

OPTIMASI TEKNIK *FRAGMENT ANALYSIS* UNTUK DETEKSI *MICROSATELLITE INSTABILITY (MSI)* MENGUNAKAN SPESIMEN *FORMALIN-FIXED* *PARAFFIN EMBEDDED (FFPE)*

Puji Lestari¹, Nuria Gayosi¹, Adhitya Bayu Perdana²

¹D IV Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Jakarta III

²Laboratorium Penelitian dan Pengembangan, Rumah Sakit Kanker Dharmais
puji.lestari@poltekkesjakarta3.ac.id

ABSTRACT

Colorectal cancer is a malignancy that occurs in colon and rectum. Colorectal cancer is classified based on its cause, namely sporadic colorectal cancer and hereditary colorectal cancer. The assessment of MSI status is important because cancer patients with MSI status have a good prognosis of the cure rate and therapy. Tissue specimens and formalin-fixed, paraffin embedded (FFPE) can be used to assess MSI status by fragment analysis technique. FFPE is more recommended than tissue because its status on the specimen has been confirmed. The research was conducted in a descriptive observational with an experimental design at the Laboratory of Molecular Biology in the Research and Development Division of Dharmais Cancer Hospital in January-June 2022. Based on the results, there are factors that affect the MSI detection results, namely injection time on the Genetic Analyzer, DNA concentration, and PCR product volume. The optimal conditions for MSI detection of tissue samples are 8 seconds of injection time and 2 ng of concentration with 2 μ L of volume for PCR while the FFPE are 15 seconds of injection time and 20 ng of concentration with 2 μ L of volume for PCR. It was concluded that FFPE specimens could be used to detect MSI, but with different optimal conditions from tissue specimens. The DNA required from FFPE specimens tends to be more, total of 40 ng/ μ L, compared to DNA from tissue which is only 2 ng/ μ L. In addition, the injection time required by FFPE specimens was also almost twice as long as that of tissue specimens (15 seconds compared to 8 seconds).

Keywords : Colorectal Cancer; MSI; Fragment Analysis.

ABSTRAK

Kanker kolorektal merupakan keganasan yang terjadi di kolon dan rektum. Kanker kolorektal digolongkan menjadi dua berdasarkan faktor penyebabnya yaitu kanker kolorektal sporadis dan kanker kolorektal herediter. Penilaian status MSI menjadi hal yang penting karena pasien kanker kolorektal dengan status MSI positif memiliki prognosis yang lebih baik. Jaringan dan *formalin-fixed paraffin embedded (FFPE)* merupakan spesimen yang dapat digunakan untuk menilai status MSI dengan teknik *fragment analysis*. Penelitian dilakukan secara observasional deskriptif dengan desain eksperimental di Laboratorium Biologi

Molekuler bagian Penelitian dan Pengembangan Rumah Sakit Kanker Dharmais pada Januari-Juni 2022. Berdasarkan hasil penelitian, terdapat faktor yang memengaruhi hasil deteksi MSI yaitu, waktu injeksi pada alat *Genetic Analyzer*, konsentrasi DNA, dan volum produk PCR. Kondisi optimal deteksi MSI menggunakan spesimen jaringan yaitu dengan waktu injeksi 8 detik dan konsentrasi DNA 2 ng/ μ L dengan volum 2 μ L untuk PCR, sedangkan untuk spesimen FFPE yaitu dengan waktu injeksi 15 detik dan konsentrasi 20 ng/ μ L dengan volum 2 μ L untuk PCR. Disimpulkan bahwa spesimen FFPE dapat digunakan untuk mendeteksi MSI, namun dengan kondisi optimal yang berbeda dengan spesimen jaringan. DNA yang diperlukan dari spesimen FFPE cenderung lebih banyak, yaitu total 40 ng/ μ L, dibandingkan dengan DNA dari jaringan yang total hanya 2 ng/ μ L. Selain itu, waktu injeksi yang diperlukan oleh spesiman FFPE juga hampir dua kali lebih lama daripada spesimen jaringan (15 detikdibandingkan dengan 8 detik).

Kata Kunci : Kanker Kolorektal; MSI; *Fragment Analysis*.

PENDAHULUAN

Kanker kolorektal merupakan penyakit keganasan yang terjadi di kolon dan rektum sebagai bagian dari saluran gastrointestinal (Rompis & Nyoman 2020). Kanker kolorektal adalah salah satu kanker dengan angka kematian tertinggi ketiga di dunia dan jenis kanker ketiga terbanyak di Indonesia (Sayuti & Nouva 2019). Perkembangan kanker kolorektal berkaitan erat dengan faktor-faktor risiko yang memengaruhinya dan berdasarkan keterkaitan dengan faktor-faktor risiko tersebut, kanker kolorektal dapat dibedakan menjadi kanker kolorektal sporadis dan kanker kolorektal herediter (Rompis & Nyoman 2020).

Kanker kolorektal sporadis merupakan kanker kolorektal yang tidak berkaitan dengan aspek genetik akan tetapi kanker ini terbentuk dari beberapa faktor-faktor risiko yang dapat dimodifikasi seperti gaya hidup, paparan radiasi, dan lainnya. Sedangkan kanker kolorektal herediter merupakan kanker kolorektal yang terjadi karena adanya riwayat keluarga sebelumnya atau bersifat diturunkan (Rompis & Nyoman 2020). Salah satu penyebab kanker kolorektal pada herediter dan pada 20% kanker kolorektal sporadis adalah jalur karsinogenik *Microsatellite Instability* (MSI) atau ketidakstabilan mikrosatelit (Kamat *et al.* 2013).

Ketidakstabilan ini dipicu karena defisiensi atau rusaknya gen-gen *mismatch repair* (MMR). Berkurangnya jumlah MMR berdampak pada kecenderungan lebih tinggi terjadinya akumulasi mutasi yang pada akhirnya berkembang menjadi MSI dan menjadi kanker (Kamat *et al.* 2013).

Secara molekuler, status MSI dapat diidentifikasi dengan metode PCR melalui beberapa penanda MSI yaitu NR-21, BAT-26, BAT-25, NR-24, dan MONO-27. Metode PCR digunakan untuk mendeteksi kelima penanda tersebut. Ketidakstabilan pada mikrosatelit dapat ditentukan dengan hasil perbandingan panjang pengulangan nukleotida antara sel kanker dan sel normal. Status MSI ini dapat diklasifikasikan menjadi 3, yaitu *microsatellite stable* (MSS), *microsatellite instability-low* (MSI-L), dan *microsatellite instability-high* (MSI-H). MSS ditunjukkan dengan stabilnya penanda mikrosatelit (NR-21, BAT-26, BAT-25, NR-24, dan MONO-27). Status MSI-H ditunjukkan dengan adanya ketidakseimbangan pada penanda 2 atau lebih mikrosatelit (NR-21, BAT26, BAT-

25, NR-24, dan MONO-27) sedangkan status MSI-L ditunjukkan dengan ditemukannya ketidakstabilan pada salah satu dari 5 penanda mikrosatelit (Baudrin, Deleuze, dan How-Kit, 2018)

Penilaian status MSI secara molekuler pada kanker kolorektal dapat menggunakan berbagai jenis spesimen seperti jaringan dan *formalin-fixed, paraffin embedded* (FFPE). Baik *fresh frozen tissue* maupun FFPE merupakan sumber yang sangat berharga dalam studi genetik molekuler (Wang *et al.* 2013). Salah satu manfaat dari spesimen FFPE yang digunakan dalam analisis genomik molekuler penyakit kanker yaitu informasi yang didapat lebih akurat karena telah diketahui dengan pasti terkait status jaringan tersebut, yaitu benar-benar terdiagnosis kanker. Namun, kendalanya adalah kualitas DNA FFPE yang rendah dan telah terfragmentasi karena telah melalui proses yang panjang sampai terbentuk FFPE sehingga masih perlu diadakan optimasi untuk pemeriksaan menggunakan spesimen tersebut (Artha, 2018). Selain spesimen FFPE, spesimen jaringan dianggap sebagai spesimen yang ideal untuk analisis ekspresi gen karena kualitas DNA nya baik. Namun, spesimen ini memiliki kelemahan yaitu belum diketahui secara pasti status jaringannya melalui pemeriksaan histopatologi, apakah jaringan normal atau kanker (Artha 2018).

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian observasional deskriptif dengan desain eksperimental. Spesimen dalam penelitian ini berupa DNA yang berasal dari jaringan dan FFPE kanker kolorektal yang tersimpan di Biorepositori Rumah Sakit Kanker Dharmais (RSKD). Penelitian dilaksanakan di laboratorium Biologi Molekuler bagian Penelitian dan Pengembangan RSKD pada bulan Januari-Juni 2022. Ekstraksi DNA jaringan dilakukan sesuai dengan protokol *DNeasy Blood & Tissue Kit Qiagen (LOT no. 154026204)*, sedangkan untuk FFPE dilakukan sesuai dengan protokol *QiAmp DNA FFPE Tissue kit (LOT no. 160021979)*. Setelah ekstraksi maka dilanjutkan dengan tahap PCR menggunakan alat *thermal cycler* Biorad T100 dan sesuai protokol kit *Promega MSI Analysis System, Version 1.2 (Cat no. MD1641)*. Setelah itu dilanjutkan dengan teknik *fragment analysis* dengan alat *ABI 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Penelitian ini menggunakan panel lima penanda mikrosatelit, yaitu NR-21, BAT-26, BAT-25, NR-24, dan MONO-27.

Beberapa variasi perlakuan dilakukan untuk melihat ada tidaknya pengaruh perlakuan tersebut terhadap hasil *fragment analysis*. Pertama, dilakukan evaluasi apakah perbedaan volum produk PCR mempengaruhi tinggi rendahnya elektroferogram pada hasil *fragment analysis*. Pada tahap ini hanya menggunakan DNA jaringan dengan variasi volum 1 µl, 2 µl, dan dilusi 1:5. Jika terdapat perbedaan, maka asumsinya demikian juga pada DNA FFPE. Kedua, dilakukan elektroforesis terhadap DNA FFPE. Gel *agarose* yang digunakan adalah 2% dengan besar tegangan 100 Volt selama 30 menit. Volum DNA yang digunakan adalah 3 µl ditambah dengan 1 µl *loading dye*. Hasilnya dibaca menggunakan Gel Doc Biorad. Dalam hal ini, spesimen FFPE yang digunakan berasal dari beberapa laboratorium yang berbeda, sehingga proses pembuatan FFPE juga pasti berbeda. Oleh karena itu, hal ini dilakukan untuk mengetahui apakah variasi pada pemrosesan FFPE akan mempengaruhi kualitas DNA. Ketiga, variasi terhadap waktu injeksi pada alat. Waktu injeksi akan berpengaruh terhadap tinggi

rendahnya elektroferogram, sehingga optimasi dilakukan untuk memastikan bahwa ketinggian elektroferogram tidak melebihi ambang batas namun juga tidak terlalu pendek sehingga sulit untuk terbaca dengan jelas, terutama pada penanda penta C dan penta D. Data *fragment analysis* dianalisis menggunakan perangkat lunak *GeneMapper 4.0* (*Applied Biosystems, Foster City, California*).

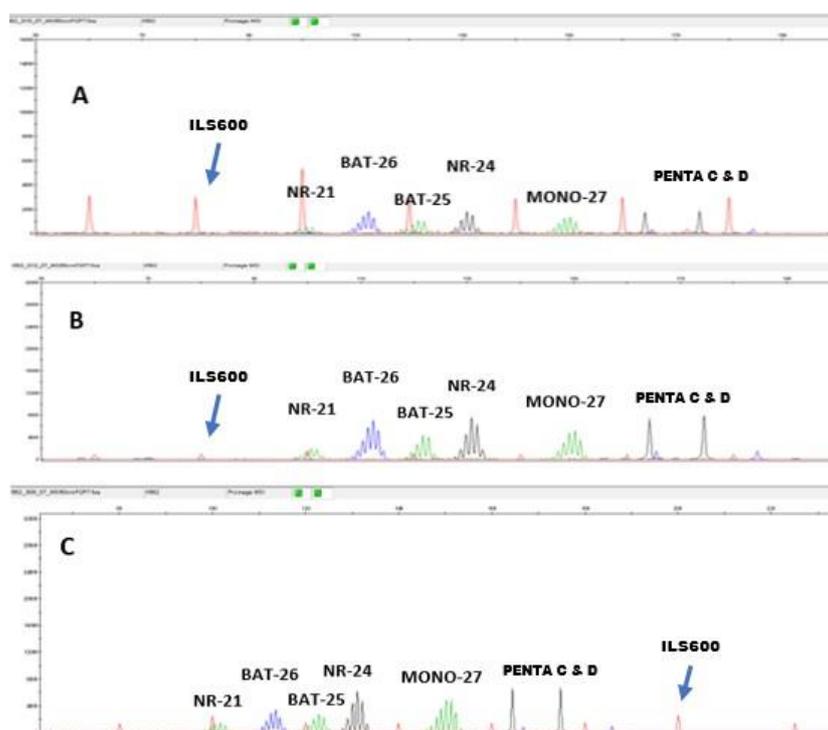
HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Optimasi

National Cancer Institute (NCI) merekomendasikan penilaian status MSI menggunakan PCR dengan panel lima penanda mikrosatelit. Panel dengan lima penanda mikrosatelit dianggap sebagai panel *gold standard* untuk deteksi MSI pada kanker (Baudrin, Deleuze, & How-Kit, 2018). Optimasi yang dilakukan pada penelitian ini yaitu:

a. Pengaruh Volum Produk PCR terhadap Hasil *Fragment Analysis*

Alat *genetic analyzer* memiliki batas deteksi yang bervariasi sehingga perlu dilakukan optimasi pada volum produk PCR yang digunakan saat melakukan *fragment analysis*. Hal ini dilakukan untuk mengetahui apakah perbedaan volum produk PCR dapat memengaruhi gambaran hasil *fragment analysis*. Variasi volum produk PCR yang digunakan untuk pembuatan *master mix fragment analysis* yaitu: pengenceran 1:5, 2 μ L, dan 1 μ L. Gambaran hasilnya ditampilkan pada gambar 1.



Gambar 1 Hasil *fragment analysis* (A) dengan input pengenceran 1:5, (B) dengan input 2 μ L, dan (C) dengan input 1 μ L (Sumber : Dokumentasi Pribadi)

Keterangan:

Peak merah: *Internal Lane Standard 600* (ILS 600)

Peak hitam dan biru (range 160 – 200): Penta C dan penta D

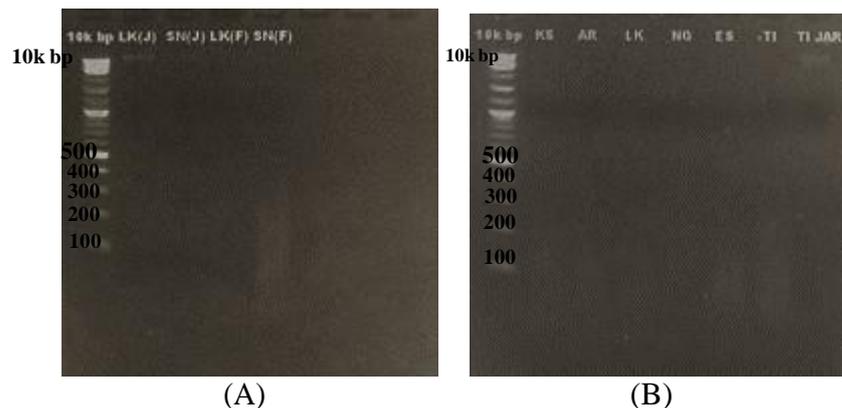
Berdasarkan gambar 1 dengan kode A, B, dan C didapatkan hasil

bahwa penggunaan volum produk PCR dengan pengenceran 1:5 memiliki *peak* yang paling pendek daripada volum lainnya. Penggunaan produk PCR sebanyak 1 μ L memiliki hasil yang hampir sama dengan 2 μ L. Sehingga pada penelitian ini deteksi MSI dengan DNA jaringan menggunakan produk PCR sebanyak 1 μ L dengan pertimbangan untuk efisiensi DNA.

b. Pengaruh Kualitas DNA dan Waktu Injeksi terhadap Hasil *Fragment Analysis*

1) Elektroforesis DNA FFPE

Untuk menunjang proses analisa oleh patologis, jaringan kanker biasanya diawetkan dalam formalin kemudian dibuat preparat berupa *formalin-fixed and paraffin-embedded* (FFPE). Salah satu manfaat dari sampel FFPE yang digunakan dalam analisis genomik molekuler penyakit kanker yaitu informasi yang didapat lebih akurat karena telah diketahui dengan pasti terkait status jaringan tersebut, yaitu benar-benar terdiagnosis kanker (Artha 2018). Proses pengawetan jaringan kanker menggunakan formalin bertujuan untuk meningkatkan waktu simpan jaringan kanker (Budiarto, 2018). Namun demikian jika digunakan untuk pemeriksaan molekuler, DNA yang berasal dari spesimen FFPE memiliki kualitas yang rendah dan telah terfragmentasi. Gambar 2 adalah hasil elektroforesis DNA yang diekstraksi dari spesimen FFPE.



Gambar 2 Hasil elektroforesis DNA FFPE (A) DNA FFPE sampel kode LK dan SN (B) DNA FFPE sampel kode KS, AR, LK, NG, ES, dan TI (Sumber : Dokumentasi Pribadi)

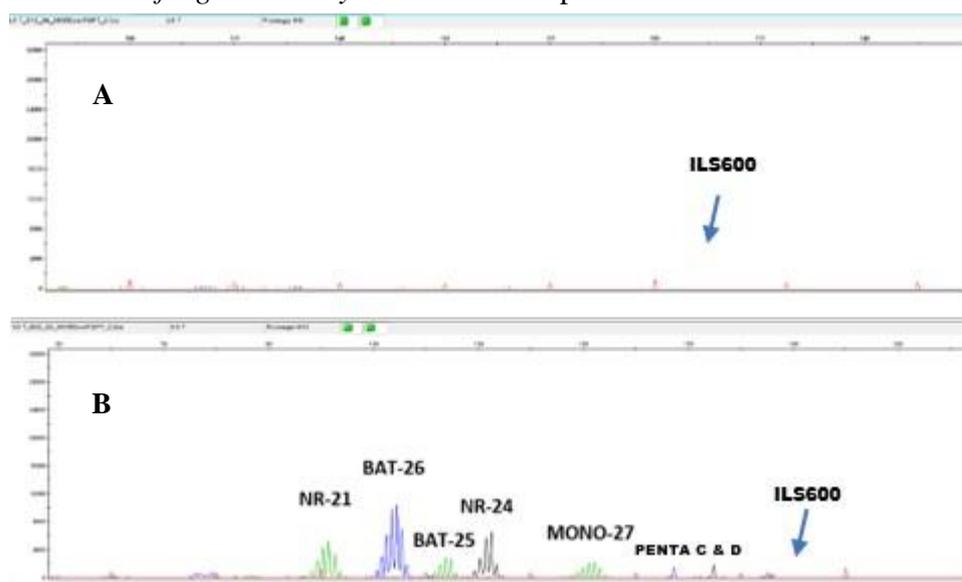
Berdasarkan gambar 2, hasil elektroforesis tidak menunjukkan adanya pita tunggal dan hanya terbentuk *smear* yang berupa bayangan berwarna putih. Sampel dengan kode LK, tidak menunjukkan adanya *smear* sekalipun, padahal pada sampel lainnya masih terlihat adanya *smear*.

DNA yang tidak tampak sebagai pita tunggal berarti menunjukkan bahwa DNA tersebut mengalami fragmentasi (*Aliyah *et al.* 2016). DNA yang utuh (tidak terfragmentasi) ditandai dengan tidak adanya *smear* (berbayang), pitaterlihat tebal dan jelas (Novitasari, Elvyra & Roslim, 2014). Berdasarkan analisis secara kualitatif ini terlihat bahwa DNA FFPE memiliki kualitas yang kurang baik untuk digunakan dalam pemeriksaan molekuler. Meskipun begitu, mikrosatelit merupakan sekuen yang sangat pendek sehingga cukup dengan DNA yang berukuran pendek, namun jika sangat pendek maka MSI juga tidak akan terbaca. Namun demikian, FFPE memiliki kualitas yang berbeda-beda,

karena proses pemrosesan FFPE juga berbeda-beda.

Beberapa hal yang dapat memengaruhi kualitas DNA dari FFPE adalah jenis larutan fiksatif yang digunakan dan durasi waktu saat melakukan fiksasi. Proses fiksasi merupakan hal yang harus dilakukan dalam pembuatan FFPE yang bertujuan untuk mempertahankan sel dan komponen jaringan seperti aslinya (Musyarifah & Agus, 2018). Pada saat pembuatan FFPE, tahapan fiksasi dapat sangat memengaruhi kualitas DNA. Hingga saat ini, eksplorasi terkait proses fiksasi yang baik untuk mempermudah pengamatan patologis sekaligus untuk analisis molekuler masih terus dilakukan. Durasi waktu dalam melakukan fiksasi juga menjadi hal yang sangat krusial. Durasi fiksasi yang terlalu singkat dapat membuat penetrasi larutan fiksatif belum maksimal sehingga makromolekul dalam jaringan tidak terpreservasi secara baik. Sedangkan durasi fiksasi yang terlalu lama dapat menyebabkan *cross-linking* yang parah sehingga proses ekstraksi DNA akan menjadi semakin sulit (Artha, 2018).

Penilaian kualitas DNA secara kualitatif dengan teknik elektroforesis sangat menentukan tingkat keberhasilan deteksi MSI. Telah dilakukan *fragment analysis* terhadap sampel kode LK dan KS. Sampel dengan kode LK merupakan sampel dengan hasil elektroforesis yang tidak terlihat sama sekali adanya pita, sedangkan sampel dengan kode KS memiliki hasil elektroforesis dengan pita *smear*. Berikut hasil *fragment analysis* dari dua sampel tersebut.



Gambar 3 Hasil *fragment analysis* DNA FFPE (A) spesimen dengan kode LK dan (B) spesimen dengan kode KS

Keterangan:

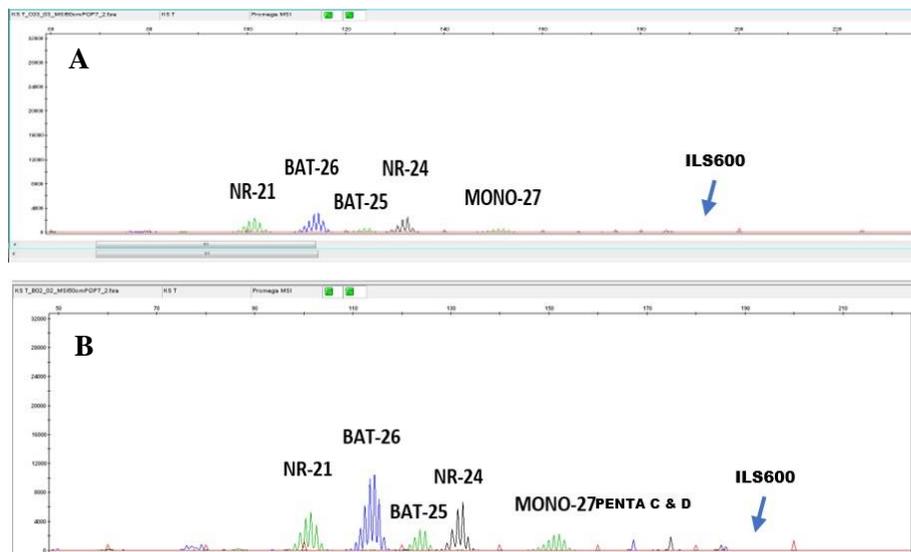
Peak merah: *Internal Lane Standard* 600 (ILS 600)

Peak hitam dan biru (range 160 – 200): Penta C dan penta D

Berdasarkan gambar 3 didapatkan hasil bahwa gambaran *fragment analysis* DNA FFPE dari sampel KS yang memiliki pita elektroforesis *smear* lebih baik daripada sampel LK yang tanpa pita elektroforesis. Hal ini menunjukkan bahwa deteksi MSI sebetulnya dapat dilakukan pada DNA yang terfragmentasi, namun jika ukuran fragmen DNA terlalu pendek atau bahkan tidak ada DNA maka deteksi MSI tidak lagi dapat dilakukan.

2) Pengaruh Waktu Injeksi

Waktu injeksi merupakan parameter penting yang dapat memengaruhi hasil *fragment analysis*. Waktu injeksi yang direkomendasikan adalah 3-22 detik. Pada penelitian ini dilakukan optimasi untuk DNA FFPE dengan menggunakan dua waktu injeksi yang berbeda yaitu, 8 detik dan 15 detik. Berikut ini adalah hasil *fragment analysis* dengan waktu injeksi 8 detik dan 15 detik.



Gambar 4 Hasil *fragment analysis* (A) waktu injeksi 8 detik dan (B) waktu injeksi 15 detik

Keterangan:

Peak merah: *Internal Lane Standard* 600 (ILS 600)

Peak hitam dan biru (range 160 – 200): Penta C dan penta D

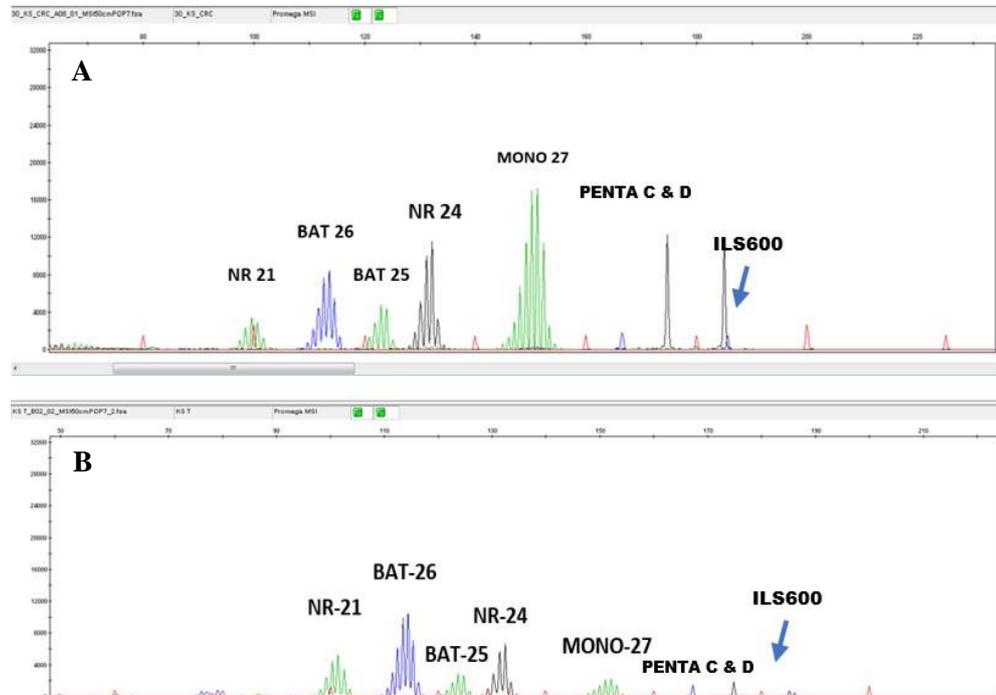
Berdasarkan gambar 4 didapatkan hasil bahwa deteksi MSI dengan waktu injeksi 15 detik lebih memberikan gambaran yang jelas daripada dengan menggunakan waktu 8 detik. Hal ini dapat terjadi karena dengan waktu injeksi sampel yang lebih sedikit (8 detik) sinyal terlalu lemah (Applied Biosystem, USA). Penambahan waktu injeksi menjadi 15 detik memberikan hasil *peak* dengan gambaran yang jelas dan tidak terbentuk *noise* yang mengganggu analisis (Westen *et al.* 2009). Berdasarkan hal tersebut, kondisi optimal deteksi MSI dengan DNA FFPE yaitu dengan menggunakan waktu injeksi 15 detik.

B. Kondisi Optimum *Fragment Analysis* Menggunakan DNA dari Spesimen Jaringan dan FFPE

Konsentrasi DNA yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2 ng untuk DNA jaringan dan 20 ng untuk DNA FFPE. Penggunaan DNA dalam konsentrasi berlebihan dapat menghasilkan *peak* yang terlalu tinggi sehingga melebihi jangkauan deteksi linier dari alat, sedangkan penggunaan konsentrasi DNA yang tidak mencukupi dapat menghasilkan *peak* yang terlalu pendek (Promega, 2012). Penggunaan DNA FFPE sebanyak 20 ng didasari alasan bahwa DNA FFPE memiliki kualitas yang rendah dan sangat terfragmentasi. Volum DNA jaringan dan DNA FFPE yang digunakan adalah sama, yaitu 2 μ L, sehingga total konsentrasi DNA masing-masing menjadi 4 ng untuk DNA

jaringan dan 40 ng untuk DNA FFPE.

Setelah dilakukan proses amplifikasi PCR menggunakan *thermal cycler* Biorad, hasil produk PCR dianalisis menggunakan *fragment analysis*. Waktu injeksi yang digunakan untuk deteksi MSI dari DNA jaringan adalah 8 detik, sedangkan untuk DNA FFPE adalah 15 detik. Berikut hasil *fragment analysis* dari sampel pada kondisi tersebut.



Gambar 5 Hasil *fragment analysis* (A) DNA spesimen jaringan kode KS dan (B) DNA spesimen FFPE kode KS (Sumber : Dokumentasi Pribadi)

Keterangan:

Peak merah: *Internal Lane Standard* 600 (ILS 600)

Peak hitam dan biru (range 160 – 200): Penta C dan penta D

Berdasarkan gambar 5 dapat disimpulkan bahwa pemeriksaan MSI dapat dilakukan dengan menggunakan DNA yang berasal dari jaringan maupun FFPE, namun DNA jaringan dapat memberikan gambaran hasil yang lebih baik daripada DNA FFPE. Hal ini disebabkan jaringan memiliki kualitas DNA yang lebih baik daripada FFPE (Artha, 2018). Namun demikian, gambaran hasil *fragment analysis* dari DNA FFPE juga masih dapat terbaca dengan jelas dan dapat diinterpretasikan hasil status MSI-nya. Meskipun begitu, memang pemeriksaan status MSI menggunakan spesimen FFPE akan membutuhkan DNA dengan konsentrasi yang lebih tinggi serta waktu injeksi yang lebih lama daripada DNA jaringan.

C. Kesalahan saat melakukan *fragment analysis*

a. *Sizing* yang gagal

Sizing gagal biasanya diberi keterangan “*No sizing data*”, dan ditandai juga dengan simbol *octagon* merah pada *sizing quality*. Kegagalan ini dapat disebabkan karena gagalnya proses injeksi atau tidak adanya sampel yang masuk

DAFTAR RUJUKAN

- Aliyah, S. H. 2016. Deteksi Infeksi Human Papillomavirus (HPV) 16/18 Pada Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut Dengan Nested PCR. *Jurnal Ipteks Terapan*. (Online), Jilid 10, No. 1, hlm. 25-33, (<http://ejournal.ildikti10.id>), diakses 5 Juni 2022
- Artha, A. D. 2018. *Optimalisasi Metode Isolasi DNA dari Sampel FormalinFixed, Paraffin-Embedded (FFPE) Pasien Triple Negative Breast Cancer untuk Next-Generation Sequencing*. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya. Malang.
- Baudrin, L. G., Deleuze, J. F., & How-Kit, A. 2018. Molecular and computational methods for the detection of microsatellite instability in cancer. *Frontiers in Oncology*. (Online), Vol. 8, (<https://www.frontiersin.org>), diakses 4 Juni 2022
- Budiarto, B. R. 2018. Kaitan genotyping errors dengan performa diagnostik molekuler kanker berbasis amplifikasi asam nukleat. *Biodidaktika: Jurnal Biologi dan Pembelajarannya*. (Online), Jilid 13, No. 2, (<http://jurnal.untirta.ac.id>), diakses 30 Mei 2022
- Gian, L. D. A., Lorena, B., Cinzia, A., Gioacchino, L., Federica, G., & Francesca, N. 2018. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Bio Medica: Atenei Parmensis*. (Online), Jilid 89, No. Suppl 9, hlm. 97-101, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), diakses 4 Juni 2022
- Kamat, N., Khidhir, M. A., Alashari, M. M., & Rannug, U. 2013. Microsatellite instability and loss of heterozygosity detected in middle-aged patients with sporadic colon cancer: A retrospective study. *Oncology letters*. (Online), Jilid 6, No. 5, hlm. 1413-1420, (<https://www.spandidos-publications.com>), diakses Maret 2022
- McCord, B. 2003. Troubleshooting capillary electrophoresis systems. *Profiles in DNA*. (Online), Jilid 6, No. 2, hlm. 10-12, (<https://www.researchgate.net>), diakses 16 Juni 2022
- Musyarifah, Z., & Agus, S. 2018. Proses fiksasi pada pemeriksaan histopatologik. *Jurnal Kesehatan Andalas*. (Online), Jilid 7, No. 3, hlm. 443-453, (<http://jurnal.fk.unand.ac.id>), diakses 5 Juni 2022
- Novitasari, D. A., Elvyra, R., & Roslim, D. I. 2014. *Teknik Isolasi Dan Elektroforesis DNA Total Pada Kryptopterus apogon (Bleeker 1851) dari Sungai Kampar Kiri Dan Tapung Hilir Kabupaten Kampar Provinsi Riau*. Disertasi. Universitas Riau.
- Pastore, M., & del Vaglio, M. 2015. Role of the No Template Control samples in the selection of primers to quantify 'Candidatus phytoplasma pyri' by qPCR assays. *Phytopathogenic Mollicutes*. (Online), Jilid 5, No. 1, hlm. 1-8, (<https://www.indianjournals.com>), diakses 21 Juni 2022
- Rompis, A. Y., & Nyoman, A. D. N. 2020. Aspek Genetik Kanker Kolorektal. *Jurnal Sains dan Kesehatan*. (Online), Jilid 2, No. 3, hlm. 236- 245, (<https://jsk.farmasi.unmul.ac.id>), diakses 28 Januari 2022
- Sayuti, M., & Nouva, N. 2019. Kanker Kolorektal. *AVERROUS: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Malikussaleh*. (Online), Jilid 5, No. 2, hlm. 76- 88, (<https://ojs.unimal.ac.id>), diakses pada 28 Januari 2022

- Wang, J. H., Gouda-Vossos, A., Dzamko, N., Halliday, G., & Huang, Y. 2013. DNA extraction from fresh-frozen and formalin-fixed, paraffinembedded human brain tissue. *Neuroscience bulletin*. (Online), Jilid 29, No. 5, hlm. 649-654, (<https://link.springer.com/article/10.1007/s12264-013-1379-y>), diakses 2 Februari 2022
- Westen, A. A., Nagel, J. H., Benschop, C. C., Weiler, N. E., De Jong, B. J., & Sijen, T. 2009. Higher capillary electrophoresis injection settings as an efficient approach to increase the sensitivity of STR typing. *Journal of forensic sciences*. (Online), Jilid 54, No. 3, hlm. 591-598, (<https://onlinelibrary.wiley.com>), diakses 16 Juni 2022