tipe ini sering disebut dengan “*homemade microarray*” karena pada umumnya semua proses pada eksperimen dilakukan sendiri oleh peneliti termasuk pada pembuatan kontrol dari sampel sel normal.¹⁵

Langkah pertama pada penggunaan *spotted microarray* yaitu membuat probe untuk diletakan di array. Probe yang digunakan pada *spotted microarray* adalah: 1) cDNA 2) pre sintesis oligonukleotida 3) produk PCR berupa fragmen kecil yang sesuai dengan mRNA. Khusus *spotted cDNA array* perlu dilakukan amplifikasi dengan PCR, kemudian diambil oleh *robotic spotting* (Gambar 1) dan diletakan ke permukaan yang padat (Gambar 2).^{1,11,12,14,16} Panjang probe yang digunakan pada array ini adalah 500-5.000 basa.¹

Teknologi microarray merupakan teknologi komparatif yang akan membandingkan dua sampel (Gambar 3).^{1,15} Sampel pertama sel normal yang akan digunakan sebagai kontrol dan sampel kedua berasal dari sel yang akan diperiksa (kasus). Kemudian pada kedua sampel akan dilakukan isolasi RNA dan akan diubah menjadi cDNA dengan teknik *reverse transcription*. Selama proses ini dilakukan juga labeling pada cDNA.¹ Proses dilanjutkan dengan meletakkan label pada array untuk dilakukan hibridisasi. Teknik hibridisasi yang digunakan adalah hibridisasi kompetitif karena kita menggunakan dua cDNA dari dua sampel pada array yang sama.^{13,17} Hasil hibridisasi akan discanning dan dilakukan analisa.¹²

Teknik *spotted* menggunakan metode dua warna yaitu sampel dari sel normal

menggunakan CY3 yang akan menimbulkan fluoresensi hijau dan sampel kasus kita berikan CY5 yang menimbulkan fluoresensi merah.² Pembacaan array dilakukan dengan laser scanning. Warna merah mengindikasi gen terekspresi secara kuat (*up regulated*). Warna hijau mengindikasi gen tidak terekspresi (*down regulated*). Warna kuning menunjukkan ekspresi gen berada diantaraekspresi kuat dan tidak terekspresikan. Warna hitam menunjukkan gen tidak aktif karena tidak membentuk ikatan dengan cDNA di array.¹⁸

Spotted microarray mempunyai keuntungan harganya relatif murah dibandingkan dengan *microarray* lainnya. Kita dapat menggunakan aplikasi ini untuk meneliti sampel dari berbagai spesies. Kelemahan yang dimiliki tipe ini yaitu, pada proses pewarnaan dapat terjadi bias karena kita menggunakan tipe dua warna. Proses ini memiliki subjektivitas tinggi tidak seperti *geneChip affymetrix* karena setiap tahap dilakukan oleh peneliti sendiri.^{10,19}

2. *Affymetrix Gene Chip*

Affymetrix genechip adalah salah satu tipe *microarray* yang dibuat menggunakan teknik sintesis *in situ* oligonukleotida dengan teknologi *photolithographic*.¹³ *Affymetrix* telah dikomersilkan dan diproduksi secara pabrikan.¹ Chip ini telah menerima pengakuan sebagai metode terbaik dalam menentukan profil ekspresi gen.¹⁰

Setiap chip *microarray* memiliki luas 1,28x1,28 cm² dan mengandung fitur 20umx20um. Ukuran ini dapat menampung lebih dari 400.000 oligonukleotida yang mewakili 12.000 transkrip dan dapat dibaca dalam satu chip saja (Gambar 4). *Affymetrix* menggunakan probe oligonukleotida dengan panjang 25-mer yang akan disintesis secara *in situ* pada permukaan slide dari chip. Selubung photolithography yang juga digunakan pada pembuatan chip semikonduktor, berfungsi untuk mengontrol cahaya langsung yang dapat mengganggu sintesis DNA sehingga kita dapat membaca urutan oligo yang sudah dibangun satu nukleotida pada lokasi yang sudah ditetapkan di permukaan chip. *Affymetrix* menggunakan satu set probe untuk menilai ekspresi dari suatu gen.^{1,20} Setiap set probe mengandung satu pasangan sempurna oligonukleotida (PM, *perfect match*) dan sebuah pasangan yang tidak sempurna oligonukleotida (MM, *mismatch*). PM dan MM merupakan

sekuen yang identik kecuali pada satu nukleotida yang terletak di posisi tengah base. Pasangan probe yang unik ini membantu dalam identifikasi, hibridisasi substrat yang tidak spesifik dan sebagai latar belakang sinyal. Berbeda dengan *spotted array* yang tidak memiliki kontrol yang sama untuk setiap transkripsi.²¹

Proses penggunaan *affymetrix* dimulai dengan isolasi RNA kemudian mengubahnya menjadi cDNA dengan proses *reverse transcription*. Dilakukan labeling cDNA serta fragmentasi. Proses selanjutnya, cDNA diletakkan pada *geneChip* dan dilakukan hibridisasi. Setelah selesai melewati proses hibridisasi array di cuci kemudian di scanning, serta dilakukan analisis data (Gambar 4).^{19,23}

Microarray ini menggunakan metode satu warna fluoresen yang diikat pada target molekul.²¹ Penggunaan teknik yang tinggi pada *microarray* ini, membuat array ini disebut sebagai *microarray* dengan densitas yang tinggi.²⁴ Kekurangan dari teknologi ini adalah memiliki harga yang relatif mahal, dimana satu chip hanya dapat digunakan untuk satu sampel.¹⁹

3. *Ink-jet teknologi (Agilent)*

Agilent merupakan *microarray* yang menggunakan teknologi *ink jet printing* dengan bahan kimia *phosphoramidite* (Gambar 5). *Agilent* menggunakan probe oligonukleotida dengan panjang 60-mer lebih panjang dari yang digunakan di *affymetrix* dan lebih pendek dibandingkan *spotted*. *Agilent* dapat menggunakan metode dua warna atau satu warna, tetapi umumnya yang digunakan adalah metode dua warna.^{10,13}

Tahapan Pemrosesan (Workflow)

1. Persiapan dari sampel

Isolasi RNA

Eksperimen dengan DNA *microarray* menggunakan sampel sel normal dan sel yang akan diperiksa (contoh nya sel kanker). Sampel dapat diambil dari bank jaringan, hewan percobaan, sel kultur atau langsung dari pasien. Khususnya pada penelitian dengan sel kanker sampel yang digunakan dapat berupa jaringan beku atau jaringan parafin (*formalin fixed embedded tissue (FFPE)*) yang diambil dengan teknik operasi, atau sampel dari sitologi. Sampel tersebut akan diproses dan dilakukan pulasan dan kemudian akan dilakukan pemotongan

dengan *Laser Capture Microdissection* (LCM) untuk mendapatkan sel kanker yang akan diekstrasi (Gambar 6).²⁶⁻²⁹ Penggunaan metode LCM telah digunakan pada studi kanker prostat,²⁹ leukemia dan pada jaringan tumor yang tidak diketahui lokasi primernya.²⁶

Kualitas RNA yang baik menjadi syarat utama pada eksperimen dengan microarray.² RNA dapat diekstrasi dari sampel jaringan atau sel dengan prosedur ekstrasi organik yang umum dimiliki laboratorium biologi molekuler. Keduanya baik total RNA atau mRNA dapat digunakan. Jumlah total RNA yang diperlukan sekitar 20 μ g dan 0,5 μ g untuk mRNA.⁹ Dengan dihasilkannya total RNA atau mRNA yang baik, menjadi faktor penentu pada proses labeling dan hibridisasi, karena protein selular, lipid serta sakarida dapat menjadi mediator ikatan non spesifik antara cDNA yang telah terfluoresensi dengan permukaan padat. Dihilangkannya residu dari genom DNA juga dapat meningkatkan sensitifitas dari hibridisasi dan menurunkan ikatan non spesifik serta latar belakang.³⁰

Amplifikasi RNA sampel

Fluoresensi yang adekuat didapatkan jika jumlah total RNA yang dibutuhkan sebesar 20-200 μ g (2-5 μ g jika menggunakan poly-mRNA) per target dan per array. Tujuannya untuk mendapatkan profil ekspresi gen dengan menggunakan sel sesedikit mungkin, jika perlu hanya menggunakan satu sel saja. PCR merupakan metode yang paling direkomendasikan untuk melakukan amplifikasi pada cDNA rantai tunggal.²

Labeling

Sampel RNA diubah dengan *reverse transcriptase*, sebuah oncoretroviral enzim yang menggunakan mRNA sebagai template untuk sintesis cDNA rantai tunggal.²² Sampel mRNA berikatan dengan poly-T primer dan menyebabkan dimulainya proses *reverse transcription* dari signal *polyadenylation* di regio 3' *untranslated* (UTR) di mRNA. Larutan akan ditambahkan asam nukleat untuk reaksi transkripsi (dT, dC, dG dan dT) dan proporsi dCTP (atau terkadang dUTP digunakan sebagai dT) tempat dimana label fluoresen cy akan diikat secara kovalen. Berarti "C" di produk cDNA mempunyai ikatan dengan *fluorophors* Cy. Harus selalu ada komplemetari pada akhir 3' mRNA, baik pada cDNA atau oligonukleotida yang digunakan pada array atau label akan tidak bisa terdeteksi.³⁰

Dua metode pewarnaan yang digunakan yaitu pewarnaan secara langsung dan tidak langsung. Metode langsung melibatkan penggabungan label Cy3 atau Cy5 dengan dUTP cDNA pada saat proses *reverse transcription*. Metode ini yang paling sering digunakan dalam penelitian, tetapi kekurangan dari metode ini adalah lemahnya penggabungan Cy5 dengan nukleotida dibandingkan dengan label Cy3, sehingga dapat terjadi bias.²

Cara tidak langsung menggunakan sebuah modifikasi amino-allyl dari nukleotida. Sebuah molekul yang lebih kecil dibandingkan Cy- dCTP, sehingga reaksi transkripsi lebih effisien. Melalui proses *reverse transcription*, cDNA beraaksi dengan ester pada label, sehingga pewarna dapat terikat dengan dCs di cDNA. Keuntungan menggunakan metode tidak langsung setiap label mempunyai kesempatan yang sama terikat dengan target.¹¹ Setelah dilakukan pelabelan perlu dilakukan purifikasi untuk menghilangkan label yang tidak terikat pada latar belakang.³⁰

2. Hibridisasi

Hibridisasi adalah proses inkubasi dari mRNA yang telah terlabel fluoresen dengan probe yang ada di microarray. Fluoresen dari mRNA target dihibridisasi dengan cDNA probe yang ada pada slide dan ditentukan jumlah dari immobilisasi fluoresen dan radioaktivitasnya. Hibridisasi dari probe yang terlabel sebaiknya dilakukan secara linier, sensitif dan spesifik.³⁰

Hibridisasi biasanya dilakukan pada suhu 45 $^{\circ}$ dan 65 $^{\circ}$ C, tergantung dari array yang digunakan. Microarray yang menggunakan probe oligonukleotida, suhu yang dipakai tergantung dari panjang probenya.¹¹

Slide akan dicuci setelah proses hibridisasi selesai. Tujuan dilakukannya proses pencucian ini untuk menghilangkan kelebihan cairan hibridisasi pada microarray, sehingga kita dapat memastikan pengukuran hanya dilakukan pada target label yang ada di microarray. Kedua untuk meningkatkan kekuatan eksperimen dengan menurunkan hibridisasi silang. Proses pencucian dapat dilakukan dengan menggunakan sabun rendah garam atau dengan temperatur tinggi.¹¹

3. Pembacaan hasil

Proses selanjutnya setelah dilakukan hibridisasi dan pencucian pada microarray dilakukan pembacaan data dengan scanner.

Scanner akan membaca intensitas signal yang ditangkap dari semua titik dislide. Proses ini dikontrol oleh komputer yang membaca scanning fluoresen dengan dua atau lebih sistem iluminasi laser (Gambar 7). Hibridisasi dengan target fluoresen distimulasi oleh laser. Pancaran cahaya fluoresensi akan ditangkap oleh CCD kamera, nonconfocal atau confocal scanner laser. Scanner yang menggunakan laser hijau dan merah untuk label Cy3 dan Cy5 memberi image 16-bit TIFF yang terpisah untuk setiap channel.^{30,31}

DNA *microarray* dapat memberikan banyak data, sehingga kita memerlukan analisa statistik dan matematika yang baik agar diperoleh hipotesis reliable dan hasil yang baik. Langkah pertama dari analisa data dengan memproses image. Image yang diperoleh dari scanner merupakan data mentah dari eksperimen *microarray*. Alogaritma pada komputer akan mengubah data tersebut menjadi data numerik (Gambar 8). Langkah kedua dilakukan normalisasi, menghilangkan data *nonbiological* dari data *biological*, termasuk ketidakseimbangan kuantitas pada RNA. Terakhir dilakukan identifikasi gen yang terekspresi. Metode statistikdigunakan mengukur besar ekspresi gen.^{30,32}

Penggunaan DNA *Microarray*

Penemuan DNA *microarray* membuat penelitian dalam studi genom yang berkaitan dengan ekspresi gen yang timbul baik pada keadaan sehat, sakit, ataupun respon akibat dari bebagai stimulus menjadi lebih komprehensif dan inklusif. Kemampuannya dalam membaca ekspresi gen di berbagai keadaan, membuat teknologi ini banyak dipilih oleh peneliti di berbagai bidang.³³

Secara umum *microarray* biasa digunakan dalam analisa ekspresi gen untuk mencari titik mutasi (analisa *single nucleotide polymorphism* (SNP) yang dapat menyebabkan variasi pada makhluk hidup dan *comparative genomic hybridization* (CGH). Selain digunakan oleh bidang biologi molekuler dan genomic, *microarray* juga banyak digunakan pada penelitian farmakogenomik, penyakit genetik, infeksi, klasifikasi dan diagnosis kanker, serta forensik khususnya pada identifikasi genetik.^{34,35}

Perkembangan dari genomik dan bidang biokimia mengarahkan ke penemuan obat baru, yang lebih efektif dan aman digunakan. Profil ekspresi gen dapat digunakan untuk

menentukan mekanisme terapeutik dari agen, mengetahui target serta respon terapi dari obat pada tiap individu. Ditingkat yang lebih tinggi teknologi ini dapat digunakan untuk mengukur derajat toksitas, efek samping, resistensi (terutama pada penyakit kanker).^{3,9,27,36}

SNP *microarray* yang didesain untuk mendeteksi adanya satu nukleotida yang berbeda dari sampel sebuah genom. Frekuensi terjadinya SNP 1 berbanding 1000 pada manusia dan menjadi dasar adanya perbedaan tiap individu. Identifikasi serta mapping SNP dapat memberikan dasar genetik untuk mendeteksi penyakit genetik dan efek lingkungan pada manusia.⁹ Contohnya Wang *et al* (2001) dikutip dari Somasundaram³, telah berhasil mengidentifikasi SNP pada 5' untranslated region dari *RAD51*, gen yang mungkin dapat meningkatkan resiko kanker payudara dan menurunkan resiko kanker ovarium dari pembawa mutasi *BRCA 2*. Bidang forensik juga telah menggunakan SNP array ini untuk DNA *fingerprinting*.³

CGH *microarray* dapat digunakan mendeteksi adanya amplifikasi gen atau delesi yang merupakan dasar pertumbuhan kanker. Kita juga dapat menggunakan aplikasi ini untuk melihat adanya pengaturan ulang genomik atau abnormalitas yang dapat menyebabkan terjadinya penyakit serius pada manusia seperti trisomi.⁹

Aplikasi DNA *microarray* pada kanker

DNA *microarray* digunakan dalam studi ekspresi gen di kanker sel. Profil ekspresi gen ini dapat digunakan untuk identifikasi tumor, klasifikasi tumor, identifikasi tumor supresor gen, prognostik, dan pengobatan pada tumor.³

Tahun 2010, Zhang *et al* melakukan penelitian menggunakan *microarray* untuk memprofil *transcriptome* dari sampel saliva yang berasal dari pasien tumor pankreas. Tujuannya adalah menemukan biomarker baru yang lebih sensitif yang dapat membedakan antara tumor pankreas dan pankreatitis kronik. Peneliti berhasil menemukan bahwa saliva dapat digunakan untuk mendeteksi kanker pankreas. Metode ini lebih mudah dilakukan, noninvasive, serta memiliki sensitivitas dan spesifitas yang lebih tinggi. Perubahan yang terjadi pada mRNA dari saliva antara kelompok kanker dan kelompok kontrol dapat digunakan sebagai biomarker untuk mengidentifikasi kanker pankreas. Dari 12 biomarker mRNA yang divalidasi, beberapa gen seperti, *MBD3L2*, *GLTSCR2* dan *TPT1* telah

dihubungkan dengan karsiogenesis (Gambar 9).³⁷

Beberapa peneliti juga telah berhasil membuat klasifikasi tumor menjadi beberapa kelas atau grup yang dapat diimplikasikan untuk terapi menggunakan microarray.³ Golub *et al* (1999) menganalisa ekspresi dari 6800 gen dari sumsum tulang 38 pasien leukemia akut (27 dengan acute limfoblastic (ALL) dan 11 dengan acute myeloid (AML)). Hasilnya didapatkan 50 gen yang level ekspresinya berbeda antara ALL dengan AML (Gambar 10). Meskipun dalam keseharian, kita tidak mengalami kesulitan yang bermakna dalam menegakkan diagnosis pada penyakit ini, tetapi penelitian ini dapat membuktikan bahwa ekspresi gen dapat digunakan untuk mengklasifikasikan kanker.^{14,38} Rickman *et al* (2001) dikutip dari Somasundaram³, dapat mengidentifikasi profil ekspresi yang berbeda dari kelas tertinggi dan kelas terendah dari glioma. Penelitian ini menggunakan array oligonukleotida yang mengandung 6.800 gen. Mereka berhasil mengidentifikasi 360 gen sebagai penanda molekuler yang dapat membedakan antara glioblastoma multiforme (GBM) yang sangat ganas agresif dengan yang lambat.³

Perou *et al* (2000) dikutip dari Wadlow,³⁹ melaporkan hasil penelitiannya mengenai klasifikasi molekular dari 65 spesimen adenocarcinoma payudara yang berasal dari 42 pasien. Secara hiraki, berdasarkan dari pola ekspresi gen, analisis cluster didefinisikan sebagai subtipen yang terpisah di kelas tumor yang sangat heterogen. Satu merupakan subtipen yang telah dikenal (kanker Erb-B2), dan tiga lainnya adalah subtipen yang tidak dikenal sebelumnya (receptor-positif estrogen/luminal-like cancers, basal-like cancers, dan normal-breast like). Baru-baru ini, grup ini juga telah melaporkan bahwa subtipen reseptor-positif estrogen/luminal like cancer dapat dibagi menjadi dua subtipen (*luminal A* dan *luminal B*) dimana di masing-masing subtipen tersebut mempunyai ekspresi gen yang khas (Gambar 11). Walaupun klasifikasi kanker payudara berdasarkan ekspresi gen ini telah ditemukan, masih banyak pertanyaan mengenai penerapannya secara klinis.^{39,40}

Penelitian bidang kanker telah menggunakan teknologi ini untuk mempelajari metastasis dari tumor. Metastasis adalah penyebaran sel kanker dari satu organ atau jaringan ke organ/ jaringan yang lain melalui

sirkulasi darah atau sistem limfe. Meskipun demikian saat ini dipercaya bahwa mutasi beberapa gen dapat terlibat pada perubahan non-metastasis tumor menjadi metastasis tumor, tetapi hanya beberapa gen saja yang berhasil diketahui. Dikutip dari Somasundaram,³ *microarray based expression profiling* juga telah digunakan oleh Khanna *et al* (2001) untuk mempelajari metastasis di osteosarkoma, kanker kolonrektal oleh Yanagawa *et al* (2001) dan metastasis di otak oleh Nishizuka *et al* (2002). Pendekatan genomik ini akan membantu kita dalam mengidentifikasi gen dari keluarga dan proses molekuler serta seluler yang kompleks, yang berperan dalam metastasis tumor. Keberhasilan kita dalam mengetahui gen yang berperan dalam metastasis dapat membantu menentukan resiko pasien mengalami suatu metastasis, prognosis dan mengetahui terapi yang tepat untuk mengobatinya.³

Kanker dari sumber yang tidak diketahui (CUP, *Carcinoma of unknown primary*) adalah suatu metastasis kanker yang tidak diketahui dimana tumor primernya berada. Sekitar 3-5% dari diagnosis kanker di AS dikategorikan sebagai CUP. Keberhasilan dalam mengidentifikasi letak tumor primer dapat membantu dalam pengobatan kanker, sehingga prognosis dan hasilnya menjadi lebih baik. Konsep pada eksperimen ini adalah membandingkan ekspresi gen pada CUP dengan database ekspresi gen tumor sehingga kita dapat mengetahui tipe tumor dan asal organnya. Metode tes menggunakan microarray berbasis ekspresi gen (*The Pathwork *Tissue of Origin Test from Pathwork Diagnostic, Reedwood City, CA*) untuk mengevaluasi asal tumor dari CUP dan telah mendapatkan persetujuan dari FDA tahun 2010. Pada tes dilakukan evaluasi dan pengukuran dari 1550 gen yang telah terbukti dan akurat dalam menentukan asal tumor. Microarray digunakan untuk mengetahui jaringan asal tumor yang berdiferensiasi baik atau yang tidak berdiferensiasi. Dilakukan kuantifikasi tingkat kesamaan sampel dengan 15 tipe jaringan tumor yang diketahui. Hasil pada analisa ini, jika tingkat kesamaan skornya >30 menyatakan pasangannya tepat (*positive match*) dan skor <5 menyatakan hasil yang negatif (*negative match*) (Gambar 12). Prosedur ini telah dipublikasikan dan direproduktifitas oleh beberapa laboratorium dan memperoleh keakuratan yang sama hingga 89,1% dari semua laboratorium.^{26,42}

Saat ini, banyak dilakukan penelitian mengenai sensitivitas dan resistensi terhadap obat kemoterapi. Beberapa mekanisme dari resistensi obat diduga melibatkan produk gen seperti gen tumor supresor, reseptor *growth factor*, faktor *DNA repair*, regulasi dari kematian sel. Kudoh *et al* (2000) dikutip dari Somasundaram³, memonitor profile ekspresi gen dari tumor sel yang sensitif dan resisten terhadap Doxorubicin menggunakan cDNA microarray. Hasil studi menemukan adanya gen yang mengekspresikan sel yang resisten terhadap Doxorubicin dan mungkin dapat digunakan sebagai penanda dari fenotip resistensi terhadap Doxorubicin. Penelitian ini membawa sebuah harapan tentang adanya kemungkinan kita dapat melakukan profiling molekuler dari obat anti kanker dengan microarray, sehingga dapat diketahui mekanisme resistensi suatu obat dan mencari alternatif lain bagi pengobatan kanker.³

Dari uraian diatas terlihat DNA microarray mampu memberikan metode sistematis untuk mengidentifikasi penanda untuk prognosis dan respon terapi dengan menggunakan ribuan ekspresi gen yang didapat dari satu sel. Kita dapat mengetahui jalur molekuler dari progresivitas tumor dan menetapkan prognosis tumor serta diagnosis yang relevan, sehingga kita dapat melakukan manajemen pengobatan yang baik pada pasien.³³

RINGKASAN

Pada era genomik merupakan tantangan bagi kita untuk dapat mengetahui ekspresi gen, terutama yang berhubungan dengan penyakit. *DNA microarray* telah memberikan kita kemudahan untuk memperoleh ribuan data dari ekspresi gen dari satu sampel dalam satu waktu. Kita dapat menggunakan metode ini untuk mendapatkan pengetahuan baru tentang penyakit, diagnostik dan prognostik serta pengobatan. *DNA microarray* tersedia dalam berbagai jenis, dimana setiap jenis memiliki keunggulan masing-masing. *Microarray* telah digunakan dalam bidang farmakogenomik, biologi molekuler, genomik dan forensik serta kanker. Peneliti berusaha mempelajari dan memahami profil ekspresi gen yang terlibat dalam karsinogenesis, sehingga kita dapat menggunakan untuk mengidentifikasi, mendiagnosa, membuat klasifikasi yang nantinya akan mempermudah kita untuk

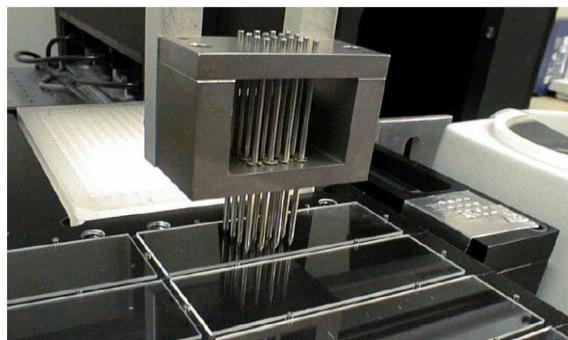
menentukan prognosis dan memberikan terapi pada pasien.

DAFTAR PUSTAKA

1. Siedel C. Introduction to DNA Microarray. In : Analysis of Microarray data: A network based approach. Emmert-Streib F, Dehmer M, eds. Weinheim: WILEY-VCH; 2008.p.1-26.
2. Ray C. Cancer Identification and Gene Classification using DNA Microarray Gene Expression Patterns. Int J Computer Sci Issue 2011;8:155-60.
3. Somasundaram K, Mungamuri SK, Wajapeyee N. DNA Microarray and its applications in cancer biology. Appl Genomics Proteomics 2002;1:1-10.
4. Dolan PL, Wu Y, Ista LK, Metzenberg, Nelson AN, Lopez GP. Robust and efficient synthetic method for forming DNA microarrays. Nucleic Acid Res. 2001;29:1-8.
5. Cobb K. Microarrays: The Search for Meaning In a Vast Sea of Data. Biomed Comput Rev. 2006:16-23.
6. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010.
7. Shalon D, Smith SJ, Brown P. A DNA Microarray System for Analyzing Complex DNA Samples Using Two-color Fluorescent Probe Hybridization. Genome Res 1996; 6: 639- 45.
8. Gevaert O, Moor BD. Prediction of cancer outcome using DNA microarray teknologi: past, present and future. Expert Opin Me Diagn 2009; 3: 157- 65.
9. Hovatta I, Kimpa K, Lehmussola A, Saarela J, Saariko J, Wong G *et al*. DNA Microarray Data Analysis. Helsinki: CSC-Scientific computing Ltd; 2005.
10. Hardiman G. Microarray platforms-comparison and contrast. Pharmacogenomics 2004; 5: 487-502.
11. Stekel D. Microarray Bioinformatics. New York: Cambridge University Press; 2003.
12. Arava Y.(2004). Spotted DNA Microarrays [Power Point Slide]. Retrieved from <http://bioinfo.cs.technion.ac.il/cobi/PDF/2.spottedMA.pdf>.Cited 2013, July 12.
13. Sasik R, Woelk CH, Corbeil J. Microarrays truth and consequences. Journal of Molecular Endocrinology. 2004;33:1-9.

14. Duffy MJ, Kelly ZD, Culhane AC, Brien SL, Gallagher WM. DNA Microarray – Based Gene Expression Profiling in Cancer : Aiding Cancer Diagnosis, Assessing Prognosis and Predicting Response to Therapy. *Curr Pharmacogenomics* 2005;3:389-404.
15. Altman NS. (2006). A introduction to “spotted” microarrays [Power Point Slide]. Retrieved from <http://sites.stat.psu.edu/~naomi/BioInf2/Lectures/SpottedIntro.pdf>. Cited 2013, July 12.
16. Conzone SD, Pantano CG. Glass Slides to DNA Microarrays. *Materials today* 2004; 20-26.
17. University at Buffalo. Introduction to DNA microarrays Technologies [Power Point Slide]. Retrieved from <http://www2.ccr.buffalo.edu/halfon/courses/Nutrigenomics/slides/Microarrays.ppt>. Cited 2013, July 12.
18. WGBH Educational Foundation. (2007). Ghost in Your Genes [Handout]. Retrieved from http://www.pbs.org/wgbh/nova/education/activities/pdf/3413_genes_02.pdf. Cited 2013, July 29.
19. Holdhus R. (2009). Microarray Technologies [Power Point Slide]. Retrieved from http://www.bioinfo.no/training/j-express-microarray-analysis-course-bergen-september-17th-18th-2009/Microarray_Technologies_2009.pdf. Cited 2013, July 12.
20. Affymetrix. (2004). How Affymetrix Genechip DNA Microarray Works. Retrieved from <http://public.tgen.org/tgen.org/downloads/automation/Genotypingessentials.pdf>. Cited 2013, July 14.
21. Stony Brook School of Medicine. (2002). Affymetrix Platform compared to Stanford Platform. Retrieved from <http://www.osa.sunysb.edu/udmf/Affy-Platform-Comparison-Tech-Note.pdf>. Cited 2013, July 29.
22. Xu W. (2004). Introduction to Microarray Technology [Power Point Slide]. Retrieved from https://www.msi.umn.edu/sites/default/files/Intro_Microarray.pdf. Cited 2013, July 12.
23. UCB Statistic Group. (2004). Introduction to Microarray Technologies Technologies [Power Point Slide]. Retrieved from <http://www.stat.berkeley.edu/users/terry/Classes/s246.2004/Week9/2004L17Stat246.pdf>. Cited 2013, July 2013.
24. Ehrenreich A. DNA microarray technology for microbiologist: an overview. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 73: 255-73.
25. Band M. (2004). Agilent Microarray. Retrieved from <http://www.biotech.uiuc.edu/functionalgenomics/services-equipment/custommicroarrays>. Cited 2013, August 3.
26. Anderson SM. Applications of Microarray Technologies in Anatomic Pathology. *Connection* 2009; 76-79.
27. Xiang CC, Chen Y. cDNA Technology Microarray and its Applications. *Biotechnology Advances* 2000; 18: 35-46.
28. Domazet B, MacLennan GT, Beltran AL, Montironi R, Cheng L. Laser Capture Microdissection in the Genomic and Proteomic Era: Targeting the Genetic Basis of Cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2008; 1:475-78.
29. Rubin MA. Use of laser capture microdissection, cDNA microarrays and tissue microarrays in advancing our understanding of prostate cancer. *J Pathol* 2001; 195: 80-86.
30. Majtan T, Bukovska G, Timko J. DNA Microarrays- Techniques and Applications in Microbial Systems. *Folia Microbiol* 2004; 49: 635- 64.
31. Staal FJT, Burg MV, Wessels LFA, Barendregt BH, Baert MRM, Burg CMM, Huffel CV, Langerak AW *et al.* DNA microarrays for comparison of gene expression profiles between diagnosis and relapse in precursor B acute lymphoblastic leukemia: choice of technique and purification influence the identification of potential diagnostic markers. *The Netherlands Leukemia* 2003;17:1324-32.
32. Lowe T. (2004). DNA Microarrays Introduction [Power Point Slide]. Retrieved from <http://classes.soe.ucsc.edu/bme210/Winter04/lectures/Bio210w04-Lect02-Intro.pdf>. Cited 2013, July 7.
33. Fadiel A, Naftolin F. Microarray applications and challenges: a vast array of possibilities. *Int Arch Biosci* 2003;1111- 21.
34. Petricoin EF, Hackett JL, Lesko LJ, Puri RK, Gutman SI, Chumakov K, Woodcock J, Feigal DW, Zoon KC, Sistare FD. Medical applications of microarray technologies: a regulatory science perspective. *Nature genetics supplement* 2002; 32: 474-79.
35. Heller MJ. DNA MICROARRAY TECHNOLOGY: Devices, Systems, and Applications. *Annu Rev Biomed Eng* 2002;4:129-53.

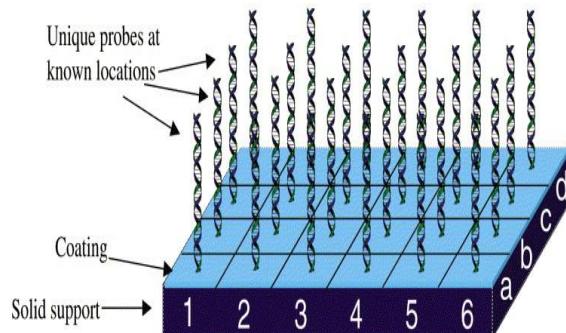
Daftar Pustaka bersambung ke halaman 45



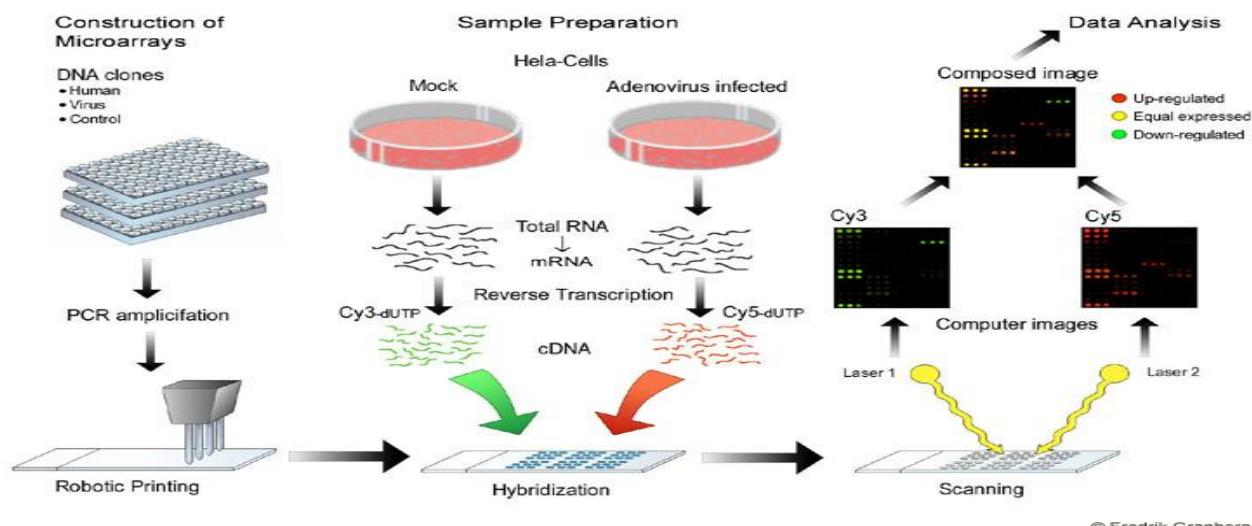
Gambar 1. *Robotic spotting* yang digunakan pada *spotted microarray*.¹²



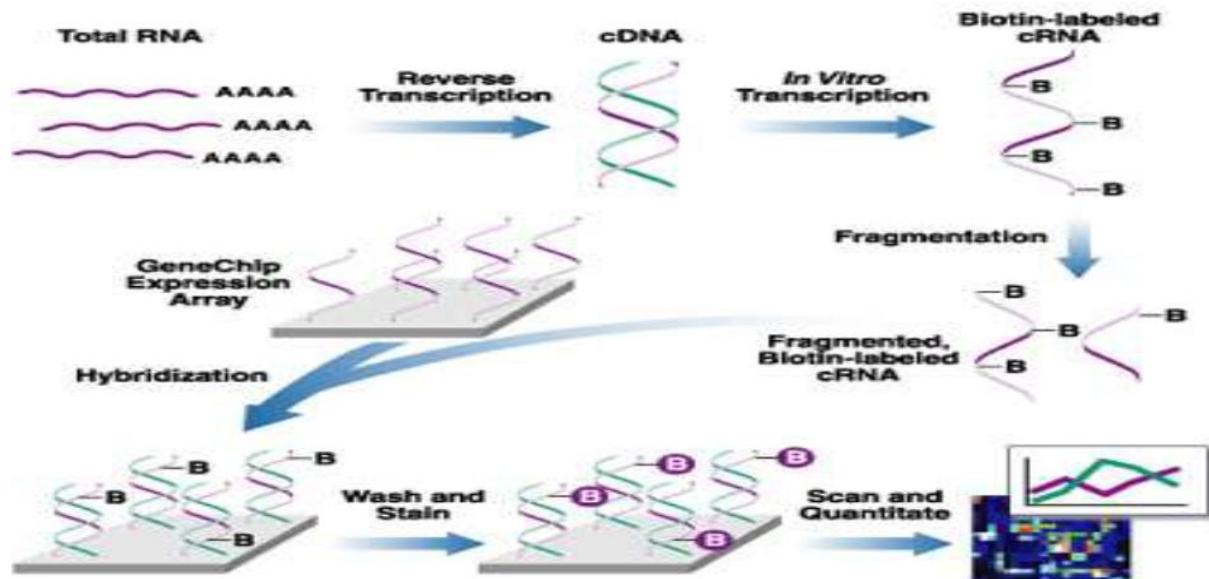
Gambar 3, GeneChip Affymetrix.²²



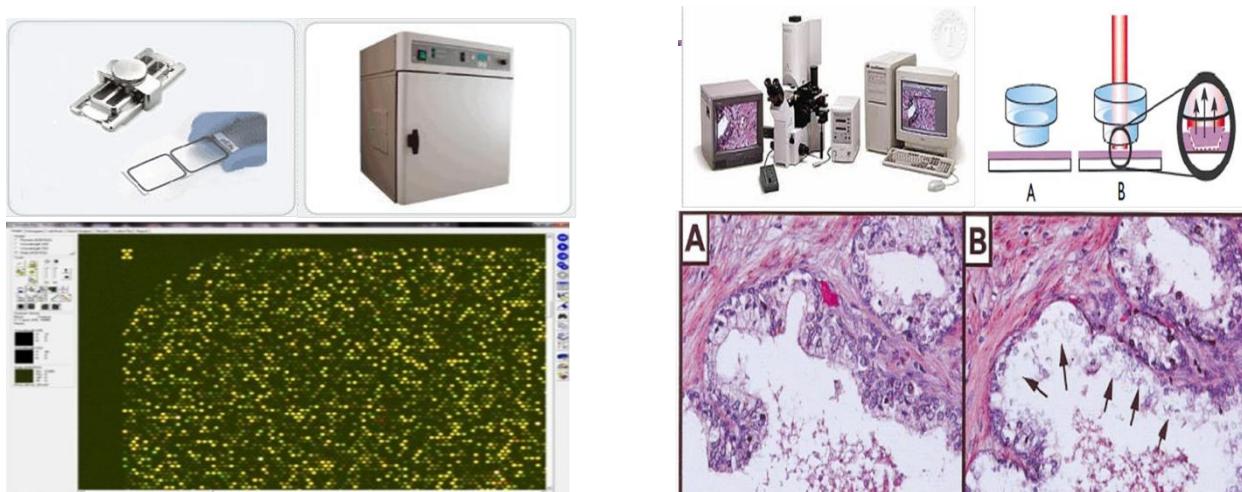
Gambar 2. Ilustrasi titik-titik (*spotted*) pada permukaan array tempat diletakan probe.¹⁶



Gambar 4. Proses penggunaan pada *spotted microarray*.¹⁵

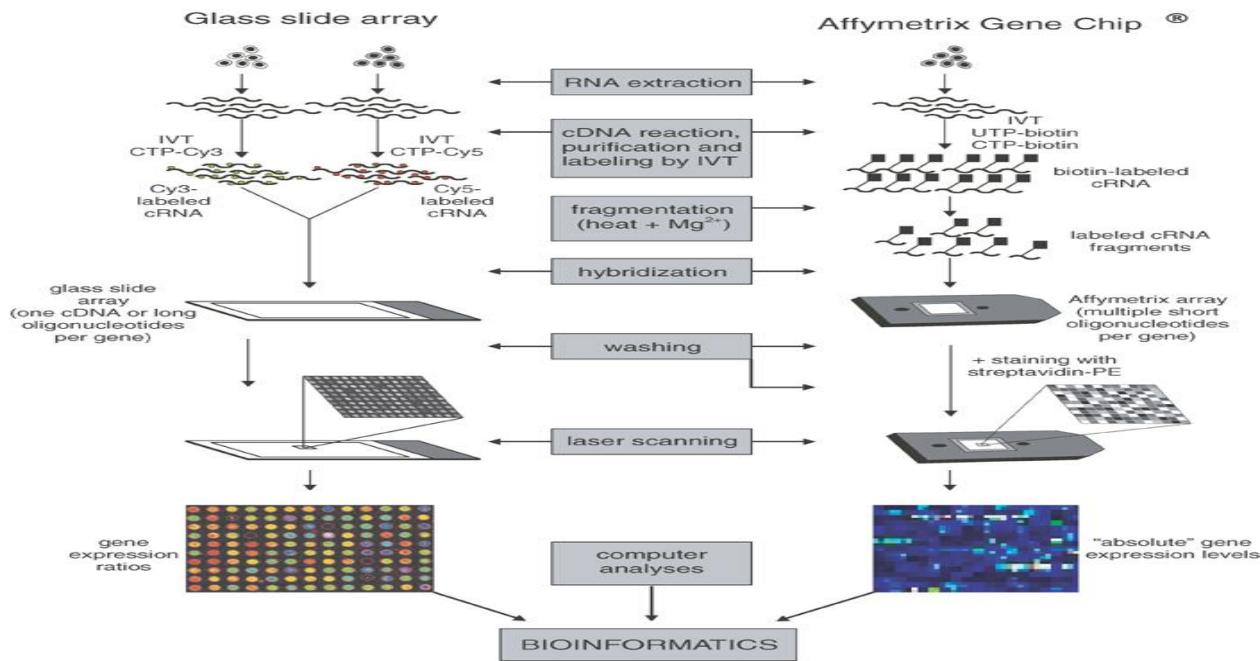


Gambar 5. Protokol penggunaan DNA microarray *genechip* untuk menganalisa gen.²³

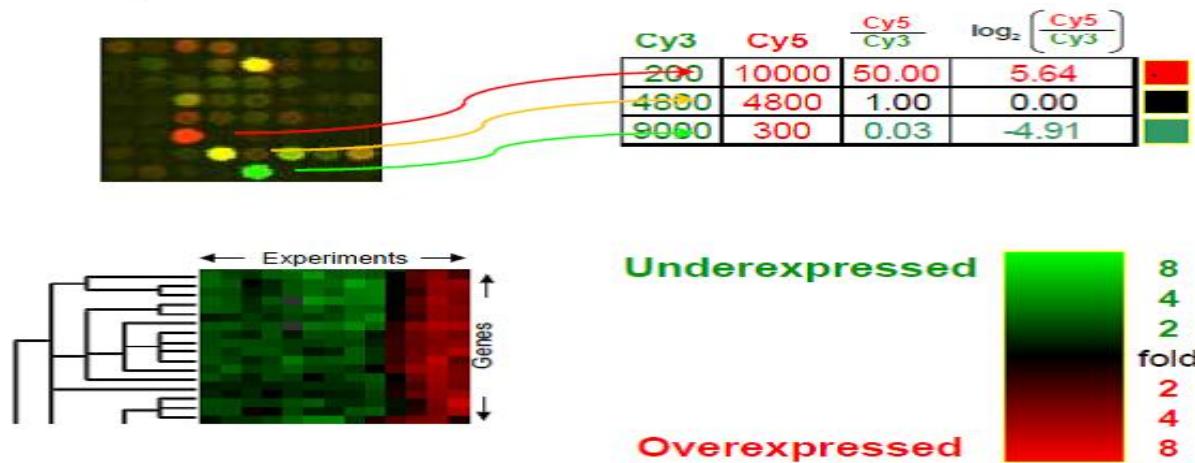


Gambar 6. Agilent microarray.²⁵

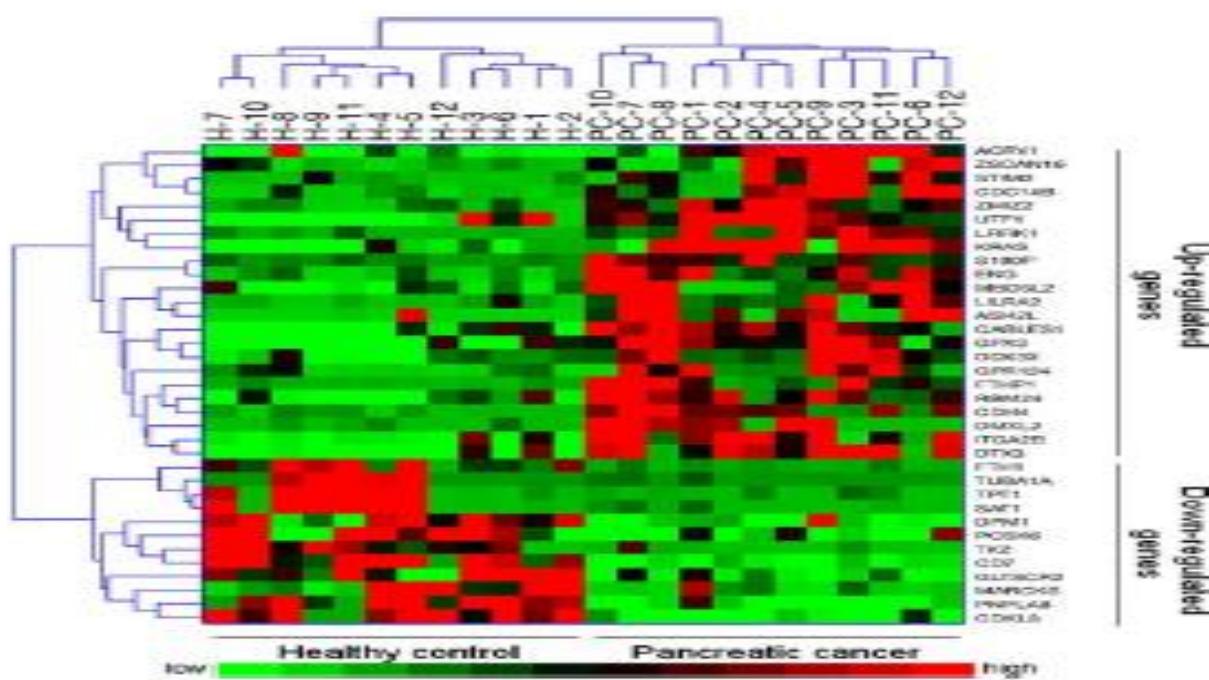
Gambar 7. Alat dari LCM dan teknik pemotongannya.²⁹



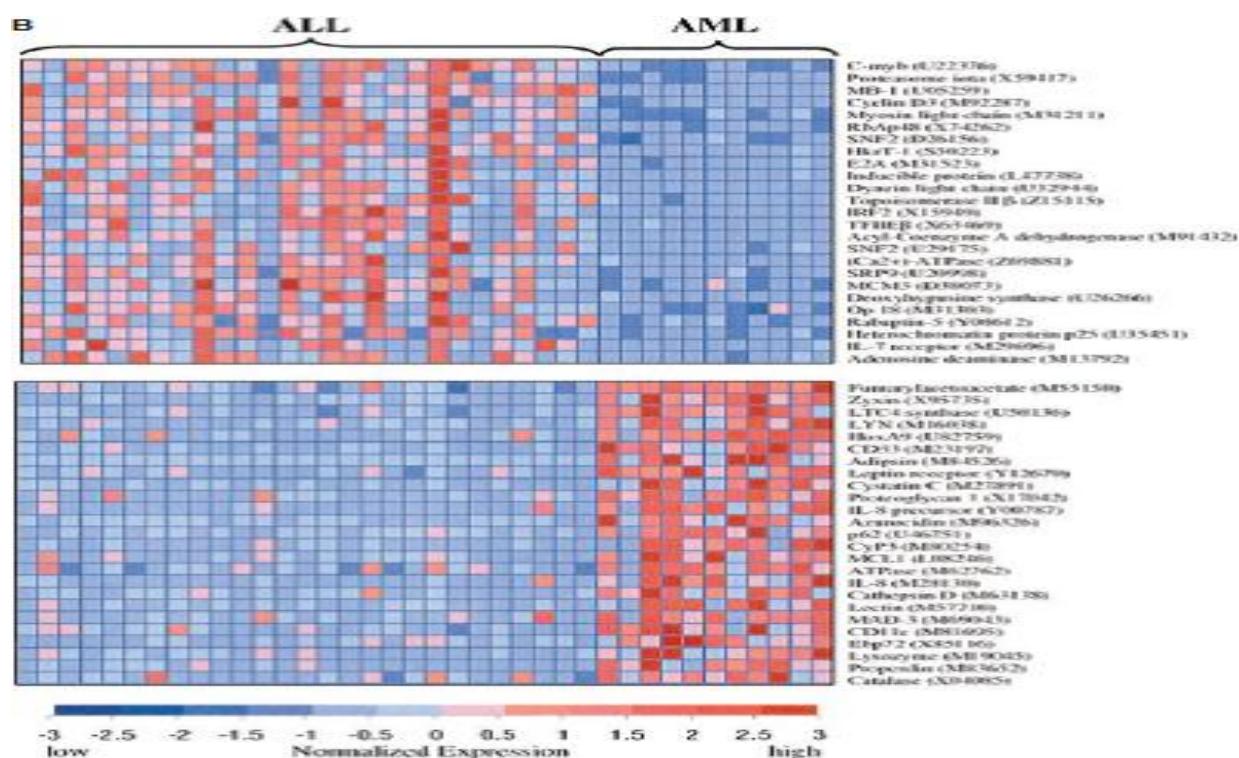
Gambar 8. Proses eksperimen menggunakan *microarray* mulai dari isolasi RNA hingga analisa data.³¹



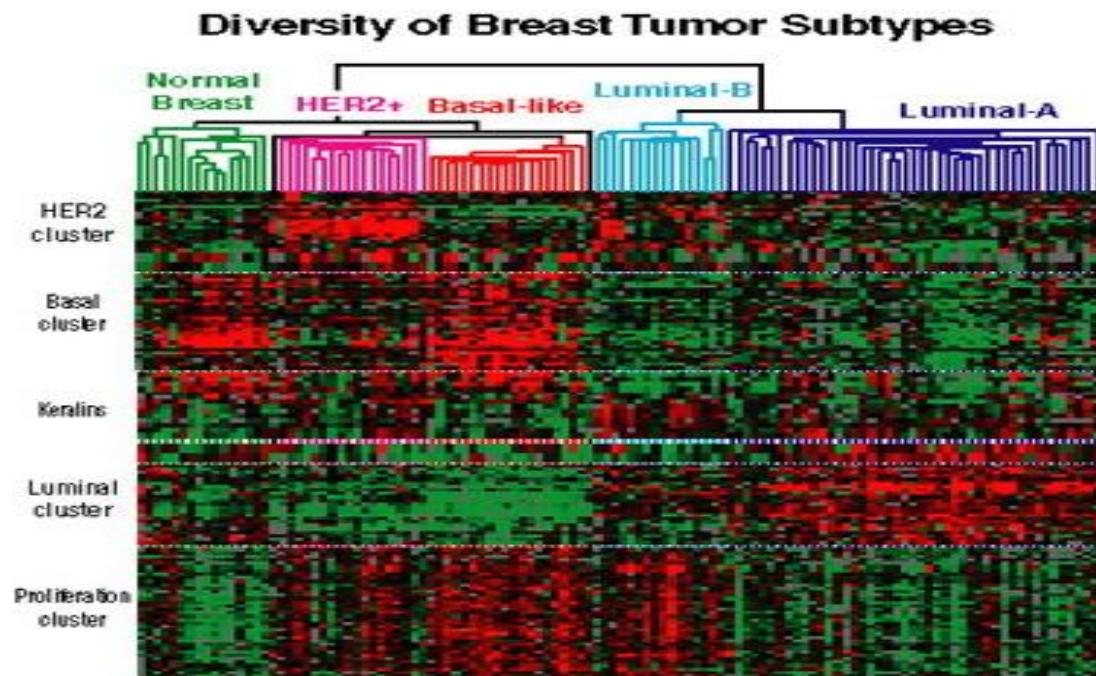
Gambar 9. Data yang didapat pada penggunaan *microarray*.³²



Gambar 10. Hasil analisis microarray pada penelitian identifikasi kanker pankreas dengan sampel saliva.³⁷



Gambar 11. Hasil profil 50 ekspresi gen yang menjadi pembeda AML dan ALL pada penelitian Golub *et al.*³⁸



Gambar 12. Pembagian subtipe kanker payudara oleh perou *et al* (2000).⁴¹

TISSUE	SIMILARITY SCORE	LOW 0–5	HIGH 100
Ovarian	60.8	♦	
Breast	5.9	♦	
Soft Tissue Sarcoma	5.1	♦	
Kidney	4.7	♦	
Gastric	4.0	♦	
Non-Small Cell Lung	3.0	♦	
Testicular Germ Cell	3.0	♦	
Pancreas	2.9	♦	
Hepatocellular	1.9	♦	
Colorectal	1.9	♦	
Non-Hodgkin's Lymphoma	1.6	♦	
Thyroid	1.6	♦	
Prostate	1.5	♦	
Bladder	1.4	♦	
Melanoma	0.7	♦	

Gambar 13. Contoh tabel analisis kesamaan dari jaringan asal tumor.²⁶

Lanjutan Daftar Pustaka

36. Afshari CA, Nuwaysir EF, Barret JC. Application of Complementary DNA Microarray Technology to Carcinogen Identification, Toxicology, and Drug Safety. *Cancer Res.* 1999; 59: 4759-60.
37. Zhang L, Farrel JJ, Zhou H, Elashoff D, Akin D, Park NH, Chia D, Wong DT. Salivary Transcriptomic Biomarkers for Detection of Resectable Pancreatic Cancer. *Gastroenterol.* 2010; 138: 949-57.
38. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek, Mesirov JP *et al.* Molecular Classification of Cancer: Class Discovery and Class Prediction by Gene Expression Monitoring. *SCIENCE* 1999; 286: 531-37.
39. Wadlow R, Ramaswamy S. DNA Microarrays in Clinical Cancer Research. *Current Molecular Medicine* 2005; 5: 111-20
40. Ramaswamy S, Golub TR. DNA Microarrays in Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001; 20: 1932-41.
41. Carolina Center for Genome Science. (2009). New Genomic Test May Guide Breast Cancer Treatment Choices. Retrieved from <http://genomics.unc.edu/news/articles/090209Perou.html>. Cited 2013, August 3.
42. Monzon FA, Meldeiros F, Weiler ML, Henner WD. Identification of tissue of origin in carcinoma of unknown primary with microarray based gene expression test. *Diagnostic pathology* 2010;5:1-9.