

## **Analisis transkriptomik: Aplikasinya dalam penyaringan, pengesahan dan pembangunan produk berasaskan herba**

(Transcriptomics analysis: Application in screening, validation and development of herbal based product)

Mohd Waznul Adly Mohd Zaidan

### **Pengenalan**

Herba telah digunakan oleh manusia secara tradisional beribu tahun yang lalu untuk merawat pelbagai jenis penyakit. Manusia telah menemui khasiat pelbagai herba yang didapati mempunyai keupayaan untuk merawat penyakit seperti batuk, demam, darah tinggi, kencing manis, antibakteria, antikulat dan pelbagai khasiat lain. Malahan, banyak ubat moden pada masa kini diekstrak daripada sumber tumbuh-tumbuhan seperti morfin yang diperolehi daripada bunga popi (*Papaver somniferum*) dan telah digunakan secara meluas dalam bidang perubatan moden masa kini sebagai agen analgesik untuk mengurangkan kesakitan.

Penggunaan herba yang digunakan secara tradisional harus disahkan tahap keselamatannya dan juga keupayaannya untuk merawat penyakit tertentu dengan sokongan data saintifik hasil penyelidikan moden yang telah dijalankan. Kemajuan sains dan teknologi dan perubatan yang terkini membolehkan banyak herba dikaji menggunakan teknologi moden terkini bagi mengesahkan potensi herba tersebut untuk digunakan bagi mengurangkan atau merawat penyakit tertentu dengan tahap pengambilan herba yang selamat untuk digunakan.

### **Analisis transkriptomik untuk pengesahan khasiat herba**

Dalam kajian pengesahan potensi herba dan tahap toksikologinya, model haiwan seperti mencit dan tikus serta kultur titisan sel mamalia manusia telah banyak digunakan sebagai model kajian. Ujian biokimia tertentu dilakukan bagi menentukan ekstrak herba yang diberi pada dos yang tertentu terhadap model kajian mampu untuk mengurangkan atau mengubati sesuatu jenis penyakit. Namun begitu, kemajuan dalam bidang biologi molekul dan juga penambahbaikan dalam kajian tapak laluan gen-gen berkaitan penyakit membolehkan kajian pengesahan ekstrak herba dilakukan menggunakan analisis transkriptomik. Penggunaan analisis transkriptomik untuk mengesahkan potensi herba bagi merawat dan mengurangkan sesuatu jenis penyakit dapat menguatkan lagi bukti saintifik yang menyokong sesuatu penemuan yang ditemui pada ekstrak herba itu agar ia mempunyai nilai untuk dikomersialkan.

Dewasa ini, terdapat banyak kajian yang telah melengkapkan pangkalan data mengenai gen-gen yang bertanggungjawab terhadap perkembangan penyakit yang muncul akibat gangguan

metabolik yang disebabkan oleh pendedahan yang berpanjangan terhadap gaya hidup dan juga terhadap persekitaran yang tidak sihat. Pangkalan data gen-gen berkaitan penyakit ini telah dikaji dan dikumpulkan dan telah membentuk tapak laluan yang bertanggungjawab terhadap kewujudan pelbagai jenis penyakit berkaitan dengan gangguan metabolik. Gen yang telah dikenal pasti ini mengalami gangguan yang menyebabkan ia dikawal atur dalam keadaan yang tidak normal. Pengawalan gen yang tidak normal ini menyebabkan gangguan kepada penghasilan protein atau metabolit yang seterusnya menyebabkan berlakunya gangguan mekanisme tertentu dalam sistem tubuh manusia. Oleh itu, profil pengekspresan gen-gen yang berkaitan dengan kewujudan penyakit ini boleh dikenal pasti dan pengesanan profil transkripsinya boleh dikesan melalui analisis transkriptomik yang dilakukan. Justeru, dengan adanya pangkalan data ini kajian perubahan profil pengekspresan gen yang berkaitan dengan sesuatu penyakit apabila rawatan ekstrak herba diberi dapat dilakukan dan seterusnya dapat menentukan keberkesanan ekstrak sesuatu herba dalam mencegah dan mengubati sesuatu jenis penyakit.

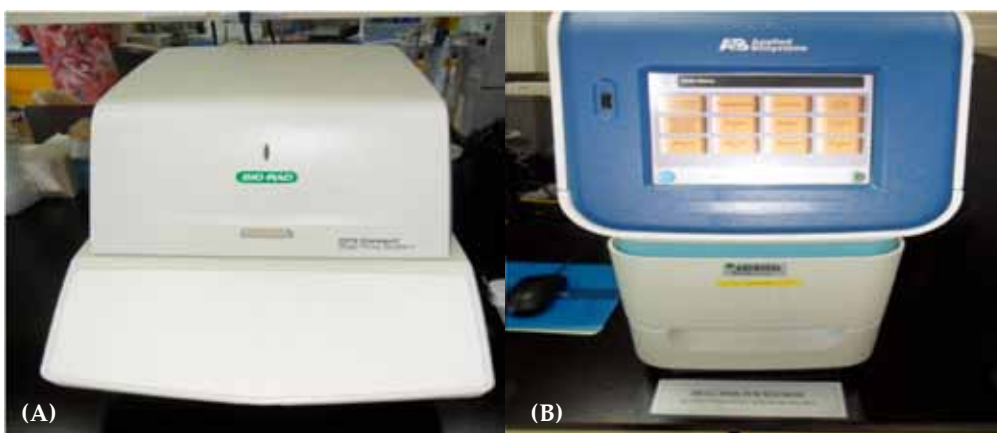
Pangkalan data gen-gen yang berkaitan penyakit ini dapat menerangkan bagaimana proses terjadinya sesuatu penyakit yang disebabkan oleh ketidakseimbangan dalam pengawalan gen-gen itu. Kebiasaannya, ia melibatkan banyak jenis gen yang dikawal atur secara tidak normal dan sering kali melibatkan pelbagai jenis tapak laluan pelbagai mekanisme. Pengawalan gen-gen ini melibatkan profil pengekspresan gen-gen tersebut sama ada ia ditindaskan atau aktiviti diekspreskan secara tidak terkawal. Oleh itu, pengukuran tahap pengawalan gen-gen berkaitan penyakit tersebut adalah berdasarkan tahap pengekspresan gen-gen tersebut apabila dibandingkan dengan tahap pengekspresannya pada keadaan yang normal. Secara umumnya, pengekspresan gen-gen berkaitan penyakit ini dapat ditentukan sama ada menggunakan teknologi analisis kuantitatif *Real-Time* PCR (qPCR) ataupun menggunakan kaedah penjujukan RNA menggunakan teknologi penjujukan generasi baharu.

Kaedah penjujukan RNA menggunakan teknologi penjujukan generasi baharu dapat memberi gambaran keseluruhan yang lebih meluas kerana ia membandingkan profil transkriptomik untuk sampel RNA terawat berbanding dengan kawalan. Namun begitu, kaedah ini melibatkan kos yang tinggi dan memerlukan banyak tenaga kerja bagi kerja-kerja analisis bioinformatik bagi menganalisis keputusan penjujukan RNA yang dilakukan. Kaedah analisis *Real-Time* PCR (qPCR) dilihat lebih mudah dan cepat untuk dilakukan kerana terdapat pelbagai cip DNA yang telah dikomersialkan bagi analisis transkriptomik untuk pengesanan profil pengekspresan gen berkaitan pelbagai jenis penyakit (*Gambar 1*). Selain itu kaedah qPCR adalah lebih murah dan dapat mengukur tahap pengekspresan gen yang diminati secara kuantitatif serta sangat sensitif.

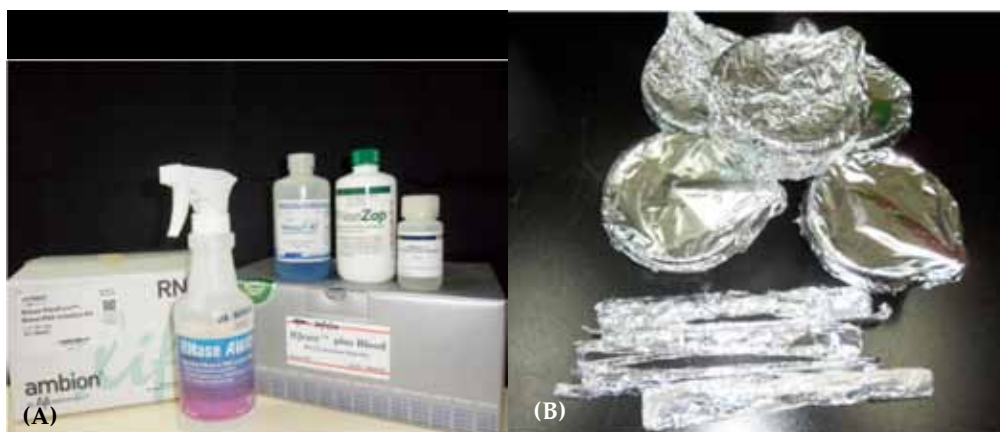
### Analisis pengekspresan gen menggunakan qPCR

Kajian transkriptomik untuk analisis pengekspresan gen berkaitan penyakit yang telah dirawat dengan ekstrak herba haruslah bermula dengan kerja pemencilan asid ribonukleik atau juga dikenali sebagai RNA keseluruhan daripada sampel yang dikaji sama ada daripada sampel darah ataupun menggunakan organ yang tertentu. Kerja pemencilan RNA merupakan proses yang sangat kritikal kerana RNA merupakan komponen biologi yang mudah terdegradasi. Oleh yang demikian, langkah pencegahan untuk mengawal degradasi RNA perlu dilakukan bagi mengelak keputusan transkriptomik yang tidak tepat hasil daripada penggunaan RNA yang tidak berkualiti (*Gambar 2*).

Antara langkah yang dilakukan bagi mengelak degradasi RNA adalah dengan merencat atau menyahaktifkan RNase (*Ribonuclease*) iaitu enzim yang bertanggungjawab mencerna RNA yang akan dipencilkan. RNase boleh dinyahaktifkan dengan



*Gambar 1. Peralatan kitar termo Real-Time PCR untuk analisis pengekspresan gen secara kuantitatif. A: Kitar termo Real-Time PCR CFX 384 Biorad. B: Kitar termo Real-Time PCR ABI Step One Plus*



*Gambar 2. Peralatan dan kit bebas RNase untuk pemencilan RNA. A: Kit bagi pemencilan RNA sampel darah dan organ. B: Mortar dan pestle yang telah dibakar selama 2 jam pada suhu 200 °C*

menggunakan perencat seperti DEPC (*Diethylpyrocarbonate*) yang menyebabkan ia tidak dapat mencernakan RNA daripada sampel biologi yang diperolehi. Semua peralatan atau larutan berasaskan air haruslah dirawat dengan bahan kimia DEPC untuk memastikan RNA yang digunakan dalam analisis transkriptomik ialah RNA yang sempurna tanpa degradasi. Selain itu, peralatan seperti alatan kaca dan seramik yang digunakan perlu dibakar pada suhu 200 °C selama 2 jam bagi memusnahkan RNase yang wujud pada peralatan tersebut. Untuk memelihara sampel darah atau organ yang akan digunakan untuk pemencilan RNA, terdapat bahan kimia seperti *RNA Later* yang boleh digunakan untuk mencegah pencernaan RNA oleh enzim RNase. Langkah-langkah yang telah dinyatakan adalah sangat penting bagi memastikan RNA yang berkualiti diperolehi untuk kajian transkriptomik.

Penggunaan kaedah pemencilan RNA yang sesuai juga amat penting bagi memastikan RNA yang diperolehi memenuhi kriteria ketulenan dan kepekatan yang baik. RNA yang tulen dan bebas daripada kontaminasi protein dan polisakarida sesuai digunakan dalam analisis transkriptomik menggunakan kaedah qPCR. Ini kerana penggunaan RNA yang berkualiti baik adalah faktor kritikal bagi mendapatkan data analisis pengekspresan gen yang bermakna dan mempunyai kebolehpercayaan yang tinggi. Selain itu, pemencilan RNA keseluruhan haruslah bebas daripada kontaminasi DNA genomik kerana kontaminasi DNA genomik akan memberi keputusan yang tidak tepat terhadap kajian pengekspresan gen yang dilakukan.

Penggunaan kaedah pemencilan RNA berbeza untuk jenis sampel yang berbeza. Contohnya, pemencilan RNA daripada sampel yang mempunyai kandungan sel lemak yang tinggi lebih sesuai menggunakan kaedah yang berasaskan fenol berbanding dengan pemencilan RNA daripada sel kultur mamalia yang menggunakan kaedah berasaskan kolum yang lebih mudah. Selain itu, terdapat banyak kaedah pemencilan RNA yang menggunakan bahan kimia seperti CTAB, SDS, guanidine isothiocyanate, lithium klorida dan sebagainya yang sering digunakan bagi memencilkan RNA keseluruhan yang berkualiti tinggi.

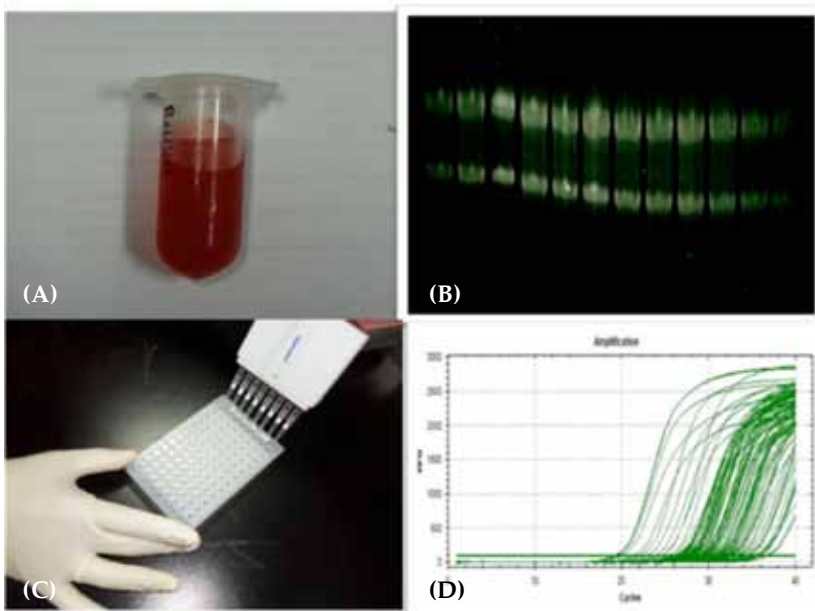
Secara umumnya, ketulenan RNA diukur melalui nisbah penyerapan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm ( $OD_{A260/280}$ ) dan nilai ketulenan RNA yang baik berada dalam julat 1.9 – 2.1. Selain itu, nisbah penyerapan panjang gelombang 260 nm dan 230 nm ( $OD_{A260/230}$ ) diukur dengan nilainya haruslah lebih besar daripada 1.7 bagi memastikan sampel RNA yang dipencilkan adalah bebas daripada kontaminasi protein. RNA keseluruhan yang tulen dan berjaya dipencilkan akan digunakan dalam sintesis cDNA untuk kegunaan analisis pengekspresan gen menggunakan kaedah qPCR. cDNA yang telah disintesis akan digunakan sebagai templat bagi analisis transkriptomik menggunakan kaedah qPCR.

Terdapat beberapa asai yang telah dikomersialkan bagi analisis pengekspresan gen yang berkaitan penyakit. Salah satu contohnya adalah penggunaan teknologi PCR Array. PCR Array

menawarkan analisis pengekspresan gen berkaitan penyakit menggunakan kaedah qPCR yang telah dioptimumkan. Sistem PCR Array ini memfokuskan kepada beberapa panel gen yang menggunakan qPCR berasaskan *SYBR Green*. Ia menggabungkan keupayaan qPCR yang kuantitatif dengan keupayaan mikroatur untuk pemprofilan pelbagai jenis gen. Setiap PCR Array memprofil 84 gen yang berkaitan dengan tapak laluan yang spesifik atau keadaan sesuatu penyakit. Tahap pengekspresan gen diukur menggunakan pencetus qPCR untuk gen yang spesifik secara serentak dalam sistem PCR Array (*Gambar 3*).

Komponen utama dalam sistem PCR Array ialah asai pencetus qPCR yang digunakan. Setiap asai qPCR yang terdapat pada PCR Array tersebut direka secara unik untuk kegunaan analisis qPCR menggunakan pewarna pengesanan *SYBR Green*. Rekaan asai tersebut memastikan setiap tindak balas qPCR akan menghasilkan amplicon tunggal dan spesifik dan mencegah daripada amplifikasi terhadap produk yang tidak spesifik. Penggunaan qPCR asai dalam PCR Array telah dioptimumkan untuk berfungsi dalam keadaan piawai dan membolehkan asai pelbagai jenis gen dilakukan secara serentak. Sistem PCR Array ini juga direka untuk mengatasi cabaran bagi memprofil beberapa set gen yang memfokuskan tapak laluan tertentu menggunakan teknologi qPCR.

Analisis pengekspresan gen memerlukan nilai keberkesanan qPCR yang sama supaya perbandingan antara gen dapat dilakukan secara tepat. Pencetus asai qPCR direka dengan saiz amplicon dalam lingkungan 100 – 250 pasangan bes dengan keberkesanan PCR yang seragam iaitu melebihi nilai 90%. Secara



*Gambar 3. A: Sampel darah untuk pemencilan RNA keseluruhan. B: RNA keseluruhan yang telah dipencilkan. C: Pempipetan sampel RNA ke dalam asai PCR Array. D: Amplifikasi plot cDNA hasil kitar termo Real-Time PCR*

keseluruhannya, sebanyak 10 kriteria termodinamik yang diambil kira bagi mereka setiap pencetus asai qPCR dalam teknologi PCR Array supaya keputusan yang tepat dan boleh dipercayai diperoleh untuk analisis pengekspresan gen menggunakan sistem PCR Array. Sistem PCR Array ini menyediakan analisis pengekspresan gen untuk pelbagai jenis penyakit seperti kanser, diabetes, keradangan, penyakit kardiovaskular, obesiti, penyembuhan luka dan sebagainya. Kesemua jenis penyakit ini melibatkan gen-gen untuk organisma khusus sama ada daripada mencit atau tikus atau gen-gen yang terlibat dalam pembentukan penyakit manusia secara khusus.

### **Aplikasi analisis transkriptomik dalam pembangunan produk herba di MARDI**

Teknologi PCR Array untuk analisis transkriptomik bagi pengesanan kesan ekstrak tumbuhan terhadap penyakit atheroskleorosis telah dijalankan di Pusat Penyelidikan Bioteknologi, MARDI. Atheroskleorosis merupakan penebalan salur arteri darah yang disebabkan oleh pengumpulan kalsium dan komponen lemak seperti kolesterol dan trigliserida. Penyakit ini menyebabkan keanjalan dinding arteri semakin berkurangan dan menyebabkan pengaliran darah tidak dapat melalui salur arteri dengan sempurna. Keadaan ini menyebabkan berlaku peningkatan tekanan darah dan juga merupakan antara penyebab berlaku penyakit strok dan lemah jantung. Kajian ekstrak tumbuhan iaitu campuran ekstrak dukung anak (*Phyllanthus watsonii*), belimbing (*Averrhoa carambola*) dan betik (*Carica papaya*) telah dilakukan terhadap mencit yang telah diaruhkan untuk mempunyai kandungan kolesterol yang tinggi dalam darah.

Mencit yang telah dirawat dengan campuran ekstrak tumbuhan tersebut telah diambil sampel darah dan jantungnya dan pemencilan RNA dan sintesis cDNA telah dilakukan ke atas sampel tersebut. Seterusnya analisis transkriptomik gen-gen berkaitan atheroskleorosis dijalankan terhadap sampel cDNA mencit terawat dengan campuran ekstrak tumbuhan tersebut. PCR Array untuk *Mouse Atherosclerosis RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR Array* daripada Qiagen telah digunakan bagi memprofil kesan ekstrak tumbuhan yang digunakan terhadap gen-gen berkaitan penyakit. Dalam sistem asai ini, ia melibatkan pemprofil 84 jenis gen berkaitan penyakit atheroskleorosis yang terlibat dalam tapak laluan tindak balas terhadap tekanan, apoptosis, pengaliran dan pembekuan darah, molekul pelekatan, molekul ekstraselular, metabolisme dan pengangkutan lemak, pertumbuhan dan percambahan sel dan juga pengawal atur transkripsi. Kesemua profil gen ini dinormalisasi menggunakan 5 jenis gen perujuk sebagai kawalan dalaman untuk meminimumkan ralat antara sampel yang berbeza.

Hasil pemprofilan gen-gen berkaitan penyakit atheroskleorosis untuk sampel terawat ekstrak herba tersebut telah dibandingkan dengan sampel kawalan bagi menentukan

kesan gen-gen tersebut terhadap rawatan ekstrak herba yang diberikan. Perubahan pengekspresan gen yang terkesan terhadap rawatan ekstrak tumbuhan tersebut telah dikaji menggunakan analisis bioinformatik. Analisis bioinformatik dapat menentukan dan memberi gambaran tentang kesan ekstrak tumbuhan yang mengawal atur gen-gen/tapak laluan berkaitan atheroskleorosis secara positif bagi merawat penyakit tersebut. Selain itu, keputusan yang diperoleh juga dibandingkan dengan keputusan ujian biokimia yang dijalankan bagi mengesahkan potensi campuran ekstrak tumbuhan untuk mengurang atau mengubati penyakit atheroskleorosis. Keputusan yang diperoleh daripada analisis transkriptomik dapat membongkar kesan ekstrak tumbuhan ini dalam membetulkan ketidaknormalan dalam penebalan salur arteri di samping menyokong data ujian biokimia yang telah dijalankan.

### **Bibliografi**

- Abdel-Rahman, A., Anyangwe, N., Caracci, L., Casper, S., Danam, R.P., Enongene, E., Erives, G., Fabricant, D., Gudi, R., Hilmas, C.J., Hines, F., Howard, P., Levy, D., Lin, Y., Moore, R.J., Pfeiler, E., Thurmond, T.S., Turujman, S. dan Walker, N.J. (2011). The safety and regulation of natural products used as foods and food Ingredients. *Toxicological Sciences* 123(2): 333 – 348
- Afman, L. dan Müller, M. (2006). Nutrigenomics: From molecular nutrition to prevention of disease. *Journal of the American dietetic association* 106(4): 569 – 576
- Gaj, S., Eijssen, L., Mensink, R. dan Evelo, C. (2008). Validating nutrient-related gene expression changes from microarrays using RT2 PCR-Arrays. *Genes & nutrition* 3(3 – 4): 153 – 157
- Guo, L., Mei, N., Xia, Q., Chen, T., Chan, P.C. dan Fu, P. P. (2010). Gene expression profiling as an initial approach for mechanistic studies of toxicity and tumorigenicity of herbal plants and herbal dietary supplements. *Journal of Environmental Science and Health Part C* 28(1): 60 – 87
- Kaput, J. (2005). Decoding the pyramid: A systems-biological approach to nutrigenomics. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1055(1): 64 – 79
- Li, Y. dan Agarwal, P. (2009). A pathway-based view of human diseases and disease relationships. *PLoS ONE* 4(2): e4346
- Low, Y.L. dan Tai, E.S. (2007). Understanding diet-gene interactions: lessons from studying nutrigenomics and cardiovascular disease. *Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 622(1): 7 – 13
- Manning-Tobin, J.J., Moore, K.J., Seimon, T.A., Bell, S.A., Sharuk, M., Alvarez-Leite, J.L., De Winther, M.P., Tabas, I. dan Freeman, M.W. (2009). Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology* 29(1): 19 – 26
- Poeaknapo, C., Schmidt, J., Brandsch, M., Dräger, B. dan Zenk, M.H. (2004). Endogenous Formation of Morphine in Human Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(39): 14091 – 14096
- Ulrich-Merzenich, G., Zeitler, H., Jobst, D., Panek, D., Vetter, H. dan Wagner, H. (2007). Application of the “-Omic-” technologies in phytomedicine. *Phytomedicine* 14(1): 70 – 82

- Vermeulen, J., De Preter, K., Lefever, S., Nuytens, J., De Vloed, F., Derveaux, S., Hellemans, J., Speleman, F. dan Vandesompele, J. (2011). Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 39(9): 11
- Zhang, X., Ding, L. dan Sandford, A.J. (2005). Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* 6(1): 4

### **Ringkasan**

Khasiat herba dalam mencegah dan mengubati penyakit dapat disahkan melalui kajian interaksi antara diet dengan gen. Ekstrak herba atau sebatian aktif daripada herba boleh ditentukan potensinya sebagai produk nutraseutikal melalui kajian pengekspresan gen-gen yang berkaitan dengan penyakit yang khusus menggunakan analisis kuantitatif *Real-Time* PCR. Dalam pendekatan analisis transkriptomik ini, kesan rawatan ekstrak herba yang diberi akan ditentukan melalui profil pengekspresan gen yang diperolehi. Ekstrak herba yang diberi akan mengawal atur gen yang berkaitan penyakit tersebut untuk berfungsi secara normal. Gen-gen yang terkesan terhadap rawatan ekstrak herba ini akan dianalisis dan tapak laluan gen-gen ini akan dikenal pasti. Tapak laluan gen-gen yang telah dikenal pasti membolehkan kesimpulan dapat dibuat mengenai kesan ekstrak tumbuhan ini dalam mengawal atur mekanisme untuk mengawal dan mengubat sesuatu penyakit.

### **Summary**

Herbal nutrition in preventing and treating of diseases can be confirmed by studying the interactions between diet and genes. The potential of herbal extracts or its active compound as neutraceutical products can be determined by studying the expression of genes related to specific diseases using quantitative Real-Time PCR. In this transcriptomics analysis approach, the result of the herbal extract treatment will be determined by the gene expression profiles obtained. The extracts given will regulate the genes related to the disease to function normally. This treated gene will be analysed and its pathways identified. This identified pathway will reveal the effect of plant extract in regulating the mechanism to control and cure certain diseases.

### **Pengarang**

Mohd Waznul Adly Mohd Zaidan  
Pusat Penyelidikan Bioteknologi, Ibu Pejabat MARDI, Serdang,  
Peti Surat 12301, 50774 Kuala Lumpur  
E-mel: nol@mardi.gov.my