OPTIMALISASI METODE ISOLASI DNA DARI SAMPEL FORMALIN-FIXED, PARAFFIN-EMBEDDED (FFPE) PASIEN TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER UNTUK NEXT-GENERATION SEQUENCING

SKRIPSI

oleh AYU DESI ARTHA 145090107111024



JURUSAN BIOLOGI FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG 2018

OPTIMALISASI METODE ISOLASI DNA DARI SAMPEL FORMALIN-FIXED, PARAFFIN-EMBEDDED (FFPE) PASIEN TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER UNTUK NEXT-GENERATION SEQUENCING

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam Bidang Biologi

> oleh AYU DESI ARTHA 145090107111024



JURUSAN BIOLOGI FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG 2018

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

OPTIMALISASI METODE ISOLASI DNA DARI SAMPEL FORMALIN-FIXED, PARAFFIN-EMBEDDED (FFPE) PASIEN TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER UNTUK NEXT-GENERATION SEQUENCING

AYU DESI ARTHA 145090107111024

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal 01 November 2018 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui

Pembimbing I

Pembimbing II

<u>Dr. Drs. Agung P. W. M, M.Si.</u> NIP 196506161991111001 Ahmad R. H. Utomo, Ph.D. NIK 070800034

Mengetahui Ketua Program Studi S-1 Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Rodiyati Azrianingsih, S.Si., M.Sc., Ph.D. NIP 197001281994122001

HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ayu Desi Artha NIM : 145090107111024

Jurusan : Biologi

Penulis Skripsi Berjudul: Optimalisasi Metode Isolasi DNA dari

Sampel Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) Pasien Triple Negative Breast Cancer untuk Next-Generation Sequencing

Dengan ini menyatakan bahwa:

- Skripsi ini adalah benar-benar karya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka Skripsi ini semata-mata digunakan sebagai acuan atau referensi.
- 2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi Skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung segala resiko.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 15 November 2018 Yang menyatakan,

Ayu Desi Artha 145090107111024

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



BRAWIJAYA

Optimalisasi Metode Isolasi DNA dari Sampel Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) Pasien Triple Negative Breast Cancer untuk Next-Generation Sequencing

Ayu D. Artha, Agung P. W. Marhendra, Ahmad R. H. Utomo Program Sarjana Universitas Brawijaya 2018

ABSTRAK

Rendahnya kualitas dan kuantitas DNA FFPE masih menjadi dalam setiap analisis menggunakan Next-Generation Sequencing (NGS). Tujuan penelitian ini yaitu untuk menentukan jumlah input sampel FFPE, cara deparafinasi dan waktu inkubasi yang optimal menggunakan QIAamp DNA FFPE Kit dan GeneRead DNA FFPE Kit untuk mendapatkan isolat DNA FFPE yang sesuai dengan standar peruntukan NGS. Penelitian ini dilakukan selama 6 bulan (Februari – Juli 2018) di Laboratorium Stem Cell and Cancer Institute (SCI), Kalbe Farma Tbk., Jakarta Timur. Sampel FFPE berasal dari arsip pasien kanker payudara RS. Dharma Nugraha dan telah disetujui oleh komite etik SCI. Perlakuan yang diberikan meliputi jumlah input sampel 3 x 10 µm dan 6 x 10 µm, metode deparafinasi di slide glass dan *microtube*, dan variasi waktu inkubasi dalam Proteinase-K pada suhu 56 °C selama 1 jam, 4 jam, dan 16 jam. Parameter yang diukur dalam penelitian ini adalah konsentrasi dsDNA dengan target sebesar 25 ng/µL, diukur dengan Qubit Fluorometer. Integritas DNA diuji Polymerase quantitative Chain Reaction menggunakan SYBR Green I dyes, sampel dengan nilai kuantifikasi $(\Delta Cq) \leq 2$ dapat digunakan untuk proses *library preparation* untuk NGS. DNA diamplifikasi menggunakan AFP2 custom amplicon design yang ditujukan untuk BRCA1/2 germline assay. Produk PCR dengan ukuran ~350 bp menunjukkan kualitas DNA yang baik untuk disekuensing. Hasil penelitian menunjukkan bila jumlah input sampel FFPE sebanyak 6 x 10 µm, metode deparafinasi di slide glass, dan waktu inkubasi 4 jam dalam Proteinase-K pada suhu 56°C merupakan kondisi optimum untuk mendapatkan isolat DNA yang dibutuhkan untuk NGS. Kapabilitas Kit QA dan Kit GR untuk isolasi DNA tidak berbeda signifikan.

Kata kunci: Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, isolasi DNA, Next-Generation Sequencing, qPCR, Qubit

Optimizing DNA Isolation Method from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) Samples of Triple Negative Breast Cancer Patients for Targeted Next-Generation Sequencing

Ayu D. Artha, Agung P. W. Marhendra, Ahmad R. H. Utomo Biology Department, Faculty of Mathematics and Natural Science Brawijaya University 2018

ABSTRACT

The low quality and quantity of DNA FFPE is still an obstacle in every analysis using Next-Generation Sequencing (NGS). This study to determine the number of FFPE sample input, optimal deparaffination method and incubation time using QIAamp DNA FFPE Kit (QA) and GeneRead DNA FFPE Kit (GR) to obtain the appropriate DNA FFPE isolates for NGS. This study was conducted for 6 months (February - July 2018) at the Stem Cell and Cancer Institute (SCI) Laboratory, Kalbe Farma Tbk., East Jakarta. The FFPE samples are obtained from Dharma Nugraha Hospital breast cancer patients archives and has been approved by the SCI ethics committee. The method involving variation of input number of FFPE samples (3 x 10 µm dan 6 x 10 µm), deparaffinization on the slide glass and microtube, and enzyme digestion 1 hour, 4 hours and 16 hours using proteinase-K at 56°C. The parameters measured in this study are dsDNA concentration in 25 ng/µL as a target, measured by Qubit Fluorometer. DNA integrity was measured by quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) using SYBR Green I dyes, samples with quantification values (ΔCq) ≤ 2 can be selected to library preparation process for NGS assay. DNA was amplified using AFP2 custom amplicon design intended for BRCA1/2 germline assay. Expected PCR product from library preparation ~ 350 bp showed good DNA quality for sequencing using NGS. The optimum condition to extract DNA FFPE from the samples that ware deparaffinized on the slide glass, digested for 4 hours in Proteinase-K at 56°C with 6 x 10 µm input number of FFPE samples. QA kit capabilities have no significantly different from GR Kit.

Keywords: DNA isolation, Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, Next-Generation Sequencing, qPCR, Oubit

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulisan Skripsi ini dapat terselesaikan. Skripsi ini dibuat dalam rangka memenuhi syarat untuk memperoleh gelar sarjana di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

Interconnectedness is a universal way of life, penyelesaian penulisan Skripsi ini juga tidak terlepas dari dukungan dan motivasi berbagai pihak. Terima kasih penulis ucapkan kepada:

- 1. Ibu Endang Kartini selaku ibu penulis dan Daniel Thiele selaku pendukung penulis yang telah memberikan doa, dukungan dan motivasi yang tidak terkira.
- 2. Dr. Drs. Agung P. W. M., M.Si selaku Dosen Pembimbing I yang mendampingi dan memberikan saran dalam penyelesaian skripsi.
- 3. Ahmad R. H. Utomo, Ph.D selaku Dosen Pembimbing II yang mendampingi, memberikan pengarahan dan tambahan ilmu serta kesempatan dan dukungan penuh kepada penulis dalam penyelesaian skripsi.
- 4. Dr. Sri Rahayu, M.Kes selaku Dosen Penguji yang telah memberikan saran untuk perbaikan penyusunan skripsi.
- 5. Prof. Widodo, S.Si., M.Si., Ph.D, Med.Sc. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah mendidik dan membimbing serta memberikan kesempatan dan dukungan.
- 6. Gintang Prayogi S.Si, Matheus Alvin Prawira, S.Si, Dicky Kurniawan, Elory Leonard, rekan-rekan *SCI* dan *KalGen* Kalbe Farma Tbk, Amino 2014, civitas akademik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya dan seluruh pihak yang telah mendukung penyelesaian skripsi ini.

Penulis berharap Skripsi ini memberikan manfaat dalam pengembangan ilmu pengetahuan. Penulis menyadari bahwa penulisan Skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran sangat dibutuhkan oleh penulis.

Malang, 01 November 2018

Penulis

DAFTAR ISI

		Halaman
ABSTR	AK	V
ABSTR	ACT	vi
KATA 1	PENGANTAR	vii
DAFTA	R ISI	viii
DAFTA	R TABEL	X
DAFTA	R GAMBAR	xi
DAFTA	R LAMPIRAN	xiii
DAFTA	R LAMBANG DAN SINGKATAN	xiv
BAB I P	PENDAHULUAN	1
1.1	Latar Belakang	1
1.2		3
1.3	Tujuan Penelitian	4
1.4	Manfaat Penelitian	4
BAB II	TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1	Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE)	5
2.2	Faktor-faktor yang Mempengaruhi Kualitas Isolat	
	DNA FFPE	5
2.3	Dampak Fiksasi Jaringan terhadap Kualitas Asam	
	Nukleat	8
2.4	Perbandingan antara GeneRead DNA FFPE Kit	
	dan QIAamp DNA FFPE Kit	11
BAB III	METODE PENELITIAN	13
3.1	Waktu dan Tempat	13
3.2	Deskripsi Sampel FFPE dan Kelompok Perlakuan	13
3.3	Deparafinasi Sampel FFPE	13
3.4	Isolasi DNA Menggunakan QIAamp DNA FFPE	
	Kit	15
3.5	Isolasi DNA Menggunakan GeneRead DNA	
	FFPE Kit	15
3.6	Kuantifikasi DNA	16
3.7	Pengujian Integritas DNA	16
3.8	Library Preparation	17
3.9	Analisis Data	19

BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	20
4.1	Pengaruh Jumlah Input Sampel FFPE Dan Proses	
	Deparafinasi Sampel FFPE terhadap Konsentrasi	
	DNA	20
4.2	Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Konsentrasi	
	dsDNA	28
4.3	Integritas DNA FFPE	31
	Validasi Metode Isolasi yang Optimal Menggu-	
	nakan Sampel FFPE TNBC	37
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN	45
5.1	Kesimpulan	45
	Saran	45
	R PUSTAKA	46
LAMPI	RAN	50

DAFTAR TABEL

Nomor	Ha	alaman
1.	Reagen yang Digunakan dalam Setiap Tahap	
	Isolasi DNA FFPE Menggunakan Kit yang	
	Berbeda dari Qiagen	12
2.	Kelompok perlakuan	14
3.	Hasil Uji Analisis Varian Tiga Arah dari	
	Konsentrasi dsDNA	23
4.	Hasil Uji Analisis Varian Dua Arah dari	
	Konsentrasi de DNA	30



DAFTAR GAMBAR

Nomor	I	Halaman
1.	Kerusakan DNA yang Terjadi pada Sampel FFPE	9
2.	Methylene Bridge Formation	9
3.	Hidrolisis Ikatan Fosfodiester Rantai DNA	10
4.	Deaminasi Basa Sitosin Menjadi deoxyuracil	
	(C→T)	11
5.	Konsentrasi dsDNA pada Setiap Kelompok	
	Perlakuan	21
6.	Preparat Sampel FFPE Kanker Payudara dengan	
	Pewarnaan <i>Haematoxylin-Eosin</i> (HE)	22
7.	Interaksi antara Jenis Kit yang Digunakan	
	dengan Jumlah Input Sampel FFPE	24
8.	Interaksi antara Jenis Kit dengan Metode	
	Deparafinasi	26
9.	Interaksi antara Jumlah Input Sampel FFPE	
	dengan Metode Deparafinasi	27
10.	Rata-rata Konsentrasi dsDNA Hasil Isolasi Sam-	
	pel FFPE dengan Variasi Waktu Inkubasi 56 °C	29
11.	Interaksi Antara Jenis Kit dan Waktu Inkubasi	30
12.	Integritas Genom DNA Hasil Isolasi Menggu-	
	nakan Kit GR (G) dan Kit QA (Q) dengan	
	Perlakuan Inkubasi Selama 4 Jam pada Suhu 56	
	°C dan Dideparafinasi di Slide Glass	31
13.	Integritas Genom DNA Hasil Isolasi	
	Menggunakan Kit GR (G) dan Kit QA (Q)	
	dengan Perlakuan Inkubasi Selama 16 Jam pada	
	Suhu 56 °C dan Dideparafinasi di Slide Glass	32
14.	Nilai Kuantifikasi Isolat DNA hasil isolasi	
	meggunakan Kit GR dan Kit QA dengan Waktu	
	Inkubasi 4 Jam pada Suhu 56 °C dan	
	Dideparafinasi di Slide Glass	33
15.	Produk qPCR Sampel FFPE Hasil Isolasi	
	Meggu-nakan Kit GR dan Kit QA dengan	
	Perlakuan waktu Inkubasi pada Suhu 56 $^{\circ}\mathrm{C}$	
	Selama 4 Jam dan Dideparafinasi di <i>Slide Glass</i>	35

16.	Amplifiabilitas Isolat DNA FFPE Hasil Isolasi dengan Kit GR (Warna Merah Muda) dan Kit	
	QA (Warna Biru) dengan Perlakuan Waktu	
	Inkubasi pada Suhu 56 °C Selama 4 Jam	
		26
17	Dibandingkan dengan Standar Kit (Warna Hijau)	36
17.		
	FFPE TNBC Menggunakan Kit QA Dengan	
	Perlakuan Inkubasi Selama 4 Jam pada Suhu 56	27
10	°C dan Dideparafinasi di <i>Slide Glass</i>	37
18.	Nilai Kuantifikasi Isolat DNA Hasil Isolasi	
	Menggunakan Kit QA dengan Waktu Inkubasi 4	
	Jam pada Suhu 56 °C dan Deparafinasi di <i>Slide</i>	20
10	Glass	38
19.	Produk qPCR Sampel FFPE Hasil Isolasi	
	Menggunakan Kit QA dengan Waktu Inkubasi 4	
	Jam pada Suhu 56°C dan Dideparafinasi di <i>Slide</i>	20
20	Glass	39
20.	Produk qPCR Sampel Cell Line BT-549 (BT-540 C)	
	549.C) dan FFPE BT-549 (BT-549.F) yang	
	Diisolasi Menggunakan Kit QA dengan Waktu Inkubasi 4 Jam pada Suhu 56 °C dan	
	Dideparafinasi di Slide Glass	40
21.		40
41.	Menggunakan Kit QA (Warna Biru) dengan	
	Perlakuan Waktu Inkubasi pada Suhu 56 °C	
	Selama 4 Jam Dibandingkan dengan Standar Kit	
	(Warna Hijau)	41
22.		71
	(Warna Merah Muda) dan Isolat DNA FFPE BT-	
	549 (Warna Biru) Hasil Isolasi Menggunakan Kit	
	QA Dengan Perlakuan Waktu Inkubasi pada	
	Suhu 56 °C Selama 4 Jam Dibandingkan dengan	
	Standar Kit (Warna Hijau)	42
23.	•	
	Cell Line BT-549 (BT-549.C), Isolat DNA FFPE	
	BT-549 (BT-549.F) dan Isolat DNA FFPE	
	TNBC (1448 Dan 5094)	44

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Н	alaman
1.	Surat Keterangan Penelitian	50
2.	Kuantifikasi DNA	51
3.	Uji Statistik ANOVA untuk Membandingkan	
	Jumlah Input Sampel, Metode Deparafinasi,	
	Waktu Inkubasi, dan Jenis Kit	52



DAFTAR LAMBANG DAN BILANGAN

Simbol / Singkatan	<u>Keterangan</u>
A	Adenine
ACD1	Amplicon Control DNA
ACP1	Control Oligo Pool
ANOVA	Analysis of variance
C	Cytocine
CAT	Custom Amplicon Oligo Tube
Ct	threshold cycle
DI water	De-ionized water
DNA	deoxyribonucleic acid
dsDNA	Double strand deoxyribonucleic
	acid
ELM4	Extension-ligation Mix 4
ER S	Estrogen receptors
FF	Fresh frozen tissue
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-
	Embedded tissue
G	Guanine
gDNA	Genomic deoxyribonucleic acid
HE \	Hematoxylin-eosin
Her-2	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2
IAP	Indexed Amplification Plate
Kit GR	GeneRead DNA FFPE Kit
Kit QA	QIAamp DNA FFPE Kit
NBF	Neutral Buffered Formalin
NGS	Next-Generation Sequencing
OHS2	Oligo Hybridization for
	Sequencing 2
PCR	Polymerase Chain Reaction
pН	derajat keasaman
PMM2	PCR Master Mix 2
PR	Progesterone receptors
QCP	QC primer
QCT	QC Template
qPCR	quantitative Polymerase Chain
	Reaction

RNase A	Ribonuclease A
RT	Room Temperature

RT-PCR Real Time Polymerase Chain

Reaction

SCI Stem Cell and Cancer Institute

SGS Sanger sequencing

SPSS Statistical Package for the Social

Sciences

SW1 Stringent Wash 1

Т **Thymine**

TruSeq DNA Polymerase 1 TDP1 **TNBC** Triple negative breast cancer

U Uracil

Universal Buffer 1 UB₁ Uracil-N-glycosylase **UNG**

quantification cycle (Selisih nilai ΔCq

Ct stamdar dan Ct sampel)

Simbol/Singkatan

Nama unit % persen mikroliter μl micrometer μm $^{\circ}C$ derajat celcius

delta Δ bp base pair gram

kbp kilo base pair mMmili molar nanogram ng

rpm rotasi per menit

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Triple negative breast cancer (TNBC) merupakan subtipe kanker payudara yang paling agresif, yang terhitung antara 10% hingga 20% dari seluruh kanker payudara yang didiagnosis. TNBC juga merupakan jenis kanker payudara yang masih belum diketahui target treatment-nya (Mathe dkk., 2016). Deteksi adanya mutasi somatik pada penelitian kanker biasanya dilakukan dengan membandingkan antara urutan sekuens DNA dari jaringan tumor dan urutan sekuens DNA dari jaringan normal (Wolf dkk., 2016). Variasi genetik tersebut dapat diketahui dengan melakukan sekuensing. Next-Generation Sequencing (NGS) merupakan salah satu teknologi sekuensing modern yang dapat digunakan untuk sekuensing seluruh genom atau pada sejumlah gen yang ditargetkan (Behjati & Tarpey, 2013). Berbeda dengan Sanger sequencing (SGS) yang tidak dapat melakukan paralel sekuensing pada beberapa target gen (Arsenic dkk., 2015). NGS juga merupakan teknologi sekuensing yang lebih sensitif, murah, dan cepat daripada SGS (Behjati & Tarpey, 2013).

Kanker mayoritas terjadi karena adanya akumulasi somatic gene mutation pada jaringan tempat kanker tersebut berkembang (Behjati & Tarpey, 2013). Mengingat sifat kanker yang lokal membuat mutasi somatik harus dilihat dari jaringan tempat kanker tersebut berkembang. Isolat DNA dapat diekstraksi dari sampel Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) ketika DNA tidak dapat diekstraksi dari jaringan segar atau jaringan yang dibekukan. Hal ini dikarenakan baik jaringan segar ataupun jaringan yang dibekukan tidak dapat disimpan terlalu lama (Lin dkk., 2009). Sampel FFPE juga dinilai lebih praktis dibandingkan dengan Fresh frozen tissue (FF) karena proses dan penyimpanan sampel FFPE lebih mudah daripada sampel FF. Protein, DNA, dan RNA dapat disimpan dalam jangka waktu yang lebih lama pada sampel FFPE dibandingkan dengan sampel FF (Choi dkk., 2017).

Penggunaan sampel FFPE untuk analisis kelainan genetik pada kanker menggunakan NGS diharapkan dapat menunjang diagnosis kanker dari patologis hingga genetisnya. Kendalanya yaitu kondisi isolat DNA FFPE yang didapat sering kali telah terfragmentasi (Nagahashi dkk., 2017) yang menyebabkan rendahnya jumlah *template* DNA yang dapat diamplifikasi (Sikorsky dkk., 2007). Kuantitas dan kualitas asam

nukleat dari sampel FFPE dipengaruhi oleh jenis larutan fiksatif yang digunakan, durasi fiksasi dan kondisi penyimpanan blok FFPE (Nam dkk., 2014). Penggunaan formalin sebagai fiksatif jaringan berpengaruh pada kualitas DNA. Fiksasi yang terlalu sebentar dapat memicu kerusakan asam nukleat dan protein pada bagian dalam jaringan yang tidak terformalin. Fiksasi yang terlalu lama akan mengakibatkan *crosslinking* DNA dan protein sehingga proses isolasi akan menjadi semakin sulit (Arreaza dkk., 2016). Penggunaan formalin sebagai larutan fiksatif juga berdampak pada kerusakan DNA seperti (1) *cross-linking* antara DNA dan komponen seluler lain seperti protein (Nagahashi dkk., 2017), (2) deaminasi sitosin yang mengakibatkan perubahan basa C>T (Wolf dkk., 2016), (3) Fragmentasi DNA (Lin dkk., 2014) dan (4) *abasic site* yang mengganggu analisis sekuens (Do & Dobrovic, 2015).

Berbagai studi telah dilakukan untuk mendapatkan protokol standar isolasi DNA FFPE. Sengüven dkk. (2014) dalam penelitiannya telah membandingkan cara deparafinasi sampel FFPE dan durasi waktu inkubasi sampel dalam Proteinase-K pada 55°C. Hasil penelitian Ludyga dkk. (2012) membuktikan bila durasi waktu penyimpanan blok FFPE juga mempengaruhi kualitas dan kuantitas isolat DNA yang ada. Heydt dkk. (2014) telah membandingkan dan mengevaluasi lima kit komersil sampel FFPE untuk isolasi DNA dari dan amplifiabilitasnya menggunakan multiplex PCR. Hal tersebut menunjukkan bila banyak sekali faktor yang mempengaruhi keberhasilan isolasi DNA dari sampel FFPE.

komersil juga telah Beberapa kit dikembangkan untuk mendapatkan isolat DNA FFPE dengan amplifiabilitas tinggi. Janecka dkk. (2015) dalam penelitiannya membandingkan delapan kit komersil untuk isolasi DNA FFPE dan setiap kit memiliki perbedaan yang signifikan dalam hal kuantitas, kemurnian, dan kualitas DNA. QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) dan ReliaPrep FFPE gDNA Miniprep System (Promega) menghasilkan DNA dengan kemurnian konsentrasi yang tinggi. Namun, kedua Kit ini memiliki nilai Ct/dCt yang rendah yang berarti amplifiabilitas template DNA yang dihasilkan rendah. Penelitian tersebut menunjukkan bila tidak ada hubungan antara kuantitas DNA dengan amplifiabilitas DNA.

Artifact seringkali didapati pada DNA FFPE yang merupakan produk dari deaminasi sitosin akibat adanya formalin. Artifact ini akan mempersulit pembacaan sekuens yang asli mutasi DNA atau mutasi artifisial akibat adanya formalin (Do & Dobrovic, 2015). Qiagen mengembangkan GeneRead DNA FFPE Kit dengan kelebihan dapat

Optimalisasi metode isolasi DNA FFPE telah banyak dilakukan, menunjukkan keberhasilan dan beberapa penelitian sekuensing DNA FFPE. Hasil penelitian Hedegaard dkk. (2014) menunjukkan 70,5% kegagalan library preparation DNA FFPE untuk NGS. Einaga dkk. (2017) menyatakan bila sampel DNA FFPE dapat digunakan untuk analisis menggunakan NGS apabila proses fiksasi sampel dilakukan sesuai standar. Isolasi DNA dari sampel FFPE tentu akan sulit dilakukan apabila proses pembuatan blok FFPE tidak terstandar, hal inilah yang sering terjadi di Indonesia (A. R. H. Utomo, personal communication, February 26, 2018). Penelitian ini dilakukan untuk membandingkan kualitas dan kuantitas isolat DNA yang diisolasi dengan metode yang berbeda dari metode standar kit yang digunakan untuk isolasi sampel FFPE. Penelitian ini juga dilakukan untuk mendapatkan metode isolasi yang optimal dengan jumlah input seminimal mungkin, waktu pengerjaan yang singkat dan kit yang ekonomis untuk mendapatkan isolat DNA FFPE yang sesuai dengan standar peruntukan NGS dari arsip sampel FFPE.

1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan yang diangkat pada penelitian ini ditujukan untuk mendapatkan isolat DNA FFPE yang sesuai dengan standar peruntukan NGS dengan kit komersil yang ekonomis dan mudah digunakan. Sampel FFPE diisolasi menggunakan dua macam Kit yaitu *GeneRead DNA FFPE Kit* (Kit GR) dan *QIAamp DNA FFPE Kit* (Kit QA). Rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- 1. Berapa jumlah input sampel FFPE yang optimal untuk mendapatkan isolat DNA FFPE?
- 2. Bagaimana cara deparafinasi yang optimal untuk mendapatkan isolat DNA FFPE?
- 3. Berapa waktu inkubasi sampel FFPE dalam Proteinase-K pada suhu 56 °C yang optimal untuk mendapatkan isolat DNA FFPE?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan utama penelitian ini untuk mendapatkan isolat DNA FFPE yang sesuai dengan standar peruntukan NGS dengan kit komersil yang ekonomis dan mudah digunakan. Sampel FFPE diisolasi menggunakan dua macam Kit yaitu GeneRead DNA FFPE Kit (Kit GR) dan QIAamp DNA FFPE Kit (Kit QA). Tujuan dari penelitian ini yaitu sebagai berikut:

- 1. Menentukan jumlah input sampel FFPE yang optimal untuk mendapatkan isolat DNA FFPE.
- 2. Mendapatkan cara deparafinasi yang optimal untuk mendapatkan isolat DNA FFPE.
- 3. Menentukan waktu inkubasi sampel FFPE dalam Proteinase-K pada suhu 56 °C yang optimal untuk mendapatkan isolat DNA FFPE.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai Kit digunakan untuk isolasi DNA dari sampel FFPE. Metode yang digunakan dalam penelitian ini juga dapat dijadikan referensi untuk mengisolasi DNA dari sampel FFPE.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE)

Sampel Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) merupakan arsip diagnostik patologi yang sangat penting untuk penelitian (Arreaza, 2016). Sampel FFPE merupakan spesimen yang diawetkan dengan bahan parafin (Nagahashi dkk., 2017). Salah satu manfaat penggunaan sampel FFPE untuk analisis genomik molekuler penyakit kanker yaitu informasi yang didapat lebih detail hingga kondisi patologisnya. Arsip sampel FFPE dengan beragam tipe kanker dari tahun yang berbeda-beda juga memberikan kemungkinan yang besar untuk mengkaji pola perkembangan penyakit kanker (evolusi kanker). NGS menjadi salah satu perangkat yang sangat potensial untuk penelitian genomik dari DNA FFPE. Kendalanya adalah kualitas DNA FFPE yang rendah dan telah terfragmentasi, sehingga masih perlu diadakan optimalisasi metode isolasi dan pembuatan blok FFPE perlu dilakukan (Einaga dkk., 2017).

Selain sampel FFPE, sampel Fresh Frozen (FF) tissue dianggap sebagai sampel yang ideal untuk analisis ekspresi gen. Sampel FF merupakan sampel jaringan segar yang diawetkan dalam nitrogen cair (Ripoli dkk., 2016). Sampel FFPE memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan sampel FF. Sampel FFPE mampu menyimpan protein, DNA, dan RNA lebih baik dalam waktu yang lama dari pada sampel FF. Proses penyimpanan sampel FFPE lebih mudah dan murah dibandingkan dengan penyimpanan sampel FF (Choi dkk., 2017). Penelitian Einaga dkk. (2017) telah membuktikan bila sampel FFPE juga memiliki kapabilitas yang sama dengan FF untuk analisis mikrogenomik menggunakan NGS, di balik beberapa kekurangan yang didapati pada penggunaan sampel FFPE. Hasil penelitian Choi dkk. (2017) juga menyatakan bila tidak ada perbedaan yang signifikan antara kualitas RNA yang diisolasi dari sampel FFPE dan FF. Data-data tersebut menunjukkan bila sampel FFPE layak diperhitungkan dan dioptimalkan fungsinya untuk analisis molekuler.

2.2 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Kualitas Isolat DNA FFPE

Kualitas DNA FFPE dipengaruhi oleh beberapa hal seperti jenis fiksatif, durasi fiksasi, durasi jaringan mengalami hipoksia, permeabilitas fiksatif dan, lama waktu penyimpanan blok FFPE (Govender & Naidoo, 2016). Pembuatan sampel FFPE mengharuskan

jaringan difiksasi dengan tujuan utama untuk mempertahankan struktur seluler dari jaringan. Fiksasi dapat menghambat terjadinya autolisis pada jaringan yang terjadi karena adanya aktivitas biokimia dan proses proteolisis (Yeung dkk., 2015). Pembuatan blok parafin atau blok FFPE pada dasarnya dilakukan dengan beberapa proses yaitu fiksasi, dehidrasi, *clearing*, dan *embedding* (Nagahashi dkk., 2017). Proses fiksasi dalam pembuatan blok FFPE sangat mempengaruhi kualitas asam nukleat, hingga saat ini masih dilakukan eksplorasi proses fiksasi yang tidak hanya baik untuk pengamatan patologis tetapi juga untuk analisis molekulernya.

Formalin merupakan salah satu jenis fiksatif yang seringkali digunakan untuk preservasi jaringan. Durasi fiksasi sangat krusial terkait kemampuannya untuk preservasi jaringan. Durasi fiksasi yang terlalu singkat membuat penetrasi larutan fiksatif belum maksimal sehingga makromolekul dalam jaringan tidak terpreservasi secara baik (Yeung dkk., 2015). Durasi fiksasi yang terlalu lama akan mengakibatkan *cross-linking* yang parah sehingga proses isolasi akan menjadi semakin sulit (Arreaza dkk., 2016). Yeung dkk. (2015) merekomendasi untuk fiksasi selama 16 jam dalam lemari pendingin, dengan tujuan untuk pengamatan patologi menggunakan mikroskop cahaya. Nagahashi dkk. (2017) dalam penelitiannya, jaringan difiksasi menggunakan 10% *Neutral Buffered Formalin* (NBF) selama 24 jam untuk meminimalisir *cross-linking* yang parah karena fiksasi yang terlalu lama.

Kualitas isolat DNA dari sampel FFPE yang difiksasi menggunakan formalin menurun seiring dengan peningkatan durasi fiksasinya. Fiksasi yang dilakukan lebih dari 1 hari membuat fragmentasi DNA semakin parah walaupun kuantitas isolat DNA yang didapatkan tidak berbeda dengan sampel yang difiksasi lebih dari 1 hari (Einaga dkk, 2017). Fragmentasi DNA dapat diminimalisir dengan perendaman dalam etanol 4°C setelah difiksasi dengan formalin selama satu hari (Nam dkk., 2014). Selain durasi fiksasi, durasi penyimpanan blok FFPE juga dapat mempengaruhi kualitas isolat DNA. Penelitian Ludyga dkk. (2012) menyatakan bahwa semakin lama durasi penyimpanan maka DNA semakin terfragmentasi. Tang dkk. (2009) menjelaskan bila kondisi tersebut terjadi karena sampel terlalu lama di udara bebas sehingga terjadi reaksi oksidasi. Hal ini menjadi alasan untuk tidak menggunakan potongan pertama dan kedua sampel FFPE yang akan diisolasi DNA-nya. Fragmen DNA yang didapat dari sampel FFPE biasanya kurang lebih berkisar antara 100 bp hingga 3 kbp. Hasil

penelitian Ludyga dkk. (2012) yang mengisolasi sampel FFPE jaringan kanker payudara yang disimpan dari tahun 1986 menunjukkan fragmen yang dapat diamplifikasi menggunakan PCR berkisar antara 100 bp hingga 300 bp. Selain durasi penyimpanan blok FFPE, fragmentasi juga dapat dikarenakan adanya penurunan pH selama penyimpanan dan juga pembuatan blok yang kurang baik.

Parameter baik dan buruknya hasil ekstraksi DNA dari sampel FFPE salah satunya juga dipengaruhi oleh metode isolasi yang digunakan (Janecka dkk., 2015). Waktu inkubasi dalam buffer lisis dan proses deparafinasi merupakan tahapan yang mempengaruhi kualitas dan kuantitas isolat DNA (Sengüven dkk., 2014). Cross-linking yang disebabkan oleh penggunaan formalin dapat dipisahkan dengan perlakuan suhu, sehingga suhu dan pH dari buffer lisis yang digunakan sangat mempengaruhi (Do & Dobrovic, 2015). Durasi inkubasi sampel FFPE dalam buffer lisis juga mempengaruhi kuantitas isolat DNA yang dihasilkan. Konsentrasi DNA semakin meningkat ketika durasi waktu inkubasi semakin lama. Proses deparafinasi yang dilakukan di slide glass lebih direkomendasikan karena lebih mudah dan efisien (Sengüven dkk., 2014).

Ekstraksi DNA dari sampel FPPE tissue dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai macam kit komersil. Setiap kit memiliki proses dan reagen yang berbeda-beda yang juga berpengaruh pada hasil ekstraksi DNA. Penelitian Janecka dkk. (2015) membandingkan 8 kit komersil untuk ekstraksi DNA dari sampel FFPE. Hasil penelitian menunjukkan QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) dan ReliaPrep FFPE gDNA Miniprep System (Promega) menghasilkan kualitas DNA yang tinggi dan kuantitas yang dapat diterima. QIAamp DNA FFPE Tissue Kit dapat digunakan untuk isolasi DNA dari FFPE yang disimpan lama bahkan sebelum tahun 1820. Hasil penelitiannya juga menunjukkan bila setiap kit memiliki waktu inkubasi optimal yang berbeda-beda. Secara umum, direkomendasikan waktu inkubasi 16 jam menggunakan column-based kit untuk meningkatkan konsentrasi DNA. Namun, dalam penggunaan QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) waktu inkubasi yang optimal untuk mendapatkan isolat DNA yang baik yaitu selama 3 jam waktu inkubasi. Elusi ganda juga direkomendasikan untuk mendapatkan jumlah DNA yang lebih tinggi. Hal tersebut dikarenakan lebih dari 42% DNA masih terikat pada membran / magnetic bead surface setelah elusi pertama.

Beberapa protokol yang menggunakan kit juga memiliki jumlah irisan dan ketebalan irisan sampel FFPE yang berbeda-beda. Janecka

repository.ub.ac

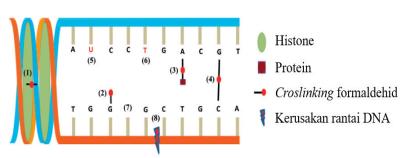
dkk. (2015) menggunakan ketebalan irisan 5μm sebanyak dua irisan. Bonin dkk. (2010) juga menggunakan ketebalan irisan 5μm sebanyak dua hingga empat irisan. Standar preparasi sampel yang digunakan Qiagen (2012) yaitu 8 irisan dengan ketebalan 10 μm. Norgen Biotek Corp. (2014) menggunakan 5 irisan dengan ketebalan 20μm. Weiss dkk. (2011) menggunakan 20 hingga 40 irisan dengan ketebalan 2 μm. Hal tersebut menunjukkan bila jumlah input sampel juga mempengaruhi kuantitas dan kualitas isolat DNA. Banyak sedikitnya sayatan sampel yang digunakan tergantung dari kualitas sampel dan kemampuan kit yang digunakan (Tang dkk., 2009).

2.3 Dampak Fiksasi Jaringan Terhadap Kualitas Asam Nukleat

Eksplorasi agen fiksatif telah banyak dilakukan, tetapi tidak ada senyawa fiksatif yang dapat mengawetkan seluruh komponen seluler dari suatu jaringan dengan sempurna (Yeung dkk., 2015). Selain formalin beberapa senyawa fiksatif yang digunakan untuk preservasi jaringan yaitu gluteraldehyde, genipin, etanol dan metanol, carnoy's, methacam dan acetone (Srinivasan dkk., 2002). Agen fiksatif lain yang sering digunakan untuk pengamatan mikroskopi yaitu osmium tetroxide dan farmer's (Yeung dkk., 2015).

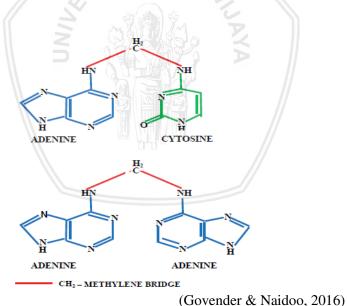
Di balik kekurangan dan kelebihannya, 10% neutral buffered formalin (NBF) seringkali digunakan untuk mengawetkan jaringan karena kemampuannya yang dapat mengawetkan hampir seluruh komponen jaringan (Srinivasan dkk., 2002). Nagahashi dkk. (2017) dalam penelitiannya membandingkan isolat DNA dari sampel FFPE yang difiksasi dengan 10% NBF dan un-bufferd formalin. Kualitas DNA dari sampel FFPE yang difiksasi menggunakan NBF hasilnya lebih baik daripada isolat DNA dari sampel FFPE yang difiksasi menggunakan un-bufferd formalin.

Formaldehid merupakan komponen utama formalin yang menginduksi *cross-linking* antara protein-protein, DNA-protein dan DNA-formaldehid yang berdampak pada kerusakan DNA (Gambar 1) (Do & Dobrovic, 2015). Reaksi antara asam amino dan formalin (DNA-formaldehid) akan membentuk *Methylene bridge formation* yang memicu terjadinya *cross-linking* antara dua kelompok basa asam amino (Gambar 2). *Cross-linking* akan membuat proses ekstraksi DNA menjadi semakin sulit (Govender & Naidoo, 2016). Kondisi *cross-linking* ini juga berpengaruh buruk terhadap kuantitas dan kualitas DNA *template* untuk diamplifikasi (Do & Dobrovic, 2015).



(Do & Dobrovic, 2015)

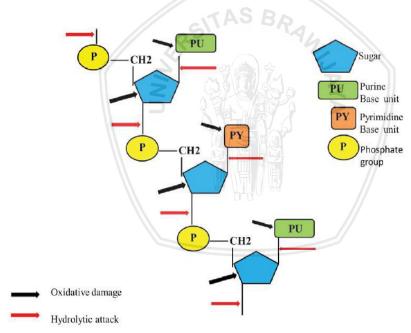
Gambar 1. Kerusakan DNA yang terjadi pada sampel FFPE. (1) cross-linking DNA-protein histone, (2) cross-linking DNA-formaldehid (3) cross-linking DNA-protein, (4) cross-linking DNA-DNA, (5) urasil (6) timin yang merupakan hasil dari adanya deaminasi sitosin, (7) abasic site (hilangnya basa purin dan pirimidin), (8) rusaknya rantai DNA yang menyebabkan fragmentasi DNA



Gambar 2. Methylene bridge formation

repository.up.ad

Ikatan antara DNA-formaldehid-DNA akan menyebabkan ikatan hidrogen antar basa melemah karena jumlah ikatan hidrogen antar basa asam amino berkurang (Do & Dobrovic, 2015). Reaksi oksidasi dan hidrolisis yang disebabkan oleh formalin juga dapat menyebabkan pemendekan rantai *polydeoxyribose* (Gambar 3) (Govender & Naidoo, 2016). *Cross-linking* antara basa DNA dengan protein histone disekitarnya juga dapat mengakibatkan kerusakan DNA. Proses fiksasi juga mengakibatkan adanya deaminasi. Deaminasi yang sering terjadi yaitu deaminasi basa sitosin menjadi *deoxyuracil* (Arreaza dkk., 2016). Selama proses sekuensing basa sitosin akan terbaca sebagai basa timin (C→T) (Gambar 4), transisi antara basa guanin menjadi adenin juga dapat terjadi (G→A). Deaminasi basa sitosin pada DNA dapat diatasi dengan penambahan enzim *uracil-N-glycosylase* (UNG) (Wolf dkk., 2016).



(Govender & Naidoo, 2016)

Gambar 3. Hidrolisis ikatan fosfodiester rantai DNA

Gambar 4. Deaminasi basa sitosin menjadi deoxyuracil ($C \rightarrow T$)

Formaldehid akan teroksidasi menjadi asam format ketika bereaksi dengan oksigen. Formasi ini akan menurunkan pH formalin. Pada pH rendah hidrolisis akan terjadi pada ikatan *N-glycosidic* dan deoksiribosa (Do & Dobrovic, 2015). Hidrolisis yang terjadi pada ikatan *N-glycosidic* mengakibatkan hilangnya basa purin dan pirimidin pada rantai DNA (Govender & Naidoo, 2016). Residu aldehid dari *abasic site* dapat menghasilkan *cross-linking* antar rantai dengan cara bereaksi dengan gugus amino eksosiklik dari basa guanin. Maka *cross-linking* yang disebabkan oleh formalin akan menyebabkan ikatan rantai ganda DNA tidak stabil dan menghasilkan DNA yang terdegradasi (Do & Dobrovic, 2015).

2.4 Perbandingan antara GeneRead DNA FFPE Kit dan QIAamp DNA FFPE Kit

GeneRead DNA FFPE Kit (Kit GR) dan QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Kit QA) berasal dari satu perusahaan yang sama yaitu Qiagen. Pada prinsipnya kedua kit tersebut memiliki prinsip kerja yang hampir sama. Kit QA menggunakan reagen yang lebih sedikit dibandingkan dengan Kit GR (Tabel 1). Perbedaan mendasar dari reagen tersebut yaitu penggunaan adanya *Uracil-N-glycosylase* (UNG) pada Kit GR. Deparafinasi sampel Kit QA menggunakan *xylene* sedangkan Kit GR menggunakan *Deparaffinization Solution* yang tidak disebutkan komposisinya (Qiagen, 2014a).

UNG merupakan enzim yang berfungsi untuk menghilangkan *artifact* atau deaminasi basa sitosin (C→T) pada DNA. Aktivitas enzim glikosilase pada UNG akan mengeliminasi basa urasil dari *strand* DNA sehingga terbentuk *abasic site*. *Abasic site* ini tidak akan teramplifikasi oleh enzim polimerase saat proses PCR berlangsung. (Chen dkk., 2014). Penambahan UNG dapat mengurasi residu frekuensi varian transisi basa

repository.ub.a

C>T dan G>A. Artifisial mutasi DNA FFPE yaitu KRAS G>A sebelum menggunakan UNG frekuensinya sebesar 21% turun menjadi 0,7% setelah ditambahkan UNG (Einaga dkk., 2017). Enzim UNG ini yang tidak ditemukan di Kit QA.

Penggunaan Kit GR memakan waktu 1 jam lebih lama dari pada kit QA karena ada proses tambahan yaitu lisis menggunakan UNG. Hal lain yang membedakan yaitu Kit GR lebih mahal dari pada Kit QA. Harga Kit GR untuk 50 reaksi sebesar 312 USD atau setara dengan Rp. 4.517.760 per Juli 2018. Harga Kit QA untuk 50 reaksi sebesar 242 USD atau setara dengan Rp. 3.504.160 per Juli 2018 (Qiagen, 2018). Selama ini belum ada penelitian yang membandingkan secara langsung performa Kit GR dan QA. Janecka dkk. (2015) dalam penelitiannya menyatakan bila QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) dapat digunakan untuk isolasi DNA dari FFPE yang disimpan lama bahkan sebelum tahun 1820.

Tabel 1. Reagen yang digunakan dalam setiap tahap isolasi DNA FFPE menggunakan kit yang berbeda dari Qiagen

Tahapan Isolasi DNA	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	GeneRead DNA FFPE Kit	Waktu inkubasi
Deparafinasi	Xylene	Deparaffinization Solution	
	Etanol (96 – 100%)		
Proses lisis	Buffer ATL	RNase-free water -	Inkubasi pada 56°C selama 1 jam
	Proteinase-K	Buffer FTB -	- Inkubasi pada
		Proteinase-K	90°C selama 1 jam
Digest artifact		RNase-free water	Inkubasi pada
			50°C selama 1 jam
		Uracil-N-glycosylase	
RNA-free		RNase A	
genomic DNA	D 00 11	D 00 A T	
Bind DNA	Buffer AL	Buffer AL	
process	Etanol (96-	Ethanol (96–100%)	
	100%)		
Wash process	Buffer AW1	Buffer AW1	
	Buffer AW2	Buffer AW2	
		Etanol (96–100%)	
Elute process	Buffer ATE	Buffer ATE	

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan selama enam bulan (Februari – Juli 2018). Penelitian dilakukan di Laboratorium *Stem Cell and Cancer Institute* (SCI), Kalbe Farma Tbk. Laboratorium bertempat di Jakarta Timur, DKI Jakarta, Indonesia.

3.2 Deskripsi Sampel FFPE dan Kelompok Perlakuan

Penelitian ini menggunakan sampel jaringan kanker payudara yang telah diawetkan dalam blok parafin atau disebut juga dengan formalinfixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue. Sampel berasal dari arsip pasien kanker payudara Rumah Sakit Dharma Nugraha dan telah disetujui oleh komite etik SCI. Sampel yang didapatkan juga dilengkapi dengan data personal klinis pasien. Jumlah sampel yang digunakan sebanyak tujuh belas sampel FFPE yang didapat dari Laboratorium Kalbe Genomic. Sebanyak lima sampel FFPE dari jaringan kanker payudara non-TNBC digunakan untuk optimasi metode isolasi DNA. Dua belas sampel FFPE dari jaringan kanker payudara triple negative (TNBC) digunakan untuk validasi. Pada penelitian ini juga digunakan sampel cell line BT-549 (TNBC cell line) yang telah diisolasi dan sampel FFPE BT-549 sebagai pembanding yang dibuat langsung oleh Laboratorium Kalbe Genomic. Variasi jumlah input sampel yang digunakan yaitu 3 x 10 µm dan 6 x 10 µm dengan kelompok perlakuan seperti tabel berikut (Tabel 2).

3.3 Deparafinasi Sampel FFPE

3.3.1 Deparafinasi di microtube

Proses deparafinasi dalam tube menggunakan QIAamp DNA FFPE kit (Kit QA) diawali dengan memasukkan sampel ke dalam 1.5 ml *microsentrifuge tube* yang telah berisi 1 ml *xylene*, sampel kemudian divortex selama 10 detik dan disentrifugasi selama 2 menit, 14.000 rpm pada *room temperature* (15 - 25 °C). Pelet ditambahkan 1ml etanol *absolute* lalu divortex dan disentrifugasi kembali selama 2 menit, 14.000 rpm pada *room temperature* (RT). Pelet yang didapat diinkubasi pada suhu ruang atau 37 °C selama kurang lebih 10 menit hingga residu

etanol habis terevaporasi. Pelet yang didapat dilanjutkan ke tahap lisis sesuai dengan protokol penggunaan kit.

Proses deparafinasi menggunakan GeneRead DNA FFPE Kit (Kit GR) dilakukan dengan memasukkan sampel kedalam 1.5 ml *microsentrifuge tube* yang telah berisi 160 µl *Deparaffinization solution* dan divortex selama 10 detik. Sampel diinkubasi pada 56 °C selama 3 menit kemudian didinginkan. Sampel yang didapat dilanjutkan ke tahap lisis sesuai dengan protokol penggunaan kit, pelet dan supernatan tidak perlu dipisahkan.

Tabel 2. Kelompok perlakuan

	ruser 2. Reformpok perfukuum
Kode	Perlakuan
G3M	Kit GR + 3 x 10 μm + Deparafinasi di <i>microtube</i>
G3S	Kit GR + 3 x 10 μm + Deparafinasi di slide glass
G6M	Kit GR + 6 x 10 μm + Deparafinasi di <i>microtube</i>
G6S	Kit GR + 6 x 10 μm + Deparafinasi di slide glass
Q3M	Kit QA + 3 x 10 μm + Deparafinasi di <i>microtube</i>
Q3S	Kit QA + 3 x 10 μm + Deparafinasi di <i>slide glass</i>
Q6M	Kit QA + 6 x 10 μm + Deparafinasi di <i>microtube</i>
Q6S	Kit QA + 6 x 10 μm + Deparafinasi di slide glass
G6S.t1	Kit GR + 6 x 10 μm + Deparafinasi di <i>slide glass</i> + waktu inkubasi 1 jam dalam Proteinase-K suhu 56°C
G6S.t4	Kit GR + 6 x 10 μm + Deparafinasi di <i>slide glass</i> + waktu inkubasi 4 jam dalam Proteinase-K suhu 56°C
G6S.t16	Kit GR + 6 x 10 μm + Deparafinasi di <i>slide glass</i> + waktu inkubasi 16 jam dalam Proteinase-K suhu 56°C
Q6S.t1	Kit QA + 6 x 10 μm + Deparafinasi di <i>slide glass</i> + waktu inkubasi 1 jam dalam Proteinase-K suhu 56°C
Q6S.t4	Kit QA + 6 x 10 μm + Deparafinasi di <i>slide glass</i> + waktu inkubasi 4 jam dalam Proteinase-K suhu 56°C
Q6S.t16	Kit QA + 6 x 10 μm + Deparafinasi di <i>slide glass</i> + waktu inkubasi 16 jam dalam Proteinase-K suhu 56°C

3.3.2 Deparafinasi di slide glass

Sampel juga dideparafinasi menggunakan metode deparafinasi yang telah dioptimasi oleh Laboratorium Kalbe Genomik. Sampel yang telah dipotong dengan ketebalan 10 µm ditempatkan di *slide glass* kemudian dipanaskan pada suhu 80°C selama 10 menit. Sampel kemudian direndam dalam *xylene* selama dua kali lima menit. Sampel kemudian dipindahkan ke etanol absolut, etanol 96% dan etanol 70% masing-masing selama 5 menit. Sampel dicelupkan dalam air bersih

sebanyak 10 kali celupan kemudian direndam dalam Tris-HCl selama 5 menit. Sampel kemudian dilanjutkan sesuai dengan protokol standar penggunaan masing – masing kit.

3.4 Isolasi DNA Menggunakan QIAamp DNA FFPE Kit

Lisis sampel yang telah dideparafinasi dilakukan dengan menambahkan pelet dengan 180 µl *buffer* ATL dan 20 µl Proteinase-K kemudian divortex dan di-*spin down*. Sampel selanjutnya diinkubasi pada suhu 56 °C dengan variasi waktu inkubasi yaitu 1 jam, 2 jam, 4 jam, dan *overnight* (16 jam). Sampel kemudian diinkubasi kembali pada suhu 90 °C selama 1 jam. Sampel yang telah diinkubasi selanjutnya di-*spin down*. Sampel ditambahkan 200 µl *buffer* AL dan 200 µl *ethanol Absolute* lalu divortex dan di-*spin down* kembali.

Lisat yang didapat dipindahkan ke *QIAamp MinElute column* dalam 2 ml *collection tube*. Sampel disentrifugasi pada 8000 rpm selama 1 menit. *Collection tube* selalu diganti sebelum melakukan proses selanjutnya. Sampel ditambahkan 500 µl *buffer* AW1 dan disentrifugasi kembali pada 8000 rpm selama 1 menit. Proses diulangi kembali dengan menggunakan 500 µl *buffer* AW2. Sampel disentrifugasi kembali pada 14.000 rpm, RT, selama 3 menit. *QIAamp MinElute column* dipindahkan dalam 1,5 ml *microcentrifuge tube* kemudian ditambahkan 35 µl *buffer* ATE. Sampel diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit kemudian disentrifugasi pada 14.000 rpm, RT, selama 1 menit. DNA atau pelet disimpan dalam *buffer* ATE pada suhu -20°C hingga digunakan. Isolat DNA sebanyak 5 µl dielektroforesis menggunakan 1% gel agarosa pada 96 *volt* selama 60 menit.

3.5 Isolasi DNA Menggunakan GeneRead DNA FFPE Kit

Sampel yang telah dideparafinasi ditambahkan 55 μl RNase A *free water*, 25 μl *buffer* FTB, dan 20 μl Proteinase-K, campuran selanjutnya divortex. Sampel diinkubasi pada suhu 56 °C dengan variasi waktu inkubasi yaitu 1 jam, 2 jam, 4 jam, dan *overnight* (16 jam). Sampel kemudian diinkubasi kembali pada suhu 90 °C selama 1 jam. Sampel yang telah diinkubasi selanjutnya di-*spin down*. Pelet yang didapat kemudian ditambahkan 115 μl RNase A *free water* kemudian dihomogenkan. Sampel ditambahkan 35 μl UNG kemudian divortex dan di inkubasi pada 50°C selama 1 jam kemudian di-*spin down*. Pelet ditambahkan 2 μl RNase A *free water*, campuran selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 2 menit. Sampel ditambahkan 250 μl *buffer* AL

dan 250 µl etanol absolut, campuran divortex lalu kemudian di-spin down.

Sebanyak 700 µl lisat dipindahkan ke QIAamp MinElute column dalam 2 ml collection tube kemudian disentrifugasi pada 14.000 rpm, RT, selama 1 menit. Collection tube selalu dikosongkan sebelum melakukan proses selanjutnya. Sampel ditambahkan 500 µl buffer AW1 kemudian disentrifugasi 14.000 rpm, RT, selama 1 menit. Proses diulangi kembali dengan 500 µl buffer AW2 kemudian diulangi kembali dengan menambahkan 250 µl etanol absolut. Collection tube diganti kemudian dilakukan proses dry spin dengan cara disentrifugasi kembali pada 14.000 rpm, RT, selama 1 menit. QIAamp MinElute column dipindahkan dalam 1,5 ml microcentrifuge tube kemudian ditambahkan dengan 35 ul buffer ATE. Sampel diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Sampel disentrifugasi kembali pada 14.000 rpm, RT, selama 1 menit. DNA atau pelet yang didapat disimpan dalam buffer ATE pada suhu -20°C hingga digunakan. Isolat DNA sebanyak 5 dielektroforesis menggunakan 1% gel agarosa pada 96 volt selama 60 menit.

3.6 Kuantifikasi DNA

Kuantifikasi isolat DNA menggunakan Qubit 3 Fluorometer digunakan untuk mengetahui konsentrasi duoble-strand DNA (dsDNA) dalam isolat DNA yang didapat. Qubit terlebih dahulu dikalibrasi menggunakan standart solution. Larutan standar dibuat dengan mencampurkan 10 μl standard reagent ke dalam 190 μl Qubit working solution yang telah disiapkan dalam Qubit assay tube, kemudian diinkubasi selama 2 menit. Qubit working solution dibuat dengan mencampur 1 μl Qubit reagent ke dalam 199 μl Qubit buffer. Preparasi sampel dilakukan dengan menambahkan 2 μl sampel ke dalam Qubit assay tube yang berisi 198 μl Qubit working solution, kemudian diinkubasi selama 2 menit. Qubit assay tube dimasukkan ke dalam Qubit Fluorometer yang telah diatur untuk DNA assay high sensitivity. Konsentrasi input sampel disesuaikan dengan konsentrasi sampel yang dimasukkan yaitu 2 μl.

3.7 Pengujian Integritas DNA

DNA yang diisolasi menggunakan kit GR dan kit QA diukur kualitas fragmen DNA-nya sebelum memasuki tahap sekuensing menggunakan NGS. Integritas DNA diukur dengan *quantitative*

Polymerase Chain Reaction (qPCR) menggunakan dsDNA binding dyes (QuantiNova SYBR Green PCR Kit dan QuantiFast SYBR Green PCR Kit). Prinsip kerjanya yaitu produk PCR akan diukur pada setiap siklusnya (pada fase ekstensi) menggunakan fluorescent dyes, yang mana hasilnya akan ditampilkan pada amplification plot. Amplification plot akan menunjukkan grafik antara relative fluorescence pada sumbu y dan cycle number pada sumbu x. Analisis hasil dari qPCR dilihat dari nilai threshold cycle (Ct). Nilai Ct merupakan nilai yang didapat dari simpangan atau intersection antara threshold line dan kurva amplifikasi. Quantification value dapat dilihat dari nilai Δ Cq (quantification cycle) yang mana Δ Cq merupakan selisih dari nilai Ct gen target dan nilai Ct reference gene. Sampel dengan nilai Δ Cq \leq 2 dapat digunakan untuk proses library preparation untuk NGS.

Kit yang digunakan untuk qPCR pada penelitian ini adalah Illumina FFPE QC kit dan qPCR Master Mix yang digunakan yaitu QuantiNova SYBR Green PCR Kit dan QuantiFast SYBR Green PCR Kit. Campuran qPCR premix per reaksi dibuat dengan mencampurkan 10µ1 2x QuantiNova / QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix, 2 µ1 QC primer (QCP) dan 4 µl DI water. Sebanyak 16 µl qPCR premix dipindahkan ke dalam PCR tube. Pengujian pada setiap sampel dan standar dilakukan rangkap tiga. Sebanyak 4 ul OC Template (OCT), 4 ul DI water untuk NTC (No template control) dan 4 µl gDNA FFPE (1 ng/ μl), masing-masing dimasukkan ke dalam PCR tube yang telah berisi qPCR pre-mix sehingga volume total setiap tube menjadi 20 μl. Campuran dihomogenkan menggunakan pipet kemudian di-spin down. PCR tube dimasukkan kedalam mesin amplifikasi Rotor-Gene Q (Qiagen, Germany). Mesin qPCR diatur pada suhu 95°C selama 2 menit sebagai suhu pra-denaturasi. Siklus berjalan selama 40 kali yang meliputi denaturasi (95°C selama 5 detik) dan annealing (65°C selama 10 detik). Produk PCR sebanyak 5 µl dielektroforesis menggunakan 2,5 % gel agarosa pada 110 volt selama 45 menit.

3.8 Library Preparation

Tahap awal sekuensing menggunakan *Next-Generation Sequencing* (NGS) adalah *library preparation*. Target NGS pada penelitian ini adalah gen BRCA1 dan BRCA2. Probe yang digunakan pada penelitian ini yaitu *AFP2 custom amplicon design*, probe tersebut didesain untuk mendapatkan DNA dengan panjang fragmen 250bp (~350 bp). Proses *Library preparation* terdiri dari beberapa tahap yaitu:

a. Hybridize Oligo Pool

Proses *Hybridize Oligo Pool* berfungsi untuk menentukan target DNA dengan cara penambahan probe atau amplikon. Probe yang digunakan pada penelitian ini yaitu *AFP2 custom amplicon design* yang menargetkan gen BRCA1 dan BRCA2. *Hybridize Oligo Pool* diawali dengan mencampurkan 5 μl ACD1 (*Amplicon Control DNA*), 5 μl TE dan 5 μl ACP1 (*Control Oligo Pool*) ke dalam PCR tube. Sebanyak 10 μl gDNA sampel FFPE (25 ng/μL) dan 5 μl *AFP2 custom amplicon* ke dalam PCR tube. *Tube* di-*spin down* kemudian diletakkan pada *heat block* pada suhu 95°C selama 1 menit dan dilanjutkan hingga suhunya turun menjadi 40°C selama 80 menit.

b. Remove Unbound Oligo

Proses *Remove Unbound Oligo* bertujuan untuk mencuci oligooligo yang tidak berikatan dengan gDNA. Proses ini diawali dengan menyiapkan *Filter Plate Unit* (FPU plate). Setiap sumuran yang digunakan pada FPU *plate* dicuci menggunakan 45 μl *Stringent Wash* 1 (SW1) kemudian disentrifugasi pada 2272 x g selama 10 menit. Sumuran tidak dapat digunakan apabila residu *buffer* dalam sumuran lebih dari 15 μl. Sampel pada PCR tube dipindahkan ke dalam FPU *plate* kemudian disentrifugasi pada 2272 x g selama 2 menit. Sampel pada masing-masing sumuran dicuci dua kali menggunakan 45 μl SW1 kemudian disentrifugasi pada 2272 x g selama 5 menit. Setiap sumuran ditambahkan dengan 45 μl UB1 (*Universal Buffer* 1), kemudian disentrifugasi pada 2272 x g selama 5 menit.

c. Extend and Ligate Bound Oligos

Pada proses *Extend and Ligate Bound Oligos* terjadi proses ekstensi oleh DNA *polymerase* dan ligasi oleh DNA *ligase* di antara *custom probe* melalui area DNA target. Produk dari proses ini adalah DNA target yang terletak di antara *probe*. Proses ini dilakukan dengan menambahkan 45 μl ELM4 (*Extension-Ligation Mix* 4) pada setiap sumuran yang berisi sampel. FPU *plate* kemudian diinkubasi pada 37°C selama 45 menit.

d. Amplify Libraries

Pada proses ini terdapat penambahan *index* i7 dan i5 yang bertujuan untuk menandai sampel agar nantinya dapat dikelompokkan. Index i7 dan i5 diatur pada *TruSeq Index Plate Fixture*, indeks i7 diletakkan secara vertikal dan indeks i5 diletakkan secara horizontal.

Sebanyak 4 µl indeks i7 ditambahkan pada setiap sampel secara vertikal dan 4 µl indeks i5 ditambahkan pada setiap sampel secara horizontal. Masing-masing sampel akan mendapatkan kombinasi indeks i7 dan i5. Sebanyak 22 µl campuran PMM2 (*PCR Master Mix 2*) dan TDP1 (*TruSeq DNA Polymerase 1*) dipindahkan ke setiap PCR tube yang diletakkan pada *Indexed Amplification Plate* (IAP *plate*). Campuran PMM2 dan TDP1 per reaksi dibuat dengan menambahkan sebanyak 0,58 µl TDP1 dan 29.1 µl PMM2 ke dalam 1.5ml *microsentrifuge tube*. Campuran di-*pippeting* dan di-*spin down*.

Sampel dalam FPU plate yang telah diinkubasi sebelumnya disentrifugasi pada 2272 x g selama 2 menit. Setiap sumuran ditambahkan 25 μl 50mM NaOH kemudian dipipeting. FPU plate diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Sebanyak 20 μl sampel dipindahkan ke dalam PCR tube yang berisi mix PMM2, TDP1 dan adapter indeks (i7 dan i5). *Tube* di-*spin down* kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR. Suhu pra-denaturasi diatur pada suhu 95°C selama 3 menit. Proses amplifikasi berjalan selama 25 siklus yang meliputi proses denaturasi (95°C selama 30 detik), *annealing* (66°C selama 30 detik), dan ekstensi (72°C selama 60 detik). Suhu *post* ekstensi diatur pada suhu 72°C selama 5 menit. Produk disimpan dalam suhu 10°C sebelum digunakan ke tahap selanjutnya. Produk juga dapat disimpan dalam suhu 2 – 8°C selama 2 hari. Produk PCR sebanyak 5 μl dielektroforesis menggunakan 2,5 % gel agarosa pada 110 *volt* selama 45 menit.

3.9 Analisis Data

Analisis data menggunakan analysis of variance (ANOVA) dua arah dan ANOVA tiga arah yang bertujuan untuk mengetahui signifikansi dari beberapa kelompok perlakuan. Nilai p-value kurang dari atau sama dengan 0.05 (p-value $\leq 0,05$) dianggap berbeda signifikan. Perangkat lunak yang digunakan pada penelitian ini adalah Statistical Package for the Social Sciences (SPSS versi 16.0.0). Data yang didapat juga ditampilkan dalam perhitungan rata-rata dan standar deviasi dalam diagram.

repository.up.

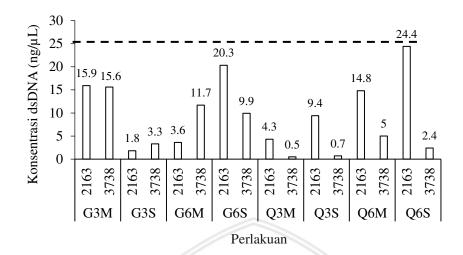
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Jumlah Input Sampel dan Proses Deparafinasi Sampel FFPE terhadap Konsentrasi DNA

Perlakuan optimasi ini bertujuan untuk menentukan jumlah input sampel FFPE dan cara deparafinasi yang optimal untuk mendapatkan DNA yang dapat disekuensing menggunakan NGS. Sengüven dkk. (2014) dalam penelitiannya menyatakan bila tahap deparafinasi dan metode isolasi yang digunakan merupakan tahapan yang paling penting dalam isolasi DNA. Target dari perlakuan optimasi ini difokuskan untuk mendapatkan *double strand* DNA (*ds*DNA) dengan konsentrasi 25 ng/μL yang diukur menggunakan Qubit. Sampel diisolasi menggunakan *GeneRead DNA FFPE Kit* (Kit GR) dan *QIAamp DNA FFPE Kit* (Kit QA). Hasil dari perlakuan optimasi menunjukkan jika jumlah input sampel 3 x 10 μm dan 6 x 10 μm, baik dengan cara deparafinasi di *microtube* dan deparafinasi di *slide glass* yang diinkubasi selama 1 jam pada suhu 56°C ternyata masih belum mencapai target yang diharapkan yaitu 25 ng/μL (Gambar 5).

Kuantitas DNA yang diisolasi menggunakan Kit QA trennya cenderung meningkat ketika jumlah input sampel ditingkatkan dua kali lipat, dibandingkan dengan kit GR yang trennya kurang stabil (Gambar 5). Sampel FFPE yang diisolasi menggunakan Kit GR pada perlakuan G3M menghasilkan isolat dsDNA dengan kuantitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan G6M dan G3S. Data tersebut menunjukkan bila semakin banyak jumlah input sampel tidak berarti konsentrasi DNA yang didapatkan akan semakin banyak. Hal ini dapat dikarenakan DNA tertahan pada membran *silica* di *column* dan DNA belum terelusi dengan baik. Menurut Janecka dkk (2015) elusi ganda dapat meningkatkan konsentrasi DNA sebanyak 22% hingga 42%. Pada penelitian ini juga digunakan dua *column* untuk mengisolasi DNA dari sampel FFPE menggunakan kit GR sehingga DNA terelusi dengan baik.

Sampel FFPE yang diisolasi menggunakan Kit QA menunjukkan jika konsentrasi DNA meningkat ketika jumlah input sampel ditingkatkan dua kali lipat (Gambar 5). Data juga menunjukkan bila kuantitas DNA sampel 3738 yang diisolasi menggunakan Kit QA lebih rendah dibandingkan dengan sampel 3738 yang diisolasi menggunakan Kit GR. Hal tersebut dikarenakan kualitas sampel FFPE dengan kode 3738 tidak lebih baik dibandingkan dengan sampel 2163. Selain kualitas

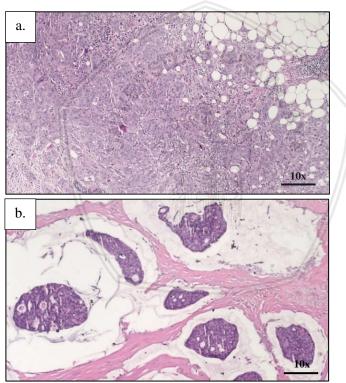


Gambar 5. Konsentrasi dsDNA pada setiap kelompok perlakuan dengan dsDNA 25 ng/µL. target G3M =isolasi sampel menggunakan Kit GR dengan ketebalan 3x 10 µm dan deparafinasi di microtube: G3S isolasi sampel menggunakan Kit GR dengan ketebalan 3 x 10 µm dan slide glass; G6M isolasi deparafinasi di = sampel menggunakan Kit GR dengan ketebalan 6 x 10 µm dan deparafinasi di microtube; G6S = isolasi sampel menggunakan Kit GR dengan ketebalan 6 x 10 µm dan deparafinasi di slide glass; O3M =isolasi sampel menggunakan Kit QA dengan ketebalan 3x 10 µm dan deparafinasi microtube: di O3S isolasi sampel menggunakan Kit QA dengan ketebalan 3 x 10 µm dan deparafinasi di slide glass; Q6M = isolasi menggunakan Kit OA dengan ketebalan 6 x 10 µm dan Q6S deparafinasi di microtube; isolasi sampel menggunakan Kit QA dengan ketebalan 6 x 10 µm dan deparafinasi di *slide glass*

sampel FFPE, faktor lain yang berpengaruh pada penelitian ini yaitu luas area tumor dan kerapatan sel yang berbeda antara sampel 3738 dan sampel 2163 (Gambar 6). Data tersebut juga menunjukkan bila Kit GR mampu mengisolasi sampel FFPE yang kualitasnya kurang baik untuk mendapatkan kuantitas dsDNA yang tinggi, tetapi masih belum mencapai target konsentrasi dsDNA yang dibutuhkan yaitu 25 ng/ μ L.

repository.up.a

Sampel FFPE yang digunakan pada penelitian ini berupa blok FFPE yang berasal dari arsip pasien kanker payudara RS. Dharma Nugraha dan telah disetujui oleh komite etik SCI. Blok FFPE yang didapat dipotong dengan ketebalan 10µm dan area tumor ditandai oleh patolog. Kerapatan sel antara sampel 2163 dan 3738 tidak sama, hal tersebut juga menjadi faktor tinggi rendahnya kuantitas DNA yang didapatkan (Gambar 6). Nam dkk. (2014) juga menyatakan jika selain jenis fiksatif yang digunakan, durasi fiksasi dan kondisi penyimpanan sampel seperti lama penyimpanan sampel, suhu, dan kelembapan ruang tempat penyimpanan sampel FFPE juga berpengaruh terhadap kualitas dan kuantitas asam nukleat.



Gambar 6. Preparat sampel FFPE kanker payudara dengan pewarnaan *haematoxylin-eosin* (HE) a. Sampel dengan kode sampel 2163.05 – 16.05 (ER/PR positif Her-2 positif), b. Sampel dengan kode sampel 3738.08 – 16.05 (ER/PR positif Her-2 negatif)

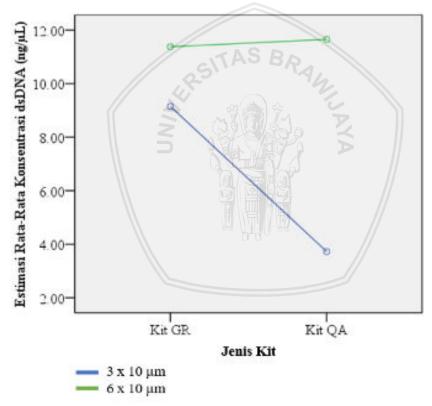
Hasil uji analisis varian tiga arah dari data konsentrasi dsDNA didapatkan bila tidak ada perbedaan yang signifikan antara Kit GR dan Kit QA. Data juga menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antar setiap perlakuan (Tabel 3). Namun, apabila dilihat dari profil plot interaksi antara jenis kit dan jumlah input sampel, dapat diketahui bila jumlah input sampel 6 x 10 µm dengan menggunakan Kit QA lebih optimal dari pada jumlah input sampel 3 x 10 µm atau 6 x 10 µm dengan menggunakan Kit GR (Gambar 7). Interaksi antara jenis kit dan metode deparafinasi menunjukkan bila Kit GR lebih optimal dideparafinasi di dalam *microtube* dan Kit OA lebih dideparafinasi di slide glass (Gambar 8). Interaksi antara jumlah input sampel dan metode deparafinasi menunjukkan bila perlakuan yang optimal adalah jumlah input sampel 6 x 10 µm dan metode deparafinasi di slide glass (Gambar 9). Data-data tersebut menunjukkan bila penggunaan Kit QA dengan jumlah input sampel 6 x 10 µm dan metode deparafinasi di slide glass merupakan kombinasi perlakuan yang optimal (perlakuan Q6S). Profil plot dari analisis varian tiga arah ini membuktikan bila perlakuan Q6S lebih optimal dari perlakuan yang lain walaupun tidak ada beda yang signifikan antar tiap perlakuan.

Tabel 3. Hasil uji analisis varian tiga arah dari konsentrasi dsDNA

	Konsentrasi dsDNA
	(P-value)
One-effect	//
Jenis Kit	0,514
Jumlah input sampel	0,210
Metode Deparafinasi	0,980
2 ways interaction	
Jenis Kit - Jumlah input sampel	0,456
Jenis Kit - Metode Deparafinasi	0,437
Jumlah input sampel - Metode Deparafinasi	0,178
3 ways interaction	
Jenis Kit - Jumlah input sampel -	
Metode Deparafinasi	0,211

Keterangan: *P-value* $\alpha = 0.05$

Jumlah input sampel FFPE sebanyak 6 x 10 μ m merupakan jumlah input yang optimal untuk isolasi DNA menggunakan Kit GR dan Kit QA. Namun, profil plot juga menunjukkan bila Kit GR menghasilkan konsentrasi dsDNA lebih tinggi dibandingkan dengan Kit QA dengan jumlah input sampel 3 x 10 μ m dan sebaliknya dengan jumlah input sampel 6 x 10 μ m konsentrasi dsDNA yang dihasilkan Kit QA lebih unggul dari Kit GR. Interaksi antara jenis kit dan jumlah input sampel tersebut menunjukkan bila setiap kit memiliki jumlah input optimum yang berbeda-beda (Gambar 7). Tang dkk. (2009) dalam penelitiannya mengatakan bila jumlah sayatan sampel yang digunakan tergantung dari kualitas sampel dan kemampuan kit yang digunakan.

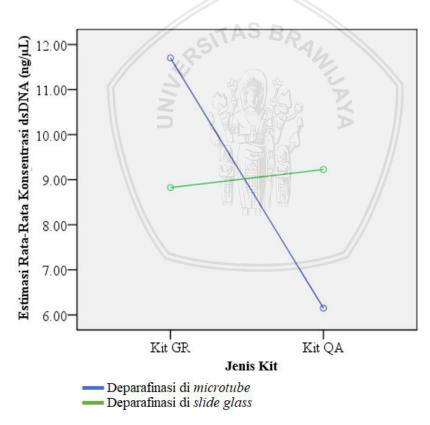


Gambar 7. Interaksi antara jenis KIT dengan jumlah input sampel

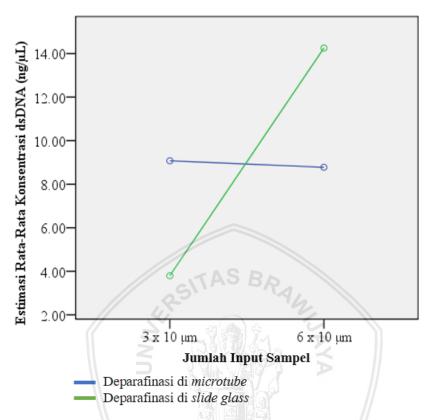
Kemampuan kit tersebut tentu saja dipengaruhi oleh penggunaan reagen deparafinasi, cara deparafinasi, dan buffer lisis yang digunakan. Proses deparafinasi standar kedua kit (Kit GR dan Kit QA) dilakukan di microtube. Reagen deparafinasi Kit OA menggunakan xylene dan etanol (96 – 100 %). Kit GR menggunakan larutan deparafinasi yang berbeda dengan kit OA dan tidak diketahui komposisinya yang disebut dengan deparaffinization solution. Xylene merupakan agen deparafinasi yang seringkali digunakan untuk menghilangkan parafin pada sampel FFPE. Xylene merupakan pelarut yang kuat dan pencuci etanol (Sengüven dkk., 2014). Sifat tersebut membuat xylene juga digunakan untuk menghilangkan alkohol sebelum infiltrasi parafin pada pembuatan blok FFPE (Yeung dkk., 2014). Namun, Mansour dkk. (2014) dalam penelitiannya mengatakan bila penggunaan xylene sebagai agen deparafinasi dapat mengurangi konsentrasi dan integritas protein.

Residu formalin (Qiagen (2014b) dan xylene pada sampel dapat menghambat proses lisis menggunakan Proteinase-K (Coura dkk., 2005). Hasil dari penelitian ini menunjukkan bila proses deparafinasi di microtube baik diaplikasikan untuk isolasi DNA FFPE menggunakan Kit GR. Deparafinasi di slide glass baik diaplikasikan untuk isolasi DNA FFPE menggunakan Kit QA (Gambar 8). Deparafinasi di microtube merupakan metode standar Kit GR dan Kit OA. Deparafinasi sampel FFPE pada slide glass menggunakan reagen xylene dan akohol bertingkat (absolute, 96%, 70%). Reagen ini sama dengan reagen deparafinasi standar Kit QA (xylene dan etanol absolute). Data ini menunjukkan bila deparaffinization solution (agen deparafinasi pada Kit GR) lebih optimal melarutkan parafin dalam microtube dibandingkan dengan xylene dan etanol pada Kit QA. Penggunaan xylene dan etanol lebih lebih optimal melarutkan parafin pada sampel yang melekat pada slide glass. Namun, apabila melihat hasil isolasi DNA pada perlakuan G6S (Gambar 5), data tersebut menunjukkan bila untuk jumlah input 6 x 10 µm dengan metode deparafinais di slide glass dan menggunakan Kit GR menghasilkan konsentrasi dsDNA sebesar 20.3 ng/µL (sampel perlakuan deparafinasi 2163) lebih besar dari di *microtube* menggunakan Kit GR. Hal ini menunjukkan bila deparaffinization solution pada Kit GR optimum untuk jumlah input sampel 3 x 10 µm, tetapi untuk jumlah input sampel 6 x 10 µm lebih optimum menggunakan metode deparafinasi di slide glass. Hal inilah yang mendasari digunakannya metode deparafinasi di slide glass baik untuk Kit GR dan Kit OA

Selain reagen deparafinasi yang berbeda, kit QA dan kit GR juga memiliki *buffer* lisis yang berbeda. Kit QA menggunakan *buffer* ATL dan Proteinase-K sedangkan Kit GR menggunakan *buffer* FTB dan Proteinase-K. Proteinase-K merupakan non-spesifik serine protease yang digunakan untuk melisiskan protein saat ekstraksi DNA dan RNA. Aktivasi Proteinase-K dipengaruhi dengan adanya *Sodium Dodecyl sulfate* (SDS) atau urea, kondisi pH yang tinggi, konsentrasi garam dan suhu yang optimal. *Buffer* yang digunakan untuk Proteinase-K biasanya mengandung 0,1 M NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA dan 0,5% SDS (Life Technologies, 2012). *Buffer* FTB (Kit GR) dan ATL (Kit QA) kemungkinan besar mengandung SDS atau urea dengan kombinasi bahan kimia lain yang berbeda sehingga mempengaruhi kemampuannya dalam melisiskan protein.



Gambar 8. Interaksi antara jenis kit dengan metode deparafinasi



Gambar 9. Interaksi antara jumlah input sampel FFPE dengan metode deparafinasi.

Hasil dari penelitian ini juga menunjukkan bila deparafinasi di *slide glass* dengan jumlah input DNA 6 x 10 µm menghasilkan konsentrasi DNA lebih tinggi daripada deparafinasi di *microtube* walaupun perbedaannya tidak signifikan (Gambar 9). Sengüven dkk., (2014) merekomendasikan proses deparafinasi yang dilakukan di *slide glass* karena lebih mudah dan efisien serta menghasilkan konsentrasi DNA yang lebih tinggi daripada deparafinasi di *microtube*. Parafin yang terdapat pada sampel FFPE mungkin belum terlarut secara sempurna ketika proses deparafinasi dilakukan di *microtube*. DNA juga dapat terbuang ketika pemisahan pelet dari supernatan saat proses akhir deparafinasi di dalam *microtube*. Selain itu, sampel mungkin banyak beterbangan ketika dikikis dari *slide glass* pada tahap awal deparafinasi. Proses deparafinasi di dalam *microtube* juga memakan waktu yang

cukup lama untuk mengerik, terlebih bila jumlah sampel banyak. Proses deparafinasi di *slide glass* juga lebih bersih dari sisa parafin dan *xylene*. Hal ini menjadi penting karena sisa parafin dapat mengurangi kualitas dan kuantitas sampel Sengüven dkk. (2014). Coura dkk. (2005) juga mengatakan bila sisa *xylene* pada sampel dapat menghambat proses lisis menggunakan Proteinase-K.

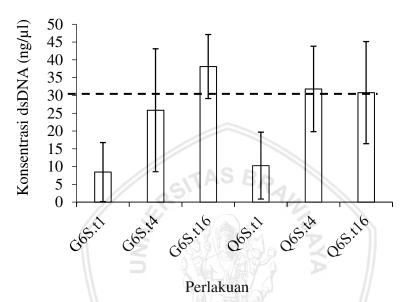
Hasil dari setiap perlakuan yang telah dilakukan ini belum cukup untuk memutuskan Kit GR lebih baik dari Kit QA atau sebaliknya. Walaupun telah diketahui perlakuan Q6S lebih optimal, tetapi datanya masih kurang kuat. Secara umum, perlakuan menggunakan Kit GR dan Kit QA belum menghasilkan konsentrasi dsDNA sesuai target yang dibutuhkan untuk NGS (25 ng/μL). Namun, perlakuan dengan jumlah input 6 x 10μm dan metode deparafinasi yang dilakukan di *slide glass* menghasilkan isolat dengan konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan grup perlakuan yang lain (Gambar 9). Konsentrasi dsDNA yang dihasilkan dari perlakuan Q6S hampir mencapai target yang dibutuhkan yaitu 24,4 ng/μL, sedangkan perlakuan G6S konsentrasinya 20,3 ng/μL.

4.2 Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap Konsentrasi dsDNA

Perlakuan ini bertujuan untuk mendapatkan waktu inkubasi sampel FFPE dalam Proteinase-K dan *buffer* lisis pada suhu 56°C yang optimal. Suhu 56°C merupakan suhu yang digunakan oleh standar penggunaan Kit GR dan Kit QA. Data hasil penelitian secara umum menunjukkan bila semakin lama waktu inkubasi maka semakin tinggi konsentrasi DNA yang didapatkan (Gambar 10). Proteinase-K bekerja pada suhu 50°C dengan waktu inkubasi selama 30 – 60 menit. Waktu inkubasi dalam Proteinase-K tergantung dari tinggi rendahnya kandungan protein dalam sampel. Penambahan Proteinase-K juga perlu dilakukan apabila protein dalam sampel tinggi (Life Technologies, 2012). Hasil penelitian Sengüven dkk. (2014) yang membandingkan waktu inkubasi 16 jam dan 72 jam menunjukkan bila semakin lama waktu inkubasi pada Proteinase – K dan *buffer* lisis pada suhu 55°C dapat menghasilkan konsentrasi DNA yang lebih tinggi. Waktu inkubasi dapat dilakukan hingga 5 hari sampai seluruh jaringan terlarut sempurna.

Hasil uji analisis varian dua arah dari konsentrasi dsDNA yang didapatkan menunjukkan bila tidak ada perbedaan yang signifikan antara Kit GR dan Kit QA. Namun, terdapat perbedaan yang signifikan antar waktu inkubasi yang digunakan (Tabel 4). Waktu inkubasi yang optimal dalam penggunaan Kit GR untuk mengisolasi sampel FFPE

yaitu selama16 jam sedangkan Kit QA selama 4 jam. Hasil penelitian tidak berbeda jauh dengan hasil Janeca dkk. (2015) yang mengatakan bila waktu inkubasi 3 jam menggunakan Kit QA sudah cukup untuk mendapatkan isolat DNA dengan kualitas dan kuantitas yang tinggi.



Gambar 10. Rata-rata konsentrasi dsDNA hasil isolasi sampel FFPE dengan variasi waktu inkubasi 56°C. G6S.t1 = waktu inkubasi 1 jam menggunakan Kit GR; G6S.t4 = waktu inkubasi 4 jam menggunakan Kit GR; G6S.t16 = waktu inkubasi 16 jam menggunakan Kit GR; Q6S.t1 = waktu inkubasi 1 jam menggunakan Kit QA; Q6S.t4 = waktu inkubasi 4 jam menggunakan Kit QA; Q6S.t16: waktu inkubasi 16 jam menggunakan Kit QA

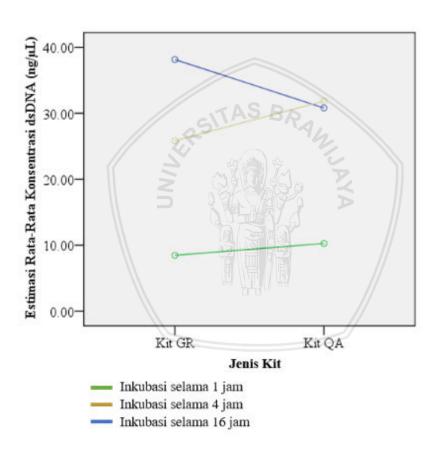
Hasil ini juga dibuktikan dengan profil plot data uji analisis varian dua arah yang telah dilakukan (Gambar 11). Mengingat pada penelitian ini diprioritaskan metode yang mudah, cepat dan murah, penggunaan Kit QA dengan waktu inkubasi selama 4 jam lebih direkomendasikan. Namun, hasil dari perlakuan ini perlu dikonfirmasi kembali dengan integritas DNA yang didapat, mengingat NGS membutuhkan DNA dengan kemampuan amplifiabilitas yang tinggi.

AWIJAY

Tabel 4. Hasil uji analisis varian dua arah dari konsentrasi dsDNA

	Konsentrasi dsDNA (P-value)
One-effect	
Jenis Kit	0,978
Waktu Inkubasi	0,006
2 ways interaction	
Jenis Kit - Waktu Inkubasi	0,055

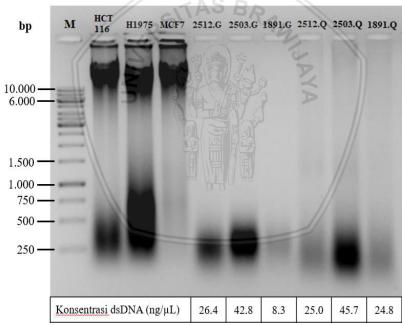
Keterangan: *P-value* $\alpha = 0.05$



Gambar 11. Interaksi antara jenis kit terhadap waktu inkubasi

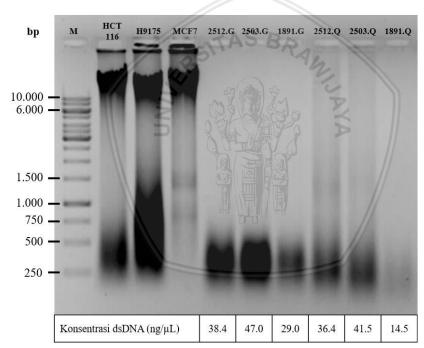
4.3 Integritas DNA FFPE

Fragmentasi DNA yang diisolasi dari sampel FFPE terlihat pada seluruh sampel FFPE, baik sampel yang diinkubasi selama 4 jam (Gambar 12) dan 16 jam (Gambar 13). DNA dengan kualitas fragmen yang baik (high molecular weight DNA) ditunjukkan oleh sampel HCT116 (cell line kanker usus besar), H1975 (cell line kanker paruparu) dan MCF7 (cell line kanker payudara). Fragmen DNA dari sampel FFPE rata-rata berada dikisaran 250 bp hingga 500 bp. Hasil yang didapatkan ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian Ludyga dkk. (2012) yang mengisolasi sampel FFPE jaringan kanker payudara yang disimpan dari tahun 1986. Hasil dari penelitiannya menunjukkan fragmen yang dapat diamplifikasi menggunakan PCR berkisar antara 100 bp hingga 300 bp.



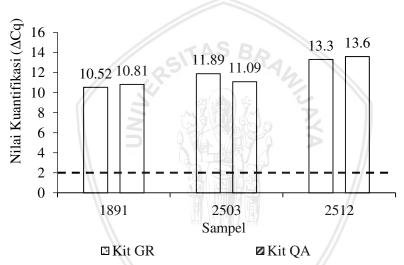
Gambar 12. Integritas genom DNA hasil isolasi menggunakan Kit GR (G) dan Kit QA (Q) dengan perlakuan inkubasi selama 4 jam pada suhu 56°C dan dideparafinasi di *slide glass*. M = *marker*; HCT116= *cell line* kanker usus besar; H1975 = *cell line* kanker paru-paru; MCF7 = *cell line* kanker payudara

DNA FFPE hasil isolasi menggunakan Kit QA menunjukkan DNA smear dengan rentang yang lebih panjang daripada DNA FFPE hasil isolasi menggunakan Kit GR. Fragmentasi DNA juga ditemukan pada DNA dengan konsentrasi dsDNA yang tinggi (Gambar 12 dan 13). Hasil penelitian ini juga menunjukkan bila semakin lama waktu inkubasi semakin tinggi konsentrasi DNA yang didapat tetapi tidak mempengaruhi kualitas fragmen DNA. Do & Dobrovic (2015) juga menyatakan bila kuantitas yang sama dari sampel DNA FFPE yang berbeda dapat saja kemampuan amplifiabilitasnya berbeda signifikan. Hal tersebut tergantung dari tingkat fragmentasi rantai DNA-nya. Fragmentasi DNA dari sampel **FFPE** akan mempengaruhi amplifiabilitas DNA.



Gambar 13. Integritas genom DNA FFPE hasil isolasi menggunakan Kit GR (G) dan Kit QA (Q) dengan perlakuan inkubasi selama 16 jam pada suhu 56°C dan dideparafinasi di *slide glass*. M = *marker*; HCT116= *cell line* kanker usus besar; H1975 = *cell line* kanker paru-paru; MCF7 = *cell line* kanker payudara

Fragmentasi DNA FFPE juga dikonfirmasi menggunakan *quantitave* PCR (qPCR), sampel dengan nilai Δ Cq \leq 2 mengindikasikan kualitas rantai DNA yang baik untuk diamplifikasi (Han dkk., 2015). Pada penelitian ini digunakan analisis qPCR DNA *binding dye* yang menggunakan *SYBR green I dyes*, *dyes* akan menempel pada *minor groove* dsDNA. Produk dibaca pada setiap siklusnya yaitu pada fase ekstensi, produk yang dihasilkan tidak spesifik (Navarro dkk., 2015). Produk PCR yang didapat idealnya berukuran 60 bp hingga 200 bp (Qiagen, 2014b). Nilai Δ Cq yang didapat dari lebih dari 2 yang artinya kualitas *template* DNA tidak baik atau telah terfragmentasi dan diragukan keberhasilannya untuk diamplifikasi (Gambar 14).



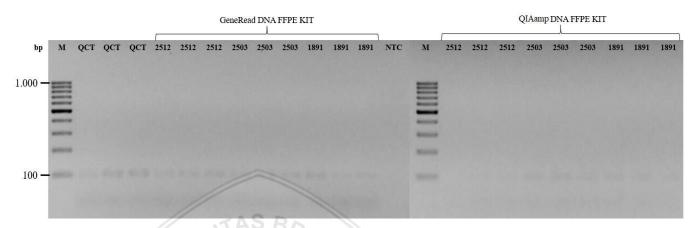
Gambar 14. Nilai kuantifikasi isolat DNA hasil isolasi menggunakan Kit GR dan Kit QA dengan waktu inkubasi 4 jam pada suhu 56°C dan dideparafinasi di *slide glass*

DNA *template* dengan amplifiabilitas yang rendah ini juga dibuktikan dengan produk PCR yang rendah saat di elektroforesis. Hasil elektroforesis yang tidak terlalu tebal menunjukkan bila *template* DNA bahkan tidak mampu teramplifikasi pada panjang fragmen 100 bp, terutama isolat DNA hasil isolasi menggunakan Kit QA (Gambar 15). Hasil dari produk ini juga ditampilkan dalam *amplification plot* (Gambar 16). *Amplification plot* menunjukkan status amplifikasi setiap

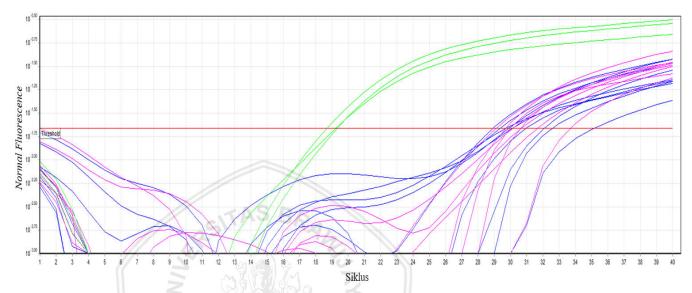
sampel yang diGambarkan dengan sinyal fluoresens. Garis *threshold* merupakan ambang batas yang dibuat untuk melihat perbedaan nilai siklus (C_t) sampel satu dengan yang lain pada fase eksponensial. *Cylce threshold* (C_t) merupakan nilai siklus yang didapat dari potongan antara sinyal fluoresens dan garis *threshold* yang ditetapkan. Mengingat nilai ΔCq didapatkan dari selisih antara nilai rata-rata C_t sampel dan nilai rata-rata C_t standar, maka nilai C_t sampel tidak boleh lebih tinggi dari nilai C_t standar untuk mendapatkan nilai $\Delta Cq \leq 2$. Hal ini berarti DNA dengan kualitas DNA yang baik akan teramplikasi sebelum atau tidak jauh setelah standar kit yang digunakan teramplifikasi. *Amplification plot* menunjukkan bila nilai C_t sampel DNA FFPE berkisar antara 29 hingga 35 jauh setelah standar kit yang nilainya berkisar antara 18 hingga 20.

Kualitas fragmen DNA FFPE hasil isolasi menggunakan Kit GR dan Kit QA sama-sama tidak memenuhi standar untuk disekuensing menggunakan NGS. Penjelasan yang mungkin dari penelitian ini adalah rendahnya kualitas sampel FFPE yang digunakan. Rendahnya kualitas sampel FFPE ini dapat dikarenakan proses pembuatan blok FFPE yang tidak terstandar. Selain itu juga dapat dikarenakan sampel disimpan terlalu lama dan cara penyimpanan sampel yang tidak baik. Govender & Naidoo (2016) menjelaskan bila rendahnya kualitas sampel FFPE dapat dikarenakan jenis fiksatif, durasi fiksasi, dan, lama waktu penyimpanan blok FFPE (Govender & Naidoo, 2016).

Penggunaan kit QA dan deparafinasi di *slide glass* dengan waktu inkubasi pada *buffer* lisis pada suhu 56°C selama 4 jam lebih direkomendasikan. Hal tersebut dikarenakan penggunaan Kit QA lebih mudah, murah, dan cepat daripada Kit GR. Harga Kit QA untuk 50 reaksi sebesar 242 USD atau setara dengan Rp. 3.504.160 (per Juli 2018) lebih murah dibandingkan dengan Kit GR yang seharga sebesar 312 USD atau setara dengan Rp. 4.517.760 (per Juli 2018) (Qiagen, 2018). Hasil penelitian Janecka dkk. (2015) juga telah membuktikan bila Kit QA dapat digunakan untuk isolasi DNA dari FFPE yang disimpan lama bahkan sebelum tahun 1820. Deparafinasi yang dilakukan di *slide glass* juga direkomendasikan karena lebih mudah, cepat dan efisien dibandingkan dengan deparafinasi di dalam *microtube*.



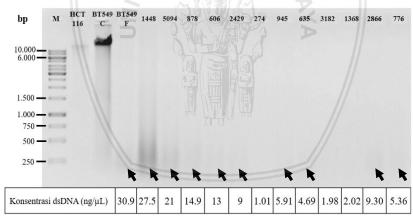
Gambar 15. Produk qPCR sampel FFPE hasil isolasi menggunakan Kit GR dan Kit QA dengan perlakuan waktu inkubasi pada suhu 56°C selama 4 jam dan dideparafinasi di *slide glass*. M = Marker; NTC = *No template control*; QCT = QC primer (standar)



Gambar 16. Amplifiabilitas isolat DNA FFPE hasil isolasi dengan Kit GR (warna merah muda) dan Kit QA (warna biru) dengan perlakuan waktu inkubasi pada suhu 56°C selama 4 jam dibandingkan dengan standar kit (warna hijau)

4.4 Validasi Metode Isolasi yang Optimal Menggunakan Sampel FFPE TNBC

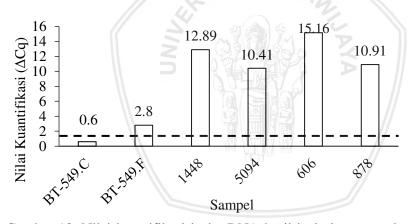
Penggunaan kit QA dengan perlakuan inkubasi pada suhu 56°C selama 4 jam dan deparafinasi sampel di slide glass menggunakan xylene dan etanol merupakan kombinasi metode isolasi yang dianggap paling optimal dari hasil optimasi. Metode tersebut divalidasi kembali dengan mengisolasi 12 sampel FFPE dari jaringan kanker payudara triple negative (TNBC). Konsentrasi dsDNA yang didapatkan belum mencapai target dsDNA yang dibutuhkan untuk NGS yaitu 25 ng/µL (Gambar 17). Isolat sampel DNA FFPE juga dibandingkan dengan sampel FFPE dari cell line kanker payudara (BT-549) yang dibuat langsung di Laboratorium Kalbe Genomic. Penggunaan sampel cell line dikarenakan tidak tersedianya jaringan kanker payudara yang dapat diisolasi langsung. Hasil yang didapatkan menunjukkan konsentrasi dsDNA FFPE BT-549 lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi dsDNA FFPE TNBC (Gambar 17).



Gambar 17. Integritas genom DNA FFPE TNBC yang diisolasi menggunakan Kit QA dengan perlakuan inkubasi selama 4 jam pada suhu 56°C dan deparafinasi di *slide glass*. Tanda panah menunjukkan adanya framentasi DNA pada kisaran 250 bp – 500 bp. M = *marker*, HCT116 = *cell line* kanker usus besar

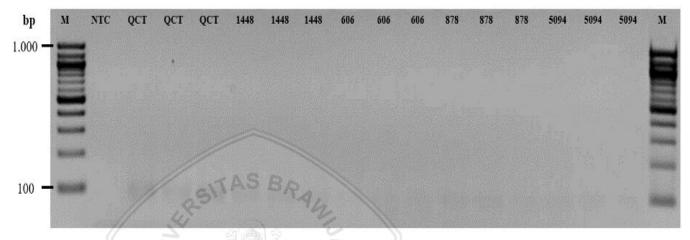
repository.ub.a

Isolat DNA FFPE TNBC sebanyak 2µ1 dielektroforesis menggunakan gel agaraosa 1% untuk melihat kualitas fragmen DNA yang didapatkan. Fragmentasi DNA FFPE TNBC juga terlihat pada seluruh sampel termasuk sampel FFPE BT-549 (BT-549.F) (Gambar 17). DNA dengan kualitas fragmen yang baik (high molecular weight DNA) ditunjukkan oleh sampel HCT116 (cell line kanker usus besar), dan BT-549 (cell line kanker payudara) (BT-549.C). Hasil yang didapat masih konsisten dengan ukuran fragmentasi DNA FFPE pada rentang 250 bp hingga 500 bp. Hasil dari penelitian ini semakin menguatkan hasil penelitian Ludyga dkk. (2012) yang menyatakan bila isolat DNA dari sampel FFPE yang disimpan dari tahun 1986 dapat diamplifikasi menggunakan multiplex PCR dengan produk yang ukurannya berkisar antara 100 bp hingga 300 bp. Hasil penelitian Tang dkk. (2009) juga menjelaskan bila fragmen DNA yang didapat dari sampel FFPE biasanya berkisar antara 100 bp hingga 3 kbp.

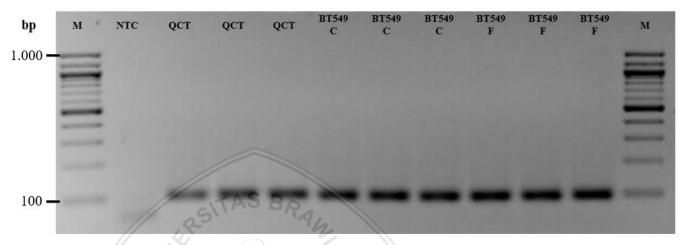


Gambar 18. Nilai kuantifikasi isolat DNA hasil isolasi meggunakan Kit QA dengan waktu inkubasi 4 jam pada suhu 56°C dan metode deparafinasi di *slide glass*. BT-549.C = *cell line* BT-549; BT-549.F = FFPE *cell line* BT-549

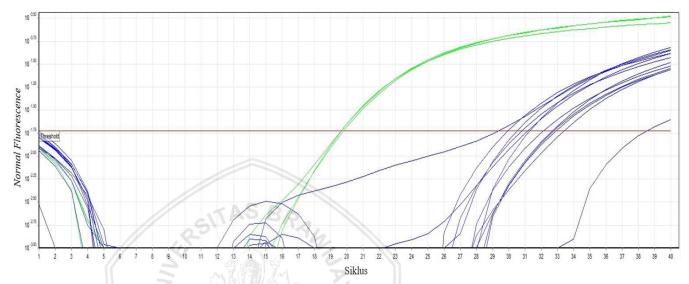
Fragmentasi DNA juga dibuktikan dengan qPCR, nilai Δ Cq yang didapat dari sampel FFPE TNBC lebih tinggi dari 2 yang artinya kualitas fragmen DNA rendah dan diragukan keberhasilan amplifikasinya (Gambar 18). Sampel FFPE TNBC yang dianalisis menggunakan qPCR hanya sampel dengan kode sampel 1448, 606, -



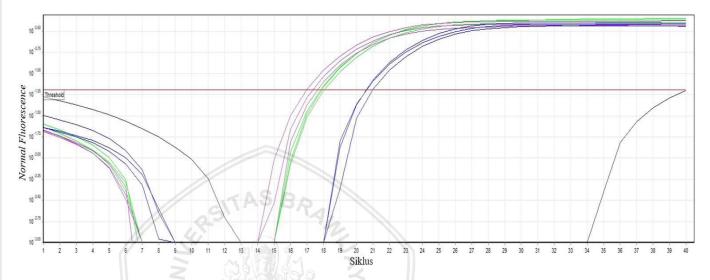
Gambar 19. Produk qPCR sampel FFPE hasil isolasi menggunakan Kit QA dengan waktu inkubasi 4 jam pada suhu 56°C dan dideparafinasi di *slide glass*. M = marker; NTC = *no template control*; QCT = QC primer (standar)



Gambar 20. Produk qPCR sampel *cell line* BT-549 (BT-549.C) dan FFPE BT-549 (BT-549.F) yang diisolasi menggunakan Kit QA dengan waktu inkubasi 4 jam pada suhu 56°C dan dideparafinasi di *slide glass*. M = marker; NTC = *no template control*; QCT = QC primer (standar)



Gambar 21. Amplifiabilitas isolat DNA FFPE hasil isolasi menggunakan Kit QA (warna biru) dengan perlakuan waktu inkubasi pada suhu 56°C selama 4 jam dibandingkan dengan standar kit (warna hijan)



Gambar 22. Amplifiabilitas isolat DNA *cell line* BT-549 (warna merah muda) dan isolat DNA FFPE BT-549 (warna biru) hasil isolasi menggunakan Kit QA dengan perlakuan waktu inkubasi pada suhu 56°C selama 4 jam dibandingkan dengan standar kit (warna hijau)

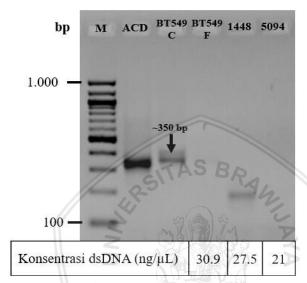
878, dan 5094 sebagai representasi dari sampel FFPE TNBC dengan konsentrasi dsDNA tertinggi. Kualitas sampel FFPE BT-549 dan BT-549 TNBC lebih baik dibandingkan dengan sampel FFPE TNBC (Gambar 18). Namun, fragmentasi pada kisaran 250bp hingga 500bp terlihat pada hasil elektroforesis sampel DNA FFPE BT-549.

Produk qPCR yang didapat menunjukkan bila pita produk amplifikasi sampel FFPE sangat tipis dibandingkan dengan sampel FFPE BT-549 dan sampel cell line BT-549 (Gambar 19 dan 20). Data tersebut menunjukkan bila amplifiabilitas sampel FFPE lebih rendah dari pada sampel FFPE BT-549 dan sampel cell line BT-549. Amplification plot yang didapat juga menunjukkan bila nilai C_t sampel DNA FFPE TNBC berada di kisaran 29 hingga 38 sedangkan nilai C_t standar kit berkisar antara 19 dan 20 (Gambar 21). Amplification plot (Gambar 22) juga menunjukkan nilai C_t sampel DNA FFPE BT-549 berada pada kisaran 20 hingga 21 tidak jauh setelah standar kit dan nilai C₁ sampel DNA cell line BT-549 berada pada kisaran 16 hingga 18 sebelum nilai C_t standar kit. Nilai C_t standar kit berkisar antara 17 hingga 18. Paireder dkk. (2013) mengatakan bila nilai Ct yang tinggi pada hasil qPCR DNA FFPE dapat dikarenakan fragmentasi DNA akibat penggunaan formalin dan rendahnya kemurnian DNA.

Isolat DNA dilanjutkan ke tahap *library preparation* yang merupakan tahapan awal dari sekuensing menggunakan *Next-Generation Sequencing* (NGS). Sampel diamplifikasi menggunakan probe *AFP2 custom amplicon design* yang didesain untuk mendapatkan DNA dengan panjang fragmen 250bp (~350 bp). *Probe* ini khusus digunakan untuk deteksi BRCA1 dan BRCA2 pada kanker. Sampel FFPE dengan kode sampel 1448 dan 5094 digunakan untuk *library preparation* sebagai representasi dari DNA FFPE TNBC yang memiliki konsentrasi tertinggi. Produk PCR *library preparation* sebanyak 5µL dielektroforesis menggunakan gel agarosa 2,5 %. Hasil yang didapat menunjukkan bila sampel FFPE tidak kompatibel untuk disekuensing, baik sampel FFPE TNBC maupun sampel FFPE *cell line* (Gambar 23).

Sampel *cell line* BT-549 berhasil diamplifikasi yang ditunjukkan dengan pita DNA pada ukuran ~350 bp (Gambar 23). Hal tersebut tidak diragukan karena *cell line* BT-549 memiliki konsentrasi dsDNA yang tinggi dan kualitas fragmen DNA yang baik. Sampel FFPE BT-549 yang memiliki konsentrasi dsDNA 30.9 ng/ μ L dengan nilai Δ Cq = 2.8 juga tidak berhasil diamplifikasi,

walaupun sebenarnya terlihat pita tipis yang terbentuk dari hasil *library preparation*. Hal ini menunjukkan bila sekuensing membutuhkan DNA *template* dengan kualitas yang tinggi (Δ Cq \leq 2). Selain itu data ini juga menunjukkan bila konsentrasi DNA yang tinggi tidak mempengaruhi kualitas fragmen DNA.



Gambar 23. Produk *Library preparation* dari isolat DNA *cell line* BT-549 (BT-549.C), isolat DNA FFPE BT-549 (BT-549.F) dan isolate DNA FFPE TNBC (1448 dan 5094). M = marker; ACD = *amplicon control* DNA; ~350 bp = amplikon DNA yang diharapkan

Selain faktor kualitas isolat DNA FFPE yang rendah, kit yang digunakan untuk *library preparation* mungkin tidak sesuai untuk DNA FFPE yang kualitasnya rendah. Pada penelitian ini digunakan *TruSeq® Custom Amplicon v1.5 kit* yang membutuhkan input dsDNA sebesar 50 ng - 250 ng untuk mendapatkan amplikon dengan ukuran 150, 175, 250, 425 bp (Illumina, 2015). Kualitas dan kuantitas DNA FFPE yang baik sangat susah didapatkan terutama dari sampel FFPE yang kualitasnya rendah, maka dibutuhkan *library preparation* Kit dengan jumlah input rendah. Illumina memiliki *TruSeq® Custom Amplicon Low Input Library Prep Kit* dengan input DNA 10 ng – 50 ng, untuk mendapatkan amplikon DNA dengan ukuran 150, 175, 250 bp (Illumina, 2017).

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Perlakuan yang optimal untuk isolasi DNA yaitu dengan jumlah input sampel FFPE sebanyak 6 x 10 μm dan metode deparafinasi di *slide glass*. Waktu inkubasi selama 4 jam optimal untuk penggunaan Kit QA dan waktu inkubasi 16 jam optimal untuk penggunaan Kit GR. Kombinasi perlakuan dengan jumlah input sampel FFPE 6 x 10 μm, metode deparafinasi di *slide glass*, waktu inkubasi 4 jam, dan menggunakan Kit QA lebih direkomendasikan. Hal tersebut dikarenakan Kit QA lebih murah, mudah, dan cepat untuk mendapatkan isolat DNA FFPE sesuai target peruntukan NGS (25 ng/μL). Kapabilitas Kit QA dan Kit GR untuk isolasi DNA dari sampel FFPE TNBC tidak berbeda signifikan. Namun, tidak adanya enzim *Uracil-N-glycosylase* perlu diperhitungkan sebagai salah satu kekurangan dari penggunaan Kit QA.

5.2 Saran

Penelitian selanjutnya sebaiknya menggunakan sampel FFPE yang terstandar sehingga kualitas FFPE tidak menjadi faktor bebas dalam suatu penelitian. *Macrodissection* atau penandaan area tumor lebih dispesifikkan kembali pada area yang memiliki sel tumor yang lebih banyak. Selain itu, pengaruh berbagai jenis fiksatif terhadap kualitas dan kuantitas DNA juga perlu dilakukan karena sejauh ini tidak banyak penelitian yang meneliti dampak penggunaan agen fiksasi lain selain formalin. Penelitian selanjutnya diharapkan dapat memperoleh metode yang tidak hanya untuk mendapatkan konsentrasi DNA yang tinggi tetapi juga dapat menjaga kualitas fragmen DNA.

DAFTAR PUSTAKA

- Arreaza, G., P. Qiu, L. Pang, A. Albright, L. Z. Hong, M. J. Marton D. Levitan. 2016. Pre-Analytical considerations for successful Next-Generation Sequencing (NGS): challenges and opportunities for Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded tumor tissue (FFPE) Samples. *Int. J. Mol. Sci.* 17(9): 1-8.
- Arsenic, R., D. Treue, A. Lehmann, M. Hummel, M. Dietel, C. Denkert, J. Budczies. 2015. Comparison of targeted Next-Generation Sequencing and Sanger Sequencing for the detection of PIK3CA mutations in breast cancer. *BMC Clinical Pathology*. 15(1): 1-9.
- Behjati, S. & P. S. Tarpey. 2013. What is Next Generation Sequencing?. *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 98:236–238.
- Bonin, S., F.Hlubek, J. Benhattar, C. Denkert, M. Dietel, P. L. Fernandez, G. Höfler, H. Kothmaier, B.Kruslin, C. M. Mazzanti, A. Perren, H. Popper, A. Scarpa, P. Soares, G. Stanta, P. J. T. A. Groenen. 2010. Multicentre validation study of nucleic acids extraction from FFPE tissues. *Virchows Arch.* 457: 309–317.
- Chen, G., S. Mosier, C. D. Gocke, Ming-Tseh Lin, J. R. Eshleman. 2014. Cytosine deamination is a major cause of baseline noise in Next Generation Sequencing. *Mol Diagn Ther.* 18(5): 587–593.
- Choi, Y., A. Kim, J. Kim, J. Lee, S. Y. Lee, C. Kim. 2017. Optimization of RNA Extraction from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded blocks for targeted Next-Generation Sequencing. *J Breast Cancer*. 20(4): 393-399.
- Coura, R., J. C. Prolla, L. Meurer, P. Ashton-Prolla. 2005. An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *Clin. Pathol.* 58: 894–895.
- Do, H. & A. Dobrovic. 2015. Sequence artifacts in DNA from Formalin-Fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clinical Chemistry*. 61(1): 64–71
- Einaga, N., A. Yoshida, H. Noda1, M. Suemitsu, Y. Nakayama, A. Sakurada, Y. Kawaji, H. Yamaguchi, Y. Sasaki, T. Tokino, M. Esumi. 2017. Assessment of the quality of DNA from various Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) tissues and the use of this DNA for Next-Generation Sequencing (NGS) with no artifactual mutation. *PLoS ONE*. 12(5): e0176280.

- Govender, P. & R. Naidoo. 2016. Do antigen retrieval techniques improve DNA yield from Formalin Fixed Paraffin Embedded tissue?. *Adv Tech Biol Med*. 4(2):1-5.
- Han, J., B. Packard, E. Rudd, G. Durin, J. Laugharn. 2015. Assessing FFPE DNA quality: the "Illumina FFPE QC Kit" enables quantitation of improvements in FFPE DNA extraction technologies. Covaris, Inc. United States.
- Hedegaard, J., K. Thorsen, M. K. Lund, Anne-Mette K. Hein, S. J.
 Hamilton-Dutoit, S. Vang, I. Nordentoft, K. Birkenkamp-Demtroder, M. Kruhøffer, H. Hager, B. Knudsen, C. L.
 Andersen, K. D. Sørensen, J. S. Pedersen, T. F. Ørntoft, L.
 Dyrskjøt. 2014. Next-Generation Sequencing of RNA and DNA isolated from paired Fresh-Frozen and Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Samples of human cancer and normal tissue. *PLoS ONE*. 9(5): e98187.
- Heydt, C., J. Fassunke, H. Künstlinger, M. A. Ihle, K. König, L.C.
 Heukamp, Hans-Ulrich Schildhaus, M. Odenthal, R. Buttner,
 S.Merkelbach-Bruse. 2014. Comparison of pre-analytical FFPE sample preparation methods and their impact on massively parallel sequencing in routine diagnostics. *PLoS ONE*. 9(8): 1-11.
- Illumina. 2015. TruSeq® Custom Amplicon v1.5: a New and improved amplicon sequencing solution for interrogating custom regions of interest. Illumina Inc. United States.
- Illumina. 2017. TruSeq® Custom amplicon low input library prep kit: a scalable amplicon sequencing solution that delivers sensitive and specific analytical results from both low-input and FFPE DNA samples. Illumina Inc. United States.
- Janecka, A., A. Adamczyk, A. Gasińska. 2015. Comparison of eight commercially available kits for DNA extraction from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded tissues. *Analytical Biochemistry*. 476: 8-10.
- Life Technologies. 2012. **Proteinase-K solution**. Life Technologies Corporation. California.
- Lin, J., S. H. Kennedy, T. Svarovsky, J. Rogers, J. W. Kemnitz, A. Xu, K.T. Zondervan. 2009. High-quality genomic DNA extraction from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded samples deparaffinized using mineral oil. *Anal. Biochem.* 395: 265–267.

- Ludyga, N., B. Grünwald, O. Azimzadeh, S. Englert, H. Höfler, S. Tapio, M. Aubele. 2012. Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. *Virchows Arch.* 460: 131–140.
- Mansour, A., R. Chatila, N. Bejjani, C. Dagher, W. H. Faour. A novel xylene-free deparaffinization method for the extraction of proteins from human derived Formalin-Fixed Paraffin Embedded (FFPE) archival tissue blocks. *MethodsX*. 1: 90–95.
- Mathe, A., M. Wong-Brown, W. J. Locke, C.Stirzaker, S. G. Braye, J. F. Forbes, S. J. Clark, K. A. Avery-Kiejda, R. J. Scott. 2016. DNA methylation profile of triple negative breast cancerspecific genes comparing lymph node positive patients to lymph node negative patients. *Sci Rep.* 6: 33435.
- Nagahashi, M., Y. Shimada, H. Ichikawa, S. Nakagawa, N. Sato, K. Kaneko, K. Homma, T. Kawasaki, K.e Kodama, S. Lyle, K. Takabe, T.Wakai. 2017. Formalin-Fixed Paraffin-Embedded sample conditions for deep next generation sequencing. *Journal of surgical research*. 220: 125-132.
- Nam, S.K., J. I. Y. Kwak, N. Han, K. H. Nam, A. N. Seo, H. S. Lee. 2014. Effects of fixation and storage of human tissue samples on nucleic acid preservation. *The Korean Journal of Pathology*. 48: 36-42.
- Navarro, E., G. Serrano-Heras, M. J. Castano, J. Solera. 2015. Real-Time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*. 439: 231–250.
- Norgen Biotek Corp. 2014. **FFPE DNA purification kit**. Norgen Biotek Corp. Canada.
- Paireder, S., B. Werner, J. Bailer, W. Werther, E. Schmid, B. Patzak, M. China-Markl. 2013. Comparison of protocols for DNA extraction from long-term preserved formalin fixed tissues. *Anal. Biochem.* 439: 152–160.
- Qiagen. 2012. QIAamp® DNA FFPE tissue handbook: for purification of genomic DNA from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded tissues. QIAGEN Group. Jerman.
- Qiagen. 2014a. GeneRead™ DNA FFPE handbook: for purification of genomic DNA from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) tissues for reliable Next-Generation Sequencing analysis. QIAGEN Group. Jerman.
- Qiagen. 2014b. **QuantiFast® SYBR® Green PCR handbook.** QIAGEN Group. Jerman.

- Qiagen, 2018. Genomic DNA. https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/. Diakses 18 Juli 2018.
- Ripoli, F.L., A. Mohr, S. C. Hammer, S. Willenbrock, M. Hewicker-Trautwein, S. Hennecke, H. M. Escobar, I. Nolte. 2016 A
 Comparison of Fresh Frozen vs. Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded specimens of canine mammary tumors via branched-DNA assay. *Int. J. Mol. Sci.* 17: 1-11
- Sengüven B., E. Baris, T. Oygur, M. Berktas. 2014. Comparison of methods for the extraction of DNA from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded archival tissues. *Int. J. Med. Sci.* 11(5): 494-499.
- Sirkorsky, J. A., D.A. Premerano, T.W. Fenger, J. Denvir. 2007. DNA damage reduces taq DNA polymerase fidelity and pcr amplification efficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* 355(2): 431–437.
- Srinivasan, M., D. Sedmak, S. Jewell. 2002. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *American Journal of Phatology*. 161(6): 1961-1971.
- Tang, W., F. B. David, M. M. Wilson, B.G. Barwick, B. R. Leyland-Jones, M. M. Bouzyk. 2009. DNA extraction from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded tissue. *Cold Spring Harb Protoc*. 4(2).
- Weiss, A. Th. A., N. M. Delcour, A. Meyer, R. Klopfleisch. 2011. Efficient and cost-effective extraction of genomic DNA from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded tissues. *Veterinary Pathology*. 48(4): 834-838.
- Wolf, K., D. O'Neil, S.Schroeer, N. Fang. 2016. Next-Generation Sequencing library preparation from FFPE tissue samples. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 113:7.24.1-7.24.14.
- Yeung, E. C., C. Stasolla, M. J. Sumner, B. Q. Huang. 2015. **Plant microtechniques and protocols**. Springer International Publishing. Switzerland.