

KAITAN *GENOTYPING ERRORS* DENGAN PERFORMA DIAGNOSTIK MOLEKULER KANKER BERBASIS AMPLIFIKASI ASAM NUKLEAT

Bugi Ratno Budiarto¹, Henny Widyowati¹ dan Desriani¹

¹Research Center for Biotechnology, Indonesian Institute of Sciences (LIPI)
Jl. Raya Bogor km. 46 Cibinong, Bogor Jawa Barat, 16911, Indonesia

ABSTRAK

Aplikasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dewasa ini telah berkembang cukup pesat yang semula fungsinya hanya untuk memperbanyak fragmen DNA saja. PCR telah digunakan dalam dunia kedokteran sebagai pendeteksi suatu penyakit seperti kanker. Metode deteksi berbasis memperbanyak asam nukleat ini walaupun sudah diklaim memiliki tingkat akurasi deteksi yang cukup tinggi namun eror masih sering dijumpai pada banyak metode deteksi PCR bahkan pada sistem berbasis *high-throughput* sekalipun. Hal ini menyebabkan data yang didapatkan kurang begitu dipercaya kebenarannya sehingga berdampak sangat signifikan pada kualitas penanganan pasien oleh dokter. Untuk itu, mengetahui penyebab eror PCR dan langkah-langkah eliminasinya menjadi tahapan penting dalam pengembangan metode deteksi molekuler berbasis PCR ini. Pada mini review ini dijelaskan faktor-faktor penyebab timbulnya eror PCR, jenis eror PCR, strategi untuk menghilangkan eror PCR serta implikasi eror PCR pada akurasi deteksi molekuler kanker.

Kata kunci: *Polymerase Chain Reaction*, *genotyping errors*, amplifikasi asam nukleat.

PENDAHULUAN

Teknologi deteksi berbasis amplifikasi DNA atau dikenal dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) saat ini sudah sedemikian maju. Hanya dalam kurun waktu kurang dari setengah abad sejak ditemukan pertama kali teknologi memperbanyak DNA secara *in vitro* oleh kary B. Murris PCR telah bertransformasi ketahapan yang lebih canggih. Teknologi PCR tidak hanya digunakan untuk tujuan kloning gen saja tetapi sudah dipakai untuk diagnostik molekuler penyakit yang erat kaitannya dengan era modern dewasa ini yaitu kanker. Format teknologi yang sedang berkembang untuk deteksi kanker berbasis PCR saat ini dimungkinkan elusidasi gen-gen yang terlibat dalam karsinogenesis untuk pengembangan terapeutik baru maupun cara baru dalam pengobatan kanker. Bergantung pada kesukaran gen yang dianalisa, deteksi gen bisa dilakukan secara tunggal ataupun simultan di dalam satu reaksi sekaligus dan proses deteksinya bisa dilakukan dengan cepat melalui pendekatan *high-throughput* yang cukup populer untuk deteksi faktor prediktif dan prognosis kanker yang melibatkan banyak cuplikan. Namun demikian, improvisasi teknologi ini tidak selalu dibarengi dengan rendahnya eror. Banyak studi terkait asosiasi gen terhadap resiko kanker menggunakan platform PCR dijumpai banyak

eror pada data yang ditampilkannya. Hal umum yang menjadi pemicu eror karena hasil analisa PCR menunjukkan positif palsu atau negatif palsu sehingga menyebabkan klasifikasi data yang salah. Dampak signifikan dari eror PCR pada studi asosiasi gen penyebab kanker yaitu banyak kandidat-kandidat gen yang sebenarnya tidak memberikan kontribusi pada patogenesis penyakit ini diklaim memiliki potensi sebagai kandidat biomarker kanker. Hal tersebut secara ekonomi menjadi tidak efektif dikarenakan pengalokasian anggaran penelitian untuk pengembangan kandidat obat atau diagnostik yang seharusnya tidak perlu.

Faktor-faktor penyebab eror PCR

Eror PCR bisa dipicu dari berbagai macam sumber. Sumber yang berbeda menghasilkan penyebab eror PCR yang berbeda pula. Secara umum seluruh aktivitas terkait analisa gen menggunakan metode PCR seperti teknik isolasi material genetika, memperbanyak material genetika dan deteksi bisa menjadi pemicu eror (El-Hashemite and Delhanty, 1997; El Bali *et al.*, 2014; Hosking *et al.*, 2004; McInerney *et al.*, 2014; Tajadini *et al.*, 2015). Analisa gen penyebab kanker umumnya menggunakan darah, saliva, urine, sel-sel bukal, rambut, atau jaringan kanker sebagai sumber material genetika dimana kondisi sub-optimal seperti

aplikasi ekstraksi material genetika yang tidak tepat berpotensi membawa kontaminan ke dalam proses PCR (Siravegna and Bardelli, 2016; Meng *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2012; Ng *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 2007; Berz *et al.*, 2016; Koutros *et al.*, 2012). Antibodi, enzim, dan hormon serta golongan non-protein seperti karbohidrat, lipid dan metabolit merupakan Kontaminan-kontaminan yang berpotensi terbawa pada saat PCR sehingga mengganggu kerja enzim polimerase dalam dua cara yaitu menghambat secara total kerja enzim sehingga tidak ada produk PCR yang dihasilkan atau menurunkan spesifitas enzim dalam mengenali gen targetnya sehingga didapatkan produk PCR yang tidak spesifik (Al-soud *et al.*, 2000; Huggett *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2014; Davaliev and Efremov, 2010). Tiap sumber material genetika membawa kontaminasi yang berbeda sehingga perlakuan spesifik untuk menghilangkan kontaminan sebelum material genetika bisa digunakan untuk PCR menjadi langkah penting. Selain kontaminasi, dua faktor lain yang bisa menyumbang pada eror PCR yaitu integritas dan kuantitas material genetika. Beberapa laporan menyebutkan bahwa material genetika yang sudah terdegradasi bisa menurunkan derajat sensitivitas deteksi dikarenakan tidak optimumnya penempelan primer pada gen sasaran yang berdampak pada tidak bekerjanya enzim taq polimerase (Baak-pablo *et al.*, 2010; Sjöholm *et al.*, 2005). Kuantitas material genetika yang rendah biasanya memicu eror PCR dikarenakan efek stokastik selama proses perbanyak material genetika berlangsung (Weiler *et al.*, 2012).

METODE PENELITIAN

a. Sumber material genetika

Trend saat ini dalam analisa biomarker penyebab kanker yaitu menggunakan darah atau dikenal dengan *liquid biopsy* sebagai cara efektif dalam mengetahui status pasien lebih dini atau menganalisa keefektifan suatu obat antikanker melalui identifikasi material genetika yang bersirkulasi dalam komponen darah. Kim *et al.* (2012) telah mengidentifikasi faktor-faktor endogenus darah dan antikoagulan seperti heparin yang digunakan pada saat pengambilan plasma yang terbawa saat purifikasi berpengaruh nyata dalam menghambat kerja enzim reverse

transkriptase dalam memperbanyak mikroRNA penyebab kanker. Hal ini menyebabkan perhitungan mikroRNA menjadi bias dan beresiko menjadi penyebab eror. Untuk menanggulangnya beberapa strategi telah diterapkan seperti pada tahapan pre-PCR dimana (1) plasma atau serum ditambahkan heparinase kemudian dilakukan isolasi RNA dengan metode trIzol phenol/chloroform diikuti oleh absorpsi silika, atau (2) mengurangi volume plasma sebelum dilakukan ekstraksi, tahapan PCR (1) mengganti Taq Polymerase dengan jenis mutan seperti Hemo KlenTaq polymease yang lebih resisten terhadap inhibitor atau (2) menggabungkan Hemo KlenTaq polymease dengan intact Taq polymerases dalam bentuk *cocktail*. *Liquid biopsy* menggunakan metode quantitative allele specific Real-Time PCR yang telah dilakukan oleh Wu *et al.* (2017) pada pasien kanker paru dalam mendeteksi mutasi gen EGFR mengindikasikan adanya perbedaan hasil analisa mutasi dari DNA yang isolasi dari plasma *versus* serum dimana persentasi mutasi EGFR yang tinggi ditemukan pada plasma. Hal tersebut diduga karena perlakuan darah dengan penambahan proteinase K pada saat pengambilan plasma bisa meningkatkan deteksi mutasi melalui penghilangan kontaminasi. Bahkan perbandingan 6 jenis kit komersial untuk isolasi DNA asal sirkulasi darah menggunakan plasma versus serum diketahui bahwa plasma sebagai sumber material genetika bisa lebih bisa dipercaya (*reliable*) untuk tujuan *liquid biopsy* (Re *et al.*, 2008). Rendahnya tingkat akurasi deteksi material genetika asal serum juga didukung oleh Hoque *et al.* (2008) yang membandingkan material genetika yang diambil dari dua sumber yang berbeda diujikan pada platform teknologi SNP diberbagai laboratotium diketahui bahwa material genetika asal sel darah putih memberikan hasil deteksi gen polimorfisme kanker prostat yang dapat dipercaya dan keterulangan data yang cukup bagus pada beberapa flatform teknologi SNP berbasis *multiplexing high-throughput* dibandingkan material genetika asal serum. Error data yang dihasilkan antara laboratorium yang diujikan pada material genetika asal serum disebabkan oleh kontaminasi hormon pada sample material genetika yang digunakan.

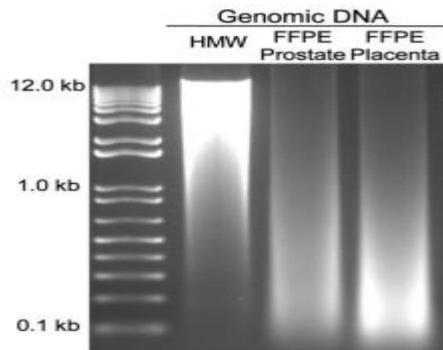
Selain darah, urin bisa digunakan sebagai alternatif untuk tujuan *liquid biopsy* seperti pada kanker kandung kemih. Komponen urin

sangat unik berbeda dari darah. Urin mengandung senyawa-senyawa hasil metabolisme tubuh yang dibuang melalui ginjal seperti amoniak, atau protein seperti nuclease pada patogenesis tertentu. Pada urin pasien kanker sering ditemukan sel-sel kanker sehingga pemilihan metode ekstraksi yang tepat akan sangat menentukan akurasi deteksi *liquid biopsy* menggunakan material genetika asal urin. El Bali *et al.* (2014) telah melaporkan pentingnya mengevaluasi keberadaan kontaminan pada DNA asal urin setelah proses ekstraksi menggunakan kit komersial. Pada laporannya dipaparkan setidaknya ada dua pendekatan yang bisa dilakukan untuk mendeteksi keberadaan kontaminan pada material genetika yaitu dengan menghitung rasio absorbansi 260 terhadap absorbansi 280 dimana rasio <1.8 mengindikasikan adanya kontaminasi protein, fenol atau senyawa kimia yang dipakai selama proses ekstraksi berlangsung, atau >2 adanya kontaminasi RNA. Pendekatan kedua yaitu menggunakan metode Real-Time PCR dengan menghitung perbedaan nilai C_q cetakan DNA tanpa pengenceran terhadap cetakan DNA dengan pengenceran 10 kali dari hasil amplifikasi gen β -globin asal manusia dari sampel yang sama. Sample bebas dari kontaminan akan memberikan nilai ΔC_q sebesar 3.3 ± 0.5 dengan asumsi bahwa kurva standar yang ditunjukkan dari hasil amplifikasi amplifikasi gen β -globin memberikan efisiensi $\pm 100\%$. Penelitian ini menekankan bahwa kit komersial sekalipun tidak menjamin terbebasnya material genetika dari kontaminasi baik yang dibawa dari urin itu sendiri maupun dari bahan-bahan kimia yang dipakai selama proses ekstraksi berlangsung sehingga tahapan evaluasi kontaminan setelah proses ekstraksi DNA menjadi proses yang tidak bisa dipisahkan. Material genetika selain DNA yang bisa diisolasi dari urin yaitu RNA. Teknik isolasi untuk jenis asam nukleat ini memerlukan strategi tersendiri dikarenakan waktu paruh yang rendah akibat degradasi secara enzimatis oleh nuklease yang terdapat pada urin (Menke and Warnecke, 2004). Hanke *et al.* (2007) telah melaporkan suatu metode ampuh yang mampu menghilangkan nuklease dari urin untuk mendapatkan hasil isolasi RNA yang berkualitas bagus. Dalam penelitiannya dilaporkan bahwa penambahan serbuk guanidinium tiosianat ke dalam urin bisa

meningkatkan resistensi RNA dari nuklease sehingga sangat membantu dalam penemuan biomarker baru *urokinase plasminogen aktivator* penyebab kanker kandung kemih.

Diagnostik molekuler kanker berbasis asam nukleat mengharuskan penggunaan material genetika berkualitas yang bagus. Ada tiga parameter untuk menguji kualitas suatu material genetika yaitu (1) integritas material genetika, (2) kuantitas material genetika, dan (3) kemurnian material genetika. Analisa gen penyebab suatu kanker bisa menggunakan jaringan biopsi kanker (*invasive procedure*) atau cairan tubuh (urin, saliva, dan darah) (*non-invasive procedure*) dimana kedua prosedur tersebut sering mempengaruhi tiga parameter dari kualitas material genetika yang akan dianalisa. Dibandingkan *non-invasive procedure*, pemakaian jaringan biopsi dalam bentuk sediaan preparat jaringan untuk keperluan diagnostik masih banyak dipraktikkan dewasa ini oleh banyak patologis. Faktor keterbatasan ukuran jaringan kanker hasil biopsi dan kemudahan proses analisa oleh patologis, umumnya jaringan kanker akan diawetkan dalam formalin kemudian dibuatkan preparat jaringan dengan teknik FFPE (*Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded*) (Gjerdrum *et al.*, 2004). Proses pengawetan jaringan kanker menggunakan formalin bertujuan untuk meningkatkan waktu simpan jaringan kanker. Namun demikian, praktek tersebut menimbulkan reaksi kimia yang bersifat destruktif terhadap integritas material genetika itu sendiri dan penggunaan DNA asal preparat FFPE sebagai cetakan untuk diagnostik berbasis amplifikasi asam nukleat sering dijumpai inkonsistensi data. Diagnostik eror akibat pemakaian DNA asal preparat jaringan FFPE sangat terkait dengan pemilihan jenis penyangga (formalin, etanol absolute, aseton) dan lamanya proses fiksasi jaringan kanker. Ce *et al.* (1991) telah melaporkan performa PCR menggunakan cetakan DNA asal jaringan yang difiksasi dengan penyangga etanol 95% lebih baik dibandingkan cetakan DNA asal jaringan yang difiksasi dalam penyangga formalin pada durasi waktu yang sama. Hal ini disebabkan karena etanol 95% tidak begitu bersifat destruktif terhadap DNA. Dietrich *et al.* (2013) telah mengidentifikasi pola pita DNA hasil ekstraksi asal jaringan kanker prostat dan plasenta dari preparat jaringan FFPE. Berbeda dari pita DNA asal

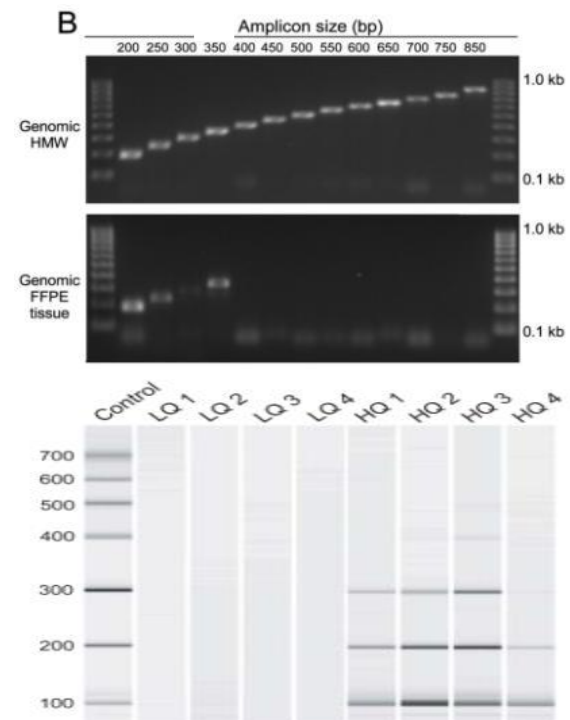
jaringan yang tidak diawetkan, pita DNA dari kedua jaringan yang telah diawetkan dalam formalin menunjukkan pola *smear* yang menunjukkan adanya degradasi DNA (Gambar 1).



Gambar 1. Pola pita DNA hasil isolasi dari preparat jaringan FFPE (Dietrich *et al.*, 2013)

Asesibilitas DNA asal preparat jaringan FFPE untuk diagnostik berbasis amplifikasi DNA bisa dilakukan dengan pendekatan kualitatif atau kuantitatif. Pendekatan pertama yaitu dengan metode *singleplex end-point* PCR menggunakan beberapa pasang primer dengan target fragmen DNA yang berbeda (200 -850 bp) pada satu target gen yang sama. Hasil analisa PCR dari gen target menggunakan templat DNA asal preparat jaringan FFPE hanya mampu mendeteksi fragmen gen maksimal sampai 350 bp (Gambar 2A). *Multiplex end-point* PCR merupakan pendekatan pertama yang lainnya dimana pasangan primer yang berbeda dicampurkan dalam satu reaksi yang sama dengan hasil analisa PCR hampir mirip dengan *singleplex end-point* PCR yaitu DNA asal FFPE hanya mampu diperbanyak untuk fragmen-fragmen DNA yang ukurannya kurang dari 300 bp (Gambar 2B) Adapun metode kuantitatif PCR untuk analisa fragmentasi DNA yaitu melalui perhitungan perbedaan nilai Ct (*threshold cycle*) antara hasil PCR fragmen DNA asal preparat jaringan FFPE dengan fragmen DNA kontrol yang sama. Semakin jauh Δ Ct yang dihasilkan maka tingkat fragmentasi DNA semakin tinggi. Dibandingkan dengan dua metode kualitatif, analisa integritas DNA dengan qPCR jauh lebih sensitif. Akibat rendahnya integritas DNA dari preparat jaringan FFPE ini eror PCR akan sering dijumpai pada analisa fragmen-fragmen gen

berukuran besar (>400 bp) sehingga aplikasi DNA asal preparat FFPE untuk diagnostik PCR yang sifatnya multiplex atau quantitatif harus mempertimbangkan (1) ukuran gen yang akan dianalisa secara cermat serta (2) kondisi terbaik untuk proses PCR sehingga fragmen gen yang menjadi sasaran dapat diamplifikasi dengan spesifik (Dietrich *et al.*, 2013; Sikora *et al.*, 2010).



Gambar 2. Metode kualitatif untuk mengetahui kualitas DNA asal preparat jaringan FFPE (Dietrich *et al.*, 2013; Sikora *et al.*, 2010)

Selain disebabkan oleh rendahnya integritas DNA, kuantitas DNA hasil isolasi dari preparat FFPE yang sangat sedikit sangat berpengaruh signifikan pada inkonsistensi hasil deteksi genotipe dengan metode PCR. Cara praktis untuk mengatasi kendala tersebut, biasanya dilakukan penambahan cetakan DNA pada reaksi PCR namun cara demikian justru memperburuk hasil PCR yang didapatkan. Ada beberapa strategi untuk meningkatkan asesibilitas DNA asal preparat jaringan FFPE yang berkuantitas rendah mulai dari (1) melakukan strategi pre-amplifikasi gen target, (2) penetapan jumlah kualitas DNA terukur (*Amplification-Quality* DNA). Baak-pablo *et al.* (2010) telah memamparkan bagaimana metode pre-amplifikasi gen target bisa meningkatkan

ketangguhan genotiping dari beragam SNP yang berbeda dari DNA asal preparat FFPE. Secara teknis, DNA asal FFPE *silde* akan dilakukan perbanyakan terlebih dahulu menggunakan primer spesifik gen menggunakan teknik konvensional PCR sebelum analisa genotiping dilakukan dengan *Taqman-based Real-Time PCR*. Tujuan penambahan langkah Pre-amplifikasi pada analisa genotiping yaitu untuk memperbanyak salinan gen target pada DNA yang mungkin mengalami degradasi akibat perlakuan pada proses pengawetan dan fiksasi sehingga meningkatkan peluang gen target untuk dideteksi pada saat amplifikasi sebenarnya menggunakan *Taqman genotyping assay*. Asesibilitas DNA asal preparat FFPE setelah pre-amplifikasi ditandai dengan menurunnya nilai Ct dari target gen yang semula pada kisaran ± 35 menjadi ± 15 . Keluaran PCR menjadi lebih terpercaya dengan callrate untuk hampir semua jenis SNP yang diujikan hampir mendekati 100%. Sikora *et al.* (2010) telah mengembangkan metode penetapan jumlah kualitas DNA terukur atau disebut dengan AQ-DNA (*Amplification-Quality DNA*) menggunakan fragmen gen terstandar sebelum cuplikan DNA asal preparat jaringan FFPE dilakukan diagnosis. AQ-DNA ditetapkan melalui qPCR dari fragmen gen GAPDH berukuran ± 100 bp yang berasal dari pengenceran berseri DNA berkualitas tinggi kemudian Ct dari masing-masing pengenceran tersebut di ekstrapolasi terhadap bobot DNANYa untuk mendapatkan regresi linier. Ct dari masing-masing qPCR cuplikan DNA preparat FFPE dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier untuk ditetapkan nilai AQ-DNANYa. Metode ini sangat ampuh dalam mengurangi kemungkinan eror PCR pada saat genotiping suatu gen menggunakan DNA dari preparat FFPE.

Kendala lain yang menyebabkan eror PCR yaitu kemurnian DNA asal preparat FFPE yang rendah. *Paraffin* merupakan penyebab rendahnya kemurnian DNA hasil ekstraksi dari preparat FFPE bahkan penggunaan kit ekstraksi DNA komersial sekalipun tidak benar-benar menjamin 100% terbebasnya DNA dari senyawa kimia lilin ini (Sengüven *et al.*, 2014; Janecka *et al.*, 2015). Oleh sebab itu, modifikasi ekstraksi DNA pada tahapan penghilangan *Paraffin* menjadi penting. Ada beberapa teknik untuk menghilangkan pengotor *Paraffin* dari

preparat jaringan PPFE seperti penambahan senyawa kimia tertentu, atau perlakuan fisika. Secara teknis, kombinasi perlakuan merupakan cara paling disukai untuk mendapatkan jumlah DNA dari preparat FFPE dengan tingkat kemurnian yang cukup tinggi (Bonin and Stanta, 2013). Penambahan *xylene absolute* pada tahapan pre-ekstraksi DNA asal preparat FFPE merupakan cara klasik yang banyak sudah banyak diterapkan dibanyak laboratorium patologi (Pikor *et al.*, 2011). *Xylene* memiliki derajat polaritas yang cukup rendah sehingga sangat efektif untuk menghilangkan lilin dari preparat FFPE. Namun demikian, perlakuan preparat FFPE hanya dengan *xylene* saja tidak cukup menghilangkan Paraffin dari jaringan FFPE sehingga beberapa modifikasi perlu ditambahkan untuk meningkatkan efektivitas defarafinasi seperti menambahkan perlakuan dengan tween-20 yang dikombinasikan dengan perlakuan suhu (Alvarez-aldana *et al.*, 2015). Penelitian terbaru telah membuktikan bahwa perlakuan jaringan FFPE dengan air panas bisa menggantikan defarafinasi FFPE oleh *xylene* seperti ditunjukkan oleh Mansour *et al.*, (2014) dalam deteksi protein aktin dan AKT. Mereka berargumen bahwa perlakuan panas dalam waktu singkat (95°C selama 2-3 menit) dapat melelehkan paraffin tanpa merusak struktur protein target. Selain itu suhu tinggi juga dapat mengakselerasi pemutusan ikatan silang yang terbentuk akibat proses fiksasi. Prinsip tersebut kemudian telah diterapkan untuk isolasi DNA asal preparat FFPE dimana kemurnian DNA yang didapat cukup bagus pada kisaran 1.65 (Kalantari *et al.*, 2016). Namun demikian metode alternatif ini belum ada laporan dampaknya pada aplikasi deteksi perubahan basa DNA dengan metode amplifikasi asam nukleat.

b. Amplifikasi material genetika

Potensi eror PCR pada saat genotiping bisa disebabkan oleh faktor-faktor yang terlibat langsung dalam proses amplifikasi material genetika seperti kondisi PCR, primer, larutan penyangga, dan jenis enzim polymerase (Lorenz, 2012). Suhu merupakan elemen penentu dalam keberhasilan amplifikasi material genetika dengan metode PCR. Suhu yang tepat untuk proses denaturasi sempurna dari material genetika ataupun amplicon, penempelan primer pada fragmen gen sasaran dan polimerasi material genetika oleh enzim

polimerase perlu dipilih dengan seksama untuk menghindari eror PCR. Umumnya suhu 95°C sudah cukup untuk proses denaturasi material genetika maupun amplicon pada proses PCR (Roux, 2009). Namun, pada kondisi tertentu dimana amplicon mengandung komposisi basa guanin (G) dan sitosin (C) yang cukup tinggi atau amplicon membentuk suatu struktur geometris tertentu (G4-quadruplex, *stem-loop*) penggunaan suhu standar (95°C) untuk denaturasi menjadi tidak optimal lagi yang bisa menyebabkan proses perbanyakan gen target terhambat dan memicu kegagalan PCR. Menaikan suhu denaturasi sebesar 1°C, atau menambahkan enhancer seperti betaine merupakan dua strategi yang digunakan untuk mengurangi eror PCR yang diakibatkan oleh dua kondisi tersebut. Amplicon dengan komposisi basa G dan C yang tinggi memiliki jumlah ikatan hidrogen yang cukup untuk menstabilkan duplex DNA sehingga dibutuhkan kalor yang lebih besar untuk memutuskan ikatan hidrogen agar pemisahan dua utas DNA bisa terjadi secara sempurna. Sedangkan betaine bisa menurunkan suhu yang dibutuhkan oleh DNA untuk terdenaturasi setengahnya (*melting temperature*) sehingga pada suhu denaturasi standar (95°C) amplicon dengan komposisi basa G dan C yang tinggi bisa terdenaturasi sempurna (Wenzel *et al.*, 2009; Henke *et al.* 1997; Rees *et al.* 1993; Kieleczawa and Mazaika, 2010).

Optimasi perlu dilakukan juga dalam menentukan suhu penempelan primer pada saat PCR. Untuk tujuan genotiping berbasis PCR penentuan suhu ini menggunakan gradien suhu PCR atau disebut dengan teknik PCR *gradient*. Teknik ini digunakan untuk mendapatkan suhu penempelan terbaik dari primer gen sasaran yang membawa varian polimorfisme yang ditandai dengan spesifitas hasil amplifikasi yang cukup jelas untuk semua varian alel yang diujikan. Pendekatan ini telah berhasil diaplikasikan untuk genotiping polimorfisme kodon I655V gen HER2 penyebab kanker payudara pada wanita (Bugi Ratno Budiarto dan Desriani, 2016). Karena kebanyakan teknik genotiping berbasis PCR untuk deteksi perubahan basa nukleotida pada jenis kanker tertentu menggunakan multi-primer spesifik alele maka optimasi kondisi PCR untuk menentukan suhu terbaik penempelan primer menggunakan teknik PCR gradien adalah

langkah yang tepat (Casado-díaz *et al.*, 2007; Seekhntod *et al.*, 2016).

Primer harus dirakit dengan seksama menggunakan kaidah perakitan primer yang benar. Parameter dalam perakitan primer yang digunakan untuk tujuan PCR genotiping akan berbeda dengan primer-primer yang digunakan untuk amplifikasi gen saja. Primer untuk tujuan genotiping akan dirakit berdasarkan pola basa nukleotida yang mengalami perubahan pada suatu gen atau fragmen DNA dan pemilihan basa yang disalahpasangkan (*missmatch bases*) pada basa-basa primer nomor 2 atau 3 dari ujung 3 disamping aspek *GC content*, panjang urutan basa, kemungkinan terbentuknya *self-complementary*, temperature leleh (T_m) primer dan konsentrasi garam. Ketepatan pemilihan basa nukleotida pada ujung 3 dari primer untuk deteksi perubahan basa nukleotida sangat menentukan dalam mengurangi eror PCR seperti hasil PCR positif palsu ataupun negatif palsu. Pemilihan basa nukleotida pada ujung 3 dari primer telah dipaparkan oleh Bui dan Liu (2009) secara lengkap. Prinsip pemilihan basa ini didasarkan pada konsep destabilitas yang mungkin terjadi antara basa primer yang dipasangkan. Satu jenis basa pada ujung 3 primer *forward* akan ditetapkan sedemikian rupa sehingga mengenali alel tipe *wild* sedangkan pada primer *forward* yang sama pada ujung 3-nya akan ditetapkan basa sehingga mengenali alel tipe *mutant*. Untuk meningkatkan sensitifitas deteksi pada basa nomor 3 dari ujung 3 primer *forward* umumnya dilakukan pemasangsalahan basa seperti yang disarankan oleh Liu *et al.* (2012). Teknik *allele-specific amplification* ini telah banyak diaplikasikan untuk deteksi perubahan basa nukleotida baik dalam bentuk format *monoplex* maupun *multiplex genotyping* (Seekhntod *et al.*, 2016; Myakishev *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2011). Saat ini dengan semakin majunya ilmu bioinformatika, perakitan primer untuk tujuan deteksi perubahan basa nukleotida bisa menggunakan aplikasi software secara online seperti [BatchPrimer3 \(<http://batchprimer3.bioinformatics.ucdavis.edu/>\)](http://batchprimer3.bioinformatics.ucdavis.edu/) dan primer1 ([primer1 \(\[primer1.soton.ac.uk/primer1.html\]\(http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html\)\)](http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html)). Perakitan primer secara siliko ini tidak menjamin 100% keberhasilan dalam deteksi perubahan basa nukleotida target sehingga formulasi optimum secara laboratorium (wet lab) tetap menjadi bagian tidak terpisahkan dalam

mengembangkan suatu metode mumpuni untuk diagnosis molekuler berbasis mutasi.

Proses amplifikasi material genetika dengan metode PCR berlangsung dalam suatu larutan penyangga. larutan penyangga ini terdiri dari dNTP, MgCl₂, dan KCl yang dilarutkan dalam tris-HCl dengan derajat keasaman pada kisaran 8. Larutan penyangga pada Kit PCR komersial untuk amplifikasi material genetika yang ada di pasar sudah mengalami optimalisasi sehingga menjadi lebih praktis, cepat dan mudah dalam penggunaannya. Namun demikian, dalam beberapa kasus tertentu larutan penyangga yang sudah optimal tersebut tidak memberikan efek signifikan pada hasil PCR. Kondisi ini terjadi pada proses PCR di mana sumber material genetika yang dipakai banyak mengandung inhibitor atau gen yang menjadi sasaran mengandung basa G dan C yang cukup tinggi (Bhagya *et al.*, 2013; Schrader *et al.*, 2012). Beberapa jenis larutan penyangga komersial seperti penyangga *BL-AMP*TM (Bailong Gene Company, nanjing, China), dan *Ampdirect*TM (Shimadzu Corp, Kyoto, Japan) diklaim memiliki kemampuan untuk amplifikasi material genetika langsung dari sumbernya tanpa harus melakukan proses pemurnian sehingga eror PCR dapat dieliminasi (Huang *et al.*, 2006; Nishimura *et al.*, 2000). Larutan penyangga *Anydirect* diklaim bisa digunakan untuk PCR langsung tanpa melakukan proses pemurnian material genetika dengan gen target mengandung G dan C tinggi ataupun gen target dengan jumlah copi gen yang cukup sedikit (Yang *et al.*, 2007). Hal menarik datang dari hasil penelitian Bu *et al.*, (2008) dan Sharma *et al.* (2012) dalam usahanya mengembangkan larutan penyangga efektif yang memiliki karakteristik meningkatkan performa emzim polymerase untuk tujuan PCR langsung dari sumber material genetika. Mereka menyimpulkan konsentrasi MgCl₂ menjadi faktor penting dalam mendapatkan larutan penyangga efektif untuk tujuan PCR genotyping tanpa melakukan pemurnian material genetika terlebih dahulu.

Taq polymerase yang dijual dipasar memiliki karakteristik beragam meskipun asal enzim berasal dari jenis *Thermus aquaticus*. Hal ini disebabkan karena Taq polymerase tersebut telah mengalami modifikasi sedemikian rupa sehingga memunculkan sifat yang unik baik dari sisi fidelitasnya maupun kemampuan

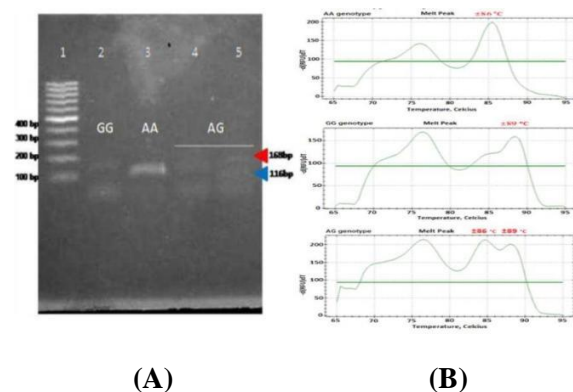
eksonuleasenya yang berdampak pada efisiensi amplifikasi dan deteksi (Terpe *et al.*, 2013; McInerney *et al.*, 2014; Marta *et al.*, 2017). Beberapa hasil penelitian mengindikasikan pemilihan Taq polymerase yang tepat akan berpengaruh pada tingkat akurasi hasil deteksi perubahan basa nukleotida menggunakan metode PCR dengan mengeliminasi salah baca basa nukleotida yang mengalami perubahan basa nukleotida dari gen target. Taq polymerase yang umum dipakai untuk tujuan genotyping dalam deteksi perubahan basa nukleotida biasanya sudah dikemas dalam bentuk kit sehingga pemilihan kit yang tepat akan menentukan akurasi deteksi. Umumnya, pemilihan metode atau kit yang menunjukkan performa bagus merupakan hasil optimasi dari beberapa kandidat kit setelah dilakukan uji performa dengan membandingkan hasil genotyping menggunakan kit komersial dengan metode standar untuk genotyping seperti *DNA sequencing* (Zhang *et al.*, 2015; Fitarelli-kiehl *et al.*, 2016; Bruin *et al.*, 2017).

c. Metode deteksi

Deteksi hasil amplifikasi asam nukleat berbasis PCR untuk diagnosis perubahan basa nukleotida akibat perubahan basa nukleotida secara konvensional dilakukan menggunakan media agarose yang dipadatkan atau dikenal dengan teknik DNA elektroforesis (Aaij and Borst, 1972). Asam nukleat hasil PCR yang terjepit dalam agarose bisa dibaca oleh mata telanjang akibat reaksi kimia interkelator DNA seperti etidium bromide (EtBr) dengan DNA pada saat agarose dipaparkan pada sinar ultra violet. Pita-pita DNA yang tersaji berupa besaran ukuran basa nukleotida yang mewakili variasi genetika yang dibawanya (Lee *et al.*, 2012; Chory dan Pollard, 2001). Selain murah dan sederhana, akuisisi data dengan teknik elektroforesis ini bisa didapatkan dalam waktu yang relatif singkat. Namun demikian, sensitifitas deteksi dengan teknik ini sangat beragam dan bergantung pada banyaknya asam nukleat yang teramplifikasi, konsentrasi interkelator DNA yang dipakai, konsentrasi dari agarose yang dipakai dan jenis transiluminator yang digunakan. Untuk mengatasi kendala tersebut beberapa modifikasi sudah dilakukan baik pada saat proses PCR maupun setelah proses PCR. Penambahan siklus PCR dari 30 menjadi 35 kali, penambahan DNA templat, atau merakit ulang kembali primer merupakan

beberapa upaya yang dilakukan untuk meningkatkan jumlah kopi DNA target sehingga meningkatkan sensitifitas deteksi pada saat visualisasi (Garibyan dan Nidhi, 2013; Rumsby, 2006; Rahman *et al.*, 2013). Terkadang hal sederhana seperti mengganti larutan EtBr yang lama dengan yang baru untuk merendam agarose bisa menjadi penyebab meningkatnya sensitifitas deteksi. Hal ini dikarenakan EtBr bekas mungkin sudah mengalami degradasi sehingga proses reaksi kimia menjadi menurun. Untuk itu, beberapa peneliti menyarankan untuk menambahkan larutan EtBr segar ke dalam agarose sebelum dilakukan elektroforesis dan visualisasi. Konsentrasi agarose sangat mempengaruhi kemampuan penetrasi EtBr ke dalam pori-pori agarose tebal maka penetrasi EtBr akan semakin lambat. Agarose dengan konsentrasi yang tinggi (3-5%) biasanya digunakan untuk deteksi perubahan basa nukleotida dengan format *multiplex* PCR dengan ukuran target DNA yang saling berdekatan. Agarose dengan konsentrasi tinggi dianjurkan menggunakan EtBr dengan konsentrasi tinggi diharapkan dengan konsentrasi tersebut EtBr bisa menyebar secara merata pada semua bagian agarose sehingga DNA yang terjebak di dalamnya bisa terwarnai secara menyeluruh. Saat ini terdapat alternatif interkelator DNA lain seperti *Sybr green dye* yang lebih aman dan diklaim memiliki tingkat sensitifitas deteksi yang lebih tinggi dibandingkan EtBr (Huang dan Fu, 2005). Terakhir, pemilihan transiluminor yang tepat akan menentukan hasil akhir akurasi analisa. Terkadang pada beberapa kasus, deteksi hasil PCR yang sama menggunakan transiluminator yang berbeda memberikan hasil sensitifitas deteksi yang berbeda (Tuma *et al.*, 1999). Semakin berkembangnya metode deteksi PCR dan penemuan interkelator DNA baru, saat ini sudah dikembangkan teknik deteksi baru untuk deteksi perubahan basa pada suatu gen dengan metode PCR dinamakan *Melting Curve Analysis* (Furugaki *et al.*, 2014; Ririe *et al.*, 1997; Gundry *et al.*, 2003; Tsiatis *et al.*, 2010; Hoffmann *et al.*, 2007). Alih-alih menggunakan perbedaan ukuran pita DNA, teknik ini membedakan perubahan basa nukleotida pada suatu gen dari titik leleh yang dibawanya dan disajikan dalam bentuk diagram puncak titik leleh. Teknik ini sangat sensitif dimana perbedaan satu pasang basa pada gen bisa dibedakan secara nyata. Aplikasi *Melting Curve*

Analysis, seperti pada gambar 3 telah berhasil meningkatkan sensitifitas deteksi SNP HER2I655V pada kanker payudara menggunakan metode Allele-Specific PCR yang semula menggunakan teknik DNA elektroforesis dimana pita-pita DNA yang teramati sangat tipis (Budiarto *et al.*, 2016). Pada metode deteksi HER2I655V, hasil Allele-Specific PCR dengan produk genotipe AA (116 bp) dan GG (168 bp) masing-masing akan dikonversi menjadi titik leleh dengan puncak suhu leleh sebesar 86°C, dan 89°C. Sedangkan genotipe AG akan menampilkan kedua puncak suhu leleh secara bersamaan. Dampak signifikan analisa genotiping menggunakan metode *melting curve analysis* yaitu menghilangkan kemungkinan eror PCR yang disebabkan oleh salah baca hasil deteksi PCR.



Gambar 3. Perbandingan metode deteksi dari produk PCR untuk genotiping HER2I655V. (A) metode deteksi menggunakan DNA elektroforesis, (B) metode deteksi dengan Melting Curve Analysis (Budiarto *et al.*, 2016)

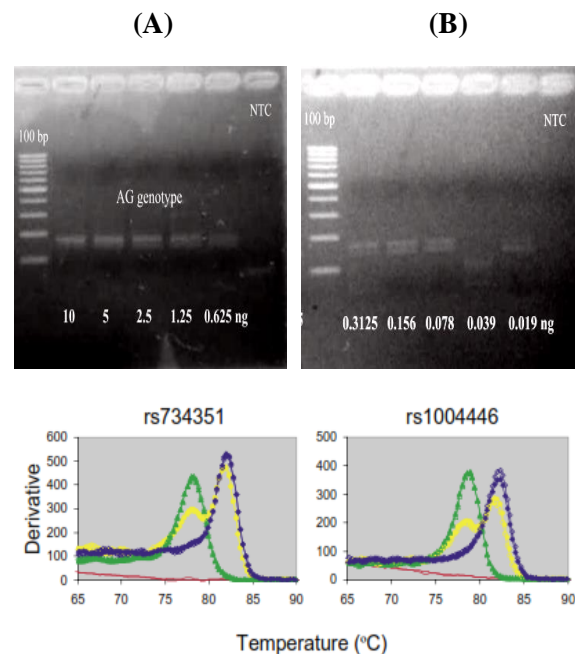
Tipe Error PCR pada aplikasi genotiping (*genotyping errors*) dan teknik optimasi untuk mengeliminasiya

Error PCR dijumpai pada banyak pengembangan metode PCR untuk tujuan deteksi perubahan basa nukleotida pada asam nukleat (Blais *et al.*, 2015). Jika pada deteksi gen menggunakan metode PCR hanya ditemukan eror PCR akibat tidak berlangsungnya proses amplifikasi DNA (*Locus Drop Out/LDO*) atau rendahnya spesifitas reaksi yang ditunjukkan oleh adanya tidaknya pita dari gen sasaran maka eror pada PCR untuk tujuan deteksi perubahan basa nukleotida sering ditemukan fenomena yang disebut dengan *preferential amplification* (Walsh *et al.*, 1992). Format untuk deteksi

perubahan basa nukleotida menggunakan PCR umumnya dalam bentuk *multiplex* PCR dimana lebih dari satu jenis primer spesifik alele digunakan dalam satu reaksi PCR secara bersamaan baik untuk deteksi gen tunggal maupun lebih dari satu gen. Format PCR seperti ini untuk deteksi perubahan basa nukleotida sangat rentan terbentuknya eror PCR. Disamping itu, beberapa faktor seperti metode ekstraksi asam nukleat, umur dari sumber asam nukleat diambil, jumlah DNA templat yang digunakan untuk diagnosis, primer, keberadaan basa nukleotida pada primer spesifik alele selain pada posisi ujung 3 dan nomor 2 atau 3 dari ujung 3, terdapatnya struktur G-quadplex, i-motif dan metilasi daerah CpG pada gen target, umur dan inhibitor juga bisa menjadi faktor pemicu timbulnya *genotyping errors* (Pompanon et al. 2005).

Preferential amplification merupakan kegagalan Taq polymerase untuk mengamplifikasi secara optimal salah satu jenis alele dari gen target yang heterozigote. Pada kondisi yang sangat ekstrim dimana proses amplifikasi dari salah satu alele tidak terjadi, dinamakan *Allele Drop Out* (ADO) bisa menyebabkan hasil PCR negatif palsu (Findlay et al., 1995). Sehingga untuk kasus-kasus metode genotiping berbasis PCR yang berpotensi menyebabkan *genotyping errors* diatasi dengan pendekatan yang hampir sama. *Preferential amplification* bisa disebabkan oleh (1) perbedaan GC content yang mencolok antar alele yang menyebabkan denaturasi tidak sempurna pada alele yang mengandung GC content tinggi, (2) Perbedaan ukuran alele yang dianalisa dimana alele-alele ukuran pendek cenderung mengalami *preferential amplification*, (3) Jumlah cetakan DNA yang digunakan untuk proses PCR relatif sedikit yang menyebabkan efek stokastik akibat jumlah cetakan DNA dalam beberapa reaksi PCR yang sama tidak konsisten, dan (4) rendahnya kapasitas pengikatan primer pada alele targetnya disebabkan karena pemilihan basa nukleotida pada posisi yang meningkatkan efisiensi penempelan primer (basa-basa nukleotida pada posisi 2 atau 3 dari ujung 3 primer) tidak mengikuti aturan baku perakitan primer untuk PCR genotiping (Walsh et al., 1992). Analisa kejadian *preferential amplification* pada PCR genotiping berbasis agarose sebagai sistem deteksinya bisa dilakukan dengan mengamati langsung proporsi

pita-pita DNA target yang terbentuk pada sampel heterozigote seperti pada metode Allele-Specific PCR untuk deteksi SNP HER2I655V pada kanker payudara yang sudah dikembangkan oleh Budiarto dan Desriani, (2016). Heterozigote alele HER2I655V menunjukkan dua pola *preferential amplification* yang bergantung pada jumlah cetakan DNA yang digunakan yaitu (1) *preferential amplification* alele GG pada cetakan DNA 10 sampai 0.3125 ng dan (2) *preferential amplification* alele AA pada cetakan DNA 0.019 ng. Sedangkan analisa *preferential amplification* menggunakan PCR berbasis *melting curve* sebagai metode deteksinya bisa dilakukan dengan melihat kesamaan puncak leleh (*melt peak*) untuk kedua alele yang terbentuk. *Preferential amplification* terjadi jika kedua puncak leleh pada sampel heterozigote memiliki proporsi tinggi yang tidak sama seperti ditunjukkan pada hasil penelitian Wang et al., (2005) yang menganalisa pola SNP untuk gen *insulin growth factor 2* (Gambar 4).



Gambar 4. Kejadian *Preferential amplification* pada (A) deteksi SNP I655V heterozigote alele menggunakan Allele-Specific PCR dengan agarose sebagai media deteksi (Budiarto dan Desriani, 2016), (B) deteksi SNP pada gene *insulin growth factor 2* menggunakan Allele-Specific PCR dengan *melting curve analysis* sebagai media deteksi; heterozigote yang mengalami *preferential*

amplification diwarnai kuning (Wang *et al.*, 2005)

Untuk sampel heterozigote yang mengalami *preferential amplification*, Weissensteiner and Lanchbury (1996) menyarankan untuk memodifikasi beberapa kondisi PCR yang tujuan untuk meningkatkan sensitivitas deteksi alele yang sulit diamplifikasi pada kondisi PCR yang sub optimal seperti penambahan NaCl dan Betaine pada reaksi PCR. Namun demikian, pada beberapa kasus intervensi garam dan kosolven tidak sepenuhnya bisa menghilangkan *preferential amplification*. Fragmen gen target dalam analisa SNP yang mengandung urutan basa nukleotida $G_{2-5}N_{1-7}G_{2-5}N_{1-7}G_{2-5}N_{1-7}G_{2-5}$ atau $C_{2-5}N_{1-7}C_{2-5}N_{1-7}C_{2-5}N_{1-7}C_{2-5}$ berpotensi membentuk struktur sekunder DNA seperti Motif Loop atau I. Kegagalan proses amplifikasi pada gen yang mengandung motif ini disebabkan karena induksi struktur sekunder pada amplicon PCR di beberapa awal siklus PCR karena dinamika suhu selama proses PCR berlangsung. Suhu denturasi (suhu standar 95°C) pada awal siklus PCR masih bisa mendenturasi secara sempurna dari semua amplicon PCR yang dibentuk dari siklus PCR sebelumnya. Namun demikian, siklus PCR secara tidak langsung juga menyebabkan pembentukan struktur sekunder secara spontan dari amplicon sebelumnya dimana penambahan siklus PCR menyebabkan pertambahan proporsi amplicon PCR dengan struktur sekunder sehingga hanya sebagian kecil saja amplicon yang mampu didenaturasi secara sempurna dengan suhu 95°C hal ini berdampak pada turunnya efisiensi amplifikasi DNA. Intervensi yang mampu mengganggu stabilitas ikatan hidrogen yang membentuk struktur sekunder dari amplicon DNA adalah cara rasional untuk menghilangkan *preferential amplification* akibat halangan geometris ini. Ada tiga cara yang bisa diterapkan untuk meningkatkan tingkat denturasi amplicon PCR yang membentuk struktur sekunder yaitu (1) menambahkan senyawa denaturasi seperti DMSO dan formaldehid, (2) menambahkan kofaktor Mg^{+2} , dan (3) menaikkan suhu denaturasi PCR. Efektifitas ketiga cara tersebut dalam menghilangkan *preferential amplification* akan sangat bergantung pada kekuatan struktur sekunder amplicon DNA yang ditentukan oleh kerapatan dari masing-masing motif. Namun demikian, Reformulasi buffer *in house* serta optimasi $MgCl_2$ untuk

tujuan genotiping pada target gen yang demikian merupakan kunci utama untuk mendapatkan PCR genotiping yang optimal (Wenzel *et al.*, 2009; Saunders *et al.*, 2010).

Beberapa kondisi lain seperti sampel DNA heterozigote yang (1) jumlahnya rendah, (2) proporsi gen target yang membawa SNP tidak sama, dan (3) mengalami degradasi bisa menginduksi terjadinya *preferential amplification*. Saat ini PCR genotiping untuk sejumlah besar SNP yang relevan dengan resiko kanker yaitu menggunakan sumber DNA dari preparat FFPE yang rentan mengalami tiga kondisi tersebut sehingga potensi *preferential amplification* yang berdampak pada hasil PCR negatif palsu semakin tinggi. Proses isolasi DNA asal FFPE menggunakan jaringan dengan jumlah yang cukup sedikit dengan tujuan untuk optimalisasi proses isolasi DNA sehingga didapatkan kemurnian DNA yang cukup tinggi. Namun demikian, tingkat kemurnian DNA tidak selalu berbanding lurus dengan jumlah DNA yang berhasil diisolasi. Bahkan perbedaan metode isolasi DNA yang dipakai bisa menyebabkan proporsi alele yang didapatkan pada satu sampel beragam. Proses fixasi pada jaringan memperburuk kualitas DNA hasil isolasi dari FFPE yang kebanyakan sudah mengalami degradasi. Oleh sebab itu teknik untuk mengurangi potensi negatif akibat *preferential amplification* dalam diagnosis SNP terkait kanker berbasis FFPE menjadi penting untuk digunakan dalam mendapatkan suatu metode PCR genotiping yang tangguh. Teknik untuk meningkatkan amplifikasi DNA dari proporsi alele yang mengalami tekanan akibat *preferential amplification* dari alele yang lainnya pada sampel heterozigote selama proses PCR berlangsung banyak diadaptasi dari hasil penelitian teknologi PCR untuk aplikasi forensik, kepurbakalaan dan preimplantasi embrio. Skenario terbaik untuk meningkatkan jumlah DNA hasil isolasi dari jaringan FFPE yaitu dengan metode pooling Ekstraksi DNA yaitu mengekstraksi DNA lebih dari satu kali dari satu sampel FFPE yang sama. Kelemahan dari metode ini yaitu hanya mungkin diterapkan jika jaringan FFPE masih tersedia dalam jumlah relatif banyak. Untuk jaringan FFPE terbatas, metode alternatif deteksi SNP yaitu dengan melakukan nested allele-specific PCR. Metode ini bertujuan untuk meningkatkan probabilitas gen target yang membawa SNP melalui dua kali reaksi PCR. Reaksi PCR pertama akan

mengamplifikasi gen target yang membawa SNP dengan primer luar (*outer primer*) menggunakan DNA templat dari hasil isolasi DNA. Proses amplifikasi pada tahapan ini dilakukan sebanyak ± 10 siklus PCR untuk mendapatkan produk PCR spesifik gen target yang akan digunakan untuk deteksi SNP menggunakan primer spesifik alele (*inner primer*) pada allele-specific PCR (Ray dan Handyside, 1996). Selain itu, metode nested allele-PCR bisa digunakan untuk aplikasi genotiping dimana proporsi alele pada DNA heterozigote tidak proporsional akibat pemilihan metode DNA ekstraksi yang tidak tepat (El-Hashemite dan Delhanty, 1997). Sifat metode fiksasi jaringan pada preparasi FFPE yang cukup destruktif pada DNA maka untuk mengurangi *preferential amplification* pada deteksi SNP maka disarankan nested allele-specific PCR dengan target gen berukuran kurang dari 300 bp menggunakan primer spesifik alele dengan mengoptimalkan beberapa parameter kondisi PCR seperti cetakan AQ-DNA, rasio primer, larutan penyangga, $MgCl_2$, dan enhancer seperti betaine.

HASIL PENELITIAN

Implikasi *genotyping errors* PCR pada akurasi diagnostik kanker

Deteksi SNP pada fragmen-fragmen gen yang diduga berkaitan dengan resiko kanker berbasis PCR sangat rentan akan kesalahan interpretasi data sehingga memicu *genotyping errors*. Setidaknya ada dua penyebab *genotyping errors* yaitu akibat PCR positif palsu (klasifikasi data yang seharusnya PCR negatif sebagai PCR positif) dan PCR negatif palsu (klasifikasi data yang seharusnya PCR positif sebagai PCR negatif). PCR Positif palsu disebabkan oleh kontaminasi DNA yang ikut teramplifikasi pada saat PCR dan menampakan ukuran DNA yang mirip dengan gen target yang dituju (Borst *et al.*, 2004). DNA kontaminan yang ikut teramplifikasi bisa dikarenakan dua faktor yaitu (1) proses pembuatan larutan PCR dilakukan dalam kondisi yang tidak steril atau (2) pemilihan PCR kit yang tidak tepat dimana Taq polymerase yang disediakan sudah terkontaminasi oleh DNA mikroorganisme asing (Rys dan Persing, 1993; Mühl *et al.*, 2010). PCR positif palsu bisa dihilangkan dengan melakukan dua pendekatan sekaligus yaitu menambahkan DNase I pada kit PCR

dengan tujuan untuk menghilangkan DNA kontaminan pada kit PCR dan menerapkan prosedur steril seperti pemaparan dH_2O , tips, tips, dan tube PCR dengan sinar ultra-violet dan melakukan pencampuran larutan PCR di dalam PCR *cabinet* dengan harapan DNA kontaminan yang bersumber dari udara bisa dihilangkan (Aslanzadeh 2004; Heining *et al.*, 2003). Sedangkan kemunculan PCR negatif palsu sangat berkaitan erat dengan faktor-faktor pendukung keberhasilan suatu PCR genotiping yang sub-optimal (Bacich *et al.*, 2011). Sehingga eliminasi PCR negatif palsu dalam PCR genotiping yaitu selain perlakuan DNase I dan menggunakan prosedur steril pada saat PCR dilakukan juga optimasi pada setiap faktor pendukung keberhasilan PCR genotiping seperti diuraikan sebelumnya.

Deteksi SNP menggunakan teknologi berbasis PCR saat ini sangat variatif dari teknik konvensional sampai berbasis high-throughput. kompleksitas teknologi PCR yang dipakai untuk mendeteksi varian gen ini tidak menjamin bahwa potensi *genotyping errors* akan semakin kecil. Metode PCR untuk tujuan genotiping mikrosatelit berbasis highthroughput seperti yang dipaparkan oleh Ewen *et al.* (2000) memiliki potensi kumulatif eror sebesar 0.25% sampai 1.37% dimana *preferential amplification* menjadi penyumbang terbesar tipe eror pada pembacaan data hasil PCR yaitu sebesar 48.7%. Sedangkan Teknik PCR genotiping metode konvensional untuk deteksi HER2I655V mengandung kumulatif eror 10% sampai 50% pada kasus alele heterozigote (Budiarto *et al.*, 2017). Dari data di atas dapat disimpulkan bahwa metode deteksi SNP berbasis PCR sangat rentan akan timbulnya *genotyping errors* sehingga upaya untuk mengeliminasi salah duga data dari metode genotiping berbasis kit PCR komersial harus diterapkan. Langkah sederhana yaitu (1) selalu melakukan PCR genotiping dengan melibatkan ulangan pada sampel yang sama. Hal ini selain untuk melihat konsistensi hasil genotiping juga untuk meminimalkan pengaruh stokastik DNA templat atau inhibitor pada proses amplifikasi DNA dan (2) pada setiap proses PCR dilakukan PCR kontrol dengan mereaksikan semua komponen PCR tanpa penambahan cetakan DNA.

Analisa SNP menggunakan metode amplifikasi DNA yaitu mendeteksi varian alele dari suatu gen yang digolongkan menjadi alel dominan

dan alel resesif. Pada analisa genetika SNP di dalam suatu populasi tertentu terkait perannya dalam suatu karsinogenesis proporsi pada kedua varian alele akan sangat menentukan apakah alele suatu gen yang sedang diamati memang benar adanya menjadi kandidat biomarker sebagai penciri kerentanan terhadap resiko kanker atau disebabkan adanya penggiringan kesimpulan yang kurang tepat akibat adanya overestimasi dari satu alele terhadap alele yang lainnya akibat *genotyping errors* (Mitchell *et al.*, 2003) sehingga tidak mengherankan bahwa banyak studi genetika SNP sebagai kandidat biomarker untuk kerentanan terhadap suatu kejadian kanker menimbulkan hasil yang saling bertolak belakang. Kasus yang menarik bisa diambil dari studi genetika SNP HER2I655V yang diduga sebagai biomarker untuk kerentanan kanker payudara dimana ada SNP jenis ini untuk populasi Cina menjadi biomarker kanker payudara akan tetapi untuk populasi afrika tidak demikian (Xie *et al.*, 2000; Millikan *et al.*, 2005; Siddig *et al.*, 2008; Naidu *et al.*, 2008). Perbedaan ini bisa disebabkan oleh faktor etnis yang secara langsung memengaruhi proporsi alele dominan terhadap alele resesif atau bisa disebabkan oleh eror terkait metodologi yang digunakan yang didukung oleh adanya penyimpangan proporsi alele dari keseimbangan Hardy-Wienberg. Sebuah penelitian mengungkapkan bahwa eror akibat faktor yang kedua ini memberikan kemungkinan kesalahan diagnosis sebesar 14 sampai 58% (Hosking *et al.*, 2004). Hal ini menggaris-bawahi pentingnya pemilihan metodologi yang tepat dengan laju kumulatif eror yang rendah untuk studi SNP terkait kanker.

KESIMPULAN

Teknologi amplifikasi asam nukleat untuk deteksi perubahan basa terutama SNP sudah sangat mutakhir. Namun demikian, *error* PCR masih menjadi persoalan serius dalam analisa SNP berbasis teknologi ini. *Locus Drop Out*, *preferential amplification* dan *Allele Drop Out* merupakan jenis-jenis eror PCR yang menyebabkan terjadinya *genotyping errors* pada analisa SNP berbasis amplifikasi asam nukleat yang disebabkan oleh sumber material genetika yang kualitas maupun kuantitasnya rendah, penggunaan kondisi PCR yang sub-optimal, atau pemakaian metode deteksi yang tidak

tepat. Strategi seperti modifikasi pada semua tahapan PCR (pre-PCR, PCR, dan post-PCR) menjadi kunci dalam mengurangi *genotyping errors* untuk menegakan suatu metode PCR genotyping yang mumpuni.

REFERENSI

- Aajj, C., and P. Borst. 1972. "The Gel Electrophoresis of DNA." *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis* 269: 192–200. doi:10.1016/0005-2787(72)90426-1.
- Al-soud, Waleed A B U, Leif J Jo, and Peter Rådstro. 2000. "Identification and Characterization of Immunoglobulin G in Blood as a Major Inhibitor of Diagnostic PCR" 38 (1): 345–50.
- Alvarez-aldana, Adalucy, José William, and Juan C Sepúlveda-arias. 2015. "Pathology – Research and Practice Comparison of Five Protocols to Extract DNA from Paraffin-Embedded Tissues for the Detection of Human Papillomavirus." *Pathology -- Research and Practice* 211 (2). Elsevier GmbH.: 150–55. doi:10.1016/j.prp.2014.10.011.
- Aslanzadeh, Jaber. 2004. "Brief Review: Preventing PCR Amplification Carryover Contamination in a Clinical Laboratory." *Annals of Clinical and Laboratory Science*.
- Baak-pablo, Renee, and Vincent Dezentje. 2010. "Genotyping of DNA Samples Isolated from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues Using Preamplification." *The Journal of Molecular Diagnostics* 12 (6). American Society for Investigative Pathology and Association for Molecular Pathology: 746–49. doi:10.2353/jmoldx.2010.100047.
- Bacich, D J, K M Sobek, J L Cummings, A A Atwood, and D S O'Keefe. 2011. "False Negative Results from Using Common PCR Reagents." *BMC Res Notes* 4: 457. doi:10.1186/1756-0500-4-457.
- Berz, David, Victoria M Raymond, Jordan H Garst, and Mark G Erlander. 2016. "Non - Invasive Urine Testing of EGFR Activating Mutation and T790M Resistance Mutation in Non - Small Cell Lung Cancer." *Experimental Hematology & Oncology*. BioMed Central, 1–6. doi:10.1186/s40164-016-0052-3.

- Blais, Jonatan, Sébastien B. Lavoie, Sylvie Giroux, Johanne Bussi eres, Carmen Lindsay, Jacqueline Dionne, M elissa Laroche, Yves Giguère, and François Rousseau. 2015. "Risk of Misdiagnosis due to Allele Dropout and False-Positive PCR Artifacts in Molecular Diagnostics Analysis of 30,769 Genotypes." *Journal of Molecular Diagnostics* 17: 505–14. doi:10.1016/j.jmoldx.2015.04.004.
- Board RE, Williams VS, Knight L, Shaw J, Greystoke A, Ranson M, Dive C, Blackhall FH, Hughes A. 2008. "Isolation and Extraction of Circulating Tumor DNA from Patients with Small Cell Lung Cancer." *Ann N Y Acad Sci*, 98–107.
- Bonin, Serena, and Giorgio Stanta. 2013. "Nucleic Acid Extraction Methods from Fixed and Paraffin-Embedded Tissues in Cancer Diagnostics," 271–82.
- Borst, A., A. T.A. Box, and A. C. Fluit. 2004. "False-Positive Results and Contamination in Nucleic Acid Amplification Assays: Suggestions for a Prevent and Destroy Strategy." *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. doi:10.1007/s10096-004-1100-1.
- Bruin, Elza C De, Jessica L Whiteley, Claire Corcoran, Pauline M Kirk, Jayne C Fox, Javier Armisen, Justin P O Lindemann, Gaia Schiavon, Helen J Ambrose, and Alexander Kohlmann. 2017. "Accurate Detection of Low Prevalence AKT1 E17K Mutation in Tissue or Plasma from Advanced Cancer Patients," 1–15.
- Bu, Ying, Huan Huang, and Guohua Zhou. 2008. "Direct Polymerase Chain Reaction (PCR) from Human Whole Blood and Filter-Paper-Dried Blood by Using a PCR Buffer with a Higher pH" 375: 370–72. doi:10.1016/j.ab.2008.01.010.
- Budiarto, Desriani and Wirisma A Harahap. 2016. "Development of Sybr Green I-Based Melting Curve Method for HER2 I655V Polymorphism Detection in Breast Cancer" 20 (2): 29–34. doi:10.7454/msk.v20i2.5522.
- Budiarto and Desriani. 2016. "Dataset Reporting Detection of Breast Cancer-Related HER2I655V Polymorphism Using Allele-Specific Polymerase Chain Reaction." *Data in Brief*. doi:10.1016/j.dib.2016.09.033.
- Budiarto, B. R. (2017). Modified allele-specific PCR improves HER2 Ile655Val detection by reducing genotyping errors. *Applied Cancer Research*, 37(1), 36.
- Bui, Minh, and Zhongchi Liu. 2009. "Simple Allele-Discriminating PCR for Cost-Effective and Rapid Genotyping and Mapping." *Plant Methods* 5: 1. doi:10.1186/1746-4811-5-1.
- C. H. W. M. R. Chandrasekara Bhagya, W. S. Wijesundera Sulochana, and N. Perera Hemamali. 2013. "Polymerase Chain Reaction Optimization for Amplification of Guanine-Cytosine Rich Templates Using Buccal Cell DNA." *Indian J Hum Genet*, 78–83.
- Casado-díaz, Antonio, Rafael Cuenca-acevedo, José Manuel, and Gabriel Dorado. 2007. "Individual Single Tube Genotyping and DNA Pooling by Allele-Specific PCR to Uncover Associations of Polymorphisms with Complex Diseases" 376: 155–62. doi:10.1016/j.cca.2006.08.014.
- Chory, J, and J D Pollard. 2001. "Separation of Small DNA Fragments by Conventional Gel Electrophoresis." *Current Protocols in Molecular Biology* Chapter 2: Unit2.7. doi:10.1002/0471142727.mb0207s47.
- Davalieva, Katarina, and Georgi D Efremov. 2010. "Influence Of Salts And Pcr Inhibitors On The Amplification Capacity Of Three Thermostable Dna Polymerases" 29 (1): 57–62.
- Dietrich, Dimo, Barbara Uhl, Verena Sailer, Emily Eva Holmes, Maria Jung, and Sebastian Meller. 2013. "Improved PCR Performance Using Template DNA from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues by Overcoming PCR Inhibition" 8 (10): 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0077771.
- Dong-Ja Kim, Sarah Linnstaedt, Jaime Palma, Joon Cheol Park, Evangelos Ntrivalas, Joanne Y.H. Kwak-Kim, Alice Gilman-Sachs, Kenneth Beaman, Michelle L. Hastings, Jeffrey N. Martin, and Dominik M. Duelli. 2012. "Plasma Components Affect Accuracy of Circulating Cancer-Related MicroRNA Quantitation."
- El Bali, Latifa, Aur elie Diman, Alfred Bernard, Nancy H C Roosens, and Sigrid C J Dekeersmaecker. 2014. "Comparative Study of Seven Commercial Kits for Human Dna Extraction from Urine

- Samples Suitable for Dna Biomarker-Based Public Health Studies.” *Journal of Biomolecular Techniques* 25: 96–110. doi:10.7171/jbt.14-2504-002.
- El-Hashemite, N, and J D Delhanty. 1997. “A Technique for Eliminating Allele Specific Amplification Failure during DNA Amplification of Heterozygous Cells for Preimplantation Diagnosis.” *Molecular Human Reproduction* 3: 975–78. doi:9433923.
- Ewen, Kelly R., Melanie Bahlo, Susan A. Treloar, Douglas F. Levinson, Bryan Mowry, John W. Barlow, and Simon J. Foote. 2000. “Identification and Analysis of Error Types in High-Throughput Genotyping.” *The American Journal of Human Genetics* 67: 727–36. doi:10.1086/303048.
- Findlay, Ian, Pierre Ray, Phil Quirke, and Anthony Rutherford. 1995. “Allelic Dropout and Preferential Amplification in Single Cells and Human Blastomeres: Implications for Preimplantation Diagnosis of Sex and Cystic Fibrosis.” *Molecular Human Reproduction* 1: 209–18. doi:10.1093/molehr/1.4.209.
- Fitarelli-kiehl, Mariana, Gabriel S Macedo, Rosane Paixão Schlatter, Patricia Koehler-santos, Silveira Matte, Patricia Ashton-prolla, and Juliana Giacomazzi. 2016. “Comparison of Multiple Genotyping Methods for the Identification of the Cancer Predisposing Founder Mutation P . R337H in TP53 .” 209: 203–9.
- Furugaki, Koh, Hideyuki Yasuno, Toshiki Iwai, Yoichiro Moriya, Naoki Harada, and Kaori Fujimoto-Ouchi. 2014. “Melting Curve Analysis for Mutations of EGFR and KRAS.” *Anticancer Research* 34: 613–22.
- Garibyan, Lilit, and Avashia Nidhi. 2013. “Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR).” *J Invest Dermatol.* 133: 392–95. doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.01186-4.
- Gjerdrum, Lise Mette, Boe Sandahl Sorensen, Eigil Kjeldsen, Flemming Brandt Sorensen, Ebba Nexo, and Stephen Hamilton-dutoit. 2004. “Real-Time Quantitative PCR of Microdissected Paraffin-Embedded Breast Carcinoma An Alternative Method for HER-2 / Neu Analysis” 6 (1): 42–51.
- Greer CE, Lund JK, Manos MM. 1991. “PCR Amplification from Paraffin-Embedded Tissues: Recommendations on Fixatives for Long-Term Storage and Prospective Studies.” *PCR Methods Appl.*, 46–50.
- Gundry, Cameron N., Joshua G. Vandersteen, Gudrun H. Reed, Robert J. Pryor, Jian Chen, and Carl T. Wittwer. 2003. “Amplicon Melting Analysis with Labeled Primers: A Closed-Tube Method for Differentiating Homozygotes and Heterozygotes.” *Clinical Chemistry* 49: 396–406. doi:10.1373/49.3.396.
- Hanke, Merle, Ingo Kausch, Gerlinde Dahmen, Dieter Jocham, and Jens M Warnecke. 2007. “Detailed Technical Analysis of Urine RNA-Based Tumor Diagnostics Reveals ETS2 / Urokinase Plasminogen Activator to Be a Novel Marker for Bladder Cancer” 2077: 2070–77. doi:10.1373/clinchem.2007.091363.Gene.
- Hansen, T. V O, Mette K. Simonsen, Finn C. Nielsen, and Yrsa Andersen Hundrup. 2007. “Collection of Blood, Saliva, and Buccal Cell Samples in a Pilot Study on the Danish Nurse Cohort: Comparison of the Response Rate and Quality of Genomic DNA.” *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 16: 2072–76. doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-0611.
- Heininger, Alexandra, Marlies Binder, Andreas Ellinger, Konrad Botzenhart, Klaus Unertl, and Gerd Döring. 2003. “DNase Pretreatment of Master Mix Reagents Improves the Validity of Universal 16S rRNA Gene PCR Results.” *Journal of Clinical Microbiology* 41: 1763–65. doi:10.1128/JCM.41.4.1763-1765.2003.
- Henke, Wolfgang, Kerstin Herdel, Klaus Jung, Dietmar Schnorr, and Stefan A. Loening. 1997. “Betaine Improves the PCR Amplification of GC-Rich DNA Sequences.” *Nucleic Acids Research* 25: 3957–58. doi:10.1093/nar/25.19.3957.
- Hoffmann, Michael, Jochen Hurlebaus, and Christian Weilke. 2007. “Novel Methods for High-Performance Melting Curve Analysis Using the LightCycler® 480 System.” *Biochemica-Mannheim-* 1: 17. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Novel+Methods+f or+High->

- Performance+Melting+Curve+Analysis+Using+the+LightCycler+®+480+System# 0.
- Hoque, Ashraful, Phyllis Goodman, Christine B. Ambrosone, William D. Figg, Douglas K. Price, William Kopp, Xifeng Wu, Jeffrey Conroy, Teresa A. Lehman, and Regina M. Santella. 2008. "Extraction of DNA from Serum for High-Throughput Genotyping: Findings from Pilot Studies Within the Prostate Cancer Prevention Trial." *Urology* 71: 967–70. doi:10.1016/j.urology.2007.11.042.
- Hosking, Louise, Sheena Lumsden, Karen Lewis, Astrid Yeo, Linda McCarthy, Aruna Bansal, John Riley, Ian Purvis, and Chun-Fang Xu. 2004. "Detection of Genotyping Errors by Hardy-Weinberg Equilibrium Testing." *European Journal of Human Genetics* 12: 395–99. doi:10.1038/sj.ejhg.5201164.
- Hu Q, Liu Y, Yi S, Huang D. 2014. "The Effect of Six Common PCR Inhibitors on DNA Polymerase and DNA Template" 2: 1–4.
- Hu, Yueshan, Erik A. Ehli, Kelly Nelson, Krista Bohlen, Christophina Lynch, Patty Huizenga, Julie Kittlesrud, Timothy J. Soundy, and Gareth E. Davies. 2012. "Genotyping Performance between Saliva and Blood-Derived Genomic DNAs on the DMET Array: A Comparison." *PLoS ONE* 7. doi:10.1371/journal.pone.0033968.
- Huang, Huan, Ying Bu, and Guo-hua Zhou. 2006. "Single-Tube-Genotyping of Gastric Cancer Related SNPs by Directly Using Whole Blood and Paper-Dried Blood as Starting Materials" 12 (24): 3814–20.
- Huang, Qing, and Wei-Ling Fu. 2005. "Comparative Analysis of the DNA Staining Efficiencies of Diggerent Fluorescent Dyes in Preparative Agarose Gel Electrophoresis." *Clinical Chemical Laboratory Medicine* 43: 841–42. doi:10.1515/CCLM.2005.141.
- Huggett, Jim F, Tanya Novak, Jeremy A Garson, Clare Green, Stephen D Morris-jones, Robert F Miller, and Alimuddin Zumla. 2008. "Differential Susceptibility of PCR Reactions to Inhibitors: An Important and Unrecognised Phenomenon" 9: 1–9. doi:10.1186/1756-0500-1-70.
- Janecka, Anna, Agnieszka Adamczyk, and Anna Gasin. 2015. "Comparison of Eight Commercially Available Kits for DNA Extraction from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues" 476: 8–10. doi:10.1016/j.ab.2015.01.019.
- Kalantari, Narges, Masomeh Bayani, and Taraneh Ghaffari. 2016. "Deparaffinization of Formalin- Fixed Paraffin Embedded Tissue Blocks Using Hot Water instead of Xylene" 507: 71–73. doi:10.1016/j.ab.2016.05.015.
- Kieleczawa, Jan, and Erica Mazaika. 2010. "Optimization of Protocol for Sequencing of Difficult Templates." *Journal of Biomolecular Techniques* 21: 97–102.
- Koutros, Stella, Debra T Silverman, Dalsu Baris, Shelia Hoar Zahm, M Lindsay, Joanne S Colt, David W Hein, et al. 2012. "Hair Dye Use and Risk of Bladder Cancer in the New England Bladder Cancer Study." *Int J Cancer* 129 (12): 2894–2904. doi:10.1002/ijc.26245.Hair.
- Lang, Alois H, and Heinz Drexel. 2011. "Optimized Allele-Specific Real-Time PCR Assays for the Detection of Common Mutations in KRAS and." *JMDI* 13 (1). Elsevier Inc.: 23–28. doi:10.1016/j.jmoldx.2010.11.007.
- Lee, Pei Yun, John Costumbrado, Chih-Yuan Hsu, and Yong Hoon Kim. 2012. "Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments." *J. Vis. Exp* 39233923. doi:10.3791/3923.
- Lina Zhang, Jinzhao Zhao, Guanglin Cui, Hong Wang, Dao Wen Wang. 2015. "Genotyping on ALDH2: Comparison of Four Different Technologies." *PLoS One*.
- Liu, Jing, Shunmou Huang, Meiyu Sun, Shengyi Liu, Yumei Liu, Wanxing Wang, Xiurong Zhang, Hanzhong Wang, and Wei Hua. 2012. "An Improved Allele-Specific PCR Primer Design Method for SNP Marker Analysis and Its Application," 1–9.
- Lorenz, Todd C. 2012. "Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies." *J Vis Exp*, 3998.
- Mansour, Anthony, Rajaa Chatila, and Noha Bejjani. 2014. "MethodsX A Novel Xylene-Free Deparaffinization Method for the Extraction of Proteins from Human Derived Formalin-Fixed Paraffin

- Embedded (FFPE) Archival Tissue Blocks.” *MethodsX* 1. Elsevier B.V.: 90–95. doi:10.1016/j.mex.2014.07.006.
- Marta, Ś, Beata Krawczyk, Marcin Olszewski, and Józef Kur. 2017. “Modified DNA Polymerases for PCR Troubleshooting,” 133–42. doi:10.1007/s13353-016-0371-4.
- McInerney, Peter, Paul Adams, Masood Z Hadi, Peter McInerney, Paul Adams, and Masood Z. Hadi. 2014. “Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase.” *Molecular Biology International* 2014: 287430. doi:10.1155/2014/287430.
- McInerney, Peter, Paul Adams, and Masood Z. Hadi. 2014. “Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase.” *Molecular Biology International* 2014: 1–8. doi:10.1155/2014/287430.
- Meng, L, Z Tian, Y Wang, Y Liu, and J Liu. 2015. “Predictive and Prognostic Molecular Markers for Cholangiocarcinoma in Han Chinese Population.” *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8: 13680–89. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26550313>.
- Menke TB, Warnecke JM. 2004. “Improved Conditions for Isolation and Quantification of RNA in Urine Specimens.” *Ann N Y Acad Sci.*, 185–89.
- Millikan, Robert C., Amanda J. Hummer, Mary S. Wolff, Asahi Hishida, and Colin B. Begg. 2005. “HER2 Codon 655 Polymorphism and Breast Cancer: Results from Kin-Cohort and Case-Control Analyses.” *Breast Cancer Research and Treatment* 89: 309–12. doi:10.1007/s10549-004-2171-5.
- Mitchell, Adele A, David J Cutler, and Aravinda Chakravarti. 2003. “Undetected Genotyping Errors Cause Apparent Overtransmission of Common Alleles in the Transmission / Disequilibrium Test,” 598–610.
- MMohamadhasan Tajadini, Mojtaba Panjehpour, and Shaghayegh Haghjooy Javanmard. 2015. “Comparison of SYBR Green and TaqMan Methods in Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction Analysis of Four Adenosine Receptor Subtypes.” *Adv Biomed Res* 4: 1–7. doi:10.4103/2277.
- Monis, Paul T., Steven Giglio, and Christopher P. Saint. 2005. “Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for Real-Time Polymerase Chain Reaction and Investigation of the Effect of Dye Concentration on Amplification and DNA Melting Curve Analysis.” *Analytical Biochemistry* 340: 24–34. doi:10.1016/j.ab.2005.01.046.
- Mühl, Helge, Anna-Julia Kochem, Claudia Disqué, and Samir G. Sakka. 2010. “Activity and DNA Contamination of Commercial Polymerase Chain Reaction Reagents for the Universal 16S rDNA Real-Time Polymerase Chain Reaction Detection of Bacterial Pathogens in Blood.” *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 66: 41–49. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2008.07.011.
- Myakishev, Maxim V, Yuri Khripin, Stella Hu, and Dean H Hamer. 2001. “High-Throughput SNP Genotyping by Allele-Specific PCR with Universal Energy-Transfer-Labeled Primers,” 163–69. doi:10.1101/gr.157901.
- Naidu, R., C. H. Yip, and N. A. Taib. 2008. “Polymorphisms of HER2 Ile655Val and Cyclin D1 (CCND1) G870A Are Not Associated with Breast Cancer Risk but Polymorphic Allele of HER2 Is Associated with Nodal Metastases.” *Neoplasia* 55: 87–95.
- Ng, Daniel P K, David Koh, Serena Choo, and Kee-Seng Chia. 2006. “Saliva as a Viable Alternative Source of Human Genomic DNA in Genetic Epidemiology.” *Clinica Chimica Acta* 367: 81–85. doi:10.1016/j.cca.2005.11.024.
- Nishimura, Naoyuki, Tomoko Nakayama, Hiroshi Tonoike, Kouichi Kojima, and Shingo Kato. 2000. “Direct Polymerase Chain Reaction from Whole Lood without DNA Isolation,” 674–80.
- Pikor, Larissa A, Katey S S Enfield, Heryet Cameron, and Wan L Lam. 2011. “DNA Extraction from Paraffin Embedded Material for Genetic and Epigenetic Analyses,” no. March: 15–17. doi:10.3791/2763.
- Pompanon, François, Aurélie Bonin, Eva Bellemain, and Pierre Taberlet. 2005. “Genotyping Errors: Causes,

- Consequences and Solutions.” *Nature Reviews Genetics* 6: 847–846. doi:10.1038/nrg1707.
- Rahman, Md Tahminur, Muhammed Salah Uddin, Razia Sultana, Arumina Moue, and Muntahina Setu. 2013. “Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review.” *Anwer Khan Modern Medical College Journal* 4: 30–36. doi:10.3329/akmmcj.v4i1.13682.
- Ray, Pierre F, and Alan H Handyside. 1996. “Increasing the Denaturation Temperature during the First Cycles of Amplification Reduces Allele Dropout from Single Cells for Preimplantation Genetic Diagnosis” 2 (3): 213–18.
- Rees, W a, T D Yager, J Korte, and P H von Hippel. 1993. “Betaine Can Eliminate the Base Pair Composition Dependence of DNA Melting.” *Biochemistry* 32: 137–44. doi:10.1021/bi00052a019.
- Ririe, K M, R P Rasmussen, and C T Wittwer. 1997. “Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction.” *Analytical Biochemistry* 245: 154–60. doi:10.1006/abio.1996.9916.
- Roux KH. 2009. “Optimization and Troubleshooting in PCR.” *Cold Spring Harb Protoc*.
- Rumsby, Gill. 2006. “An Introduction to PCR Techniques.” In *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 324:75–89. doi:10.1385/1-59259-986-9:75.
- Rys, P. N., and D. H. Persing. 1993. “Preventing False Positives: Quantitative Evaluation of Three Protocols for Inactivation of Polymerase Chain Reaction Amplification Products.” *Journal of Clinical Microbiology* 31: 2356–60.
- Saunders, Carol J, Michael J Friez, Melanie Patterson, and Masha Nzabi. 2010. “Allele Drop-Out in the MECP2 Gene Due to G-Quadruplex and I-Motif Sequences When Using Polymerase Chain” 14 (2): 241–47.
- Schrader, C, A Schielke, L Ellerbroek, and R Johne. 2012. “PCR Inhibitors – Occurrence, Properties and Removal.” doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.
- Seekhantod, Sirirat, Paninee Thavarungkul, and Nuntaree Chaichanawongsaroj. 2016. “Validation of a Multiplex Allele-Specific Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of KRAS Gene Mutations in from Colorectal Cancer Patients” 13: 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0147672.
- Sengüven, Burcu, Emre Baris, Tulin Oygur, and Mehmet Berktaş. 2014. “Comparison of Methods for the Extraction of DNA from Formalin-Fixed , Paraffin-Embedded Archival Tissues” 11. doi:10.7150/ijms.8842.
- Sharma, Ritu, Amardeep Singh, and Prabhjeet Singh. 2012. “Short Communication A Novel Method for Whole Blood PCR without Pretreatment.” *Gene* 501 (1). Elsevier B.V.: 85–88. doi:10.1016/j.gene.2012.03.065.
- Siddig, Awatif, Abdelrahim Osman Mohamed, Hamed Kamal, Salma Awad, Ahmed H Hassan, Erika Zilahi, Mohammed Al-Haj, Roos Bernsen, and Abdu Adem. 2008. “HER-2/neu Ile655Val Polymorphism and the Risk of Breast Cancer.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1138: 84–94. doi:10.1196/annals.1414.014.
- Sikora, M J, J N Thibert, and J Salter. 2010. “High-Efficiency Genotype Analysis from Formalin- Fixed , Paraffin-Embedded Tumor Tissues.” *The Pharmacogenomics Journal* 11 (5). Nature Publishing Group: 348–58. doi:10.1038/tpj.2010.50.
- Siravegna, Giulia, and Alberto Bardelli. 2016. “Blood Circulating Tumor DNA for Non-Invasive Genotyping of Colon Cancer Patients.” *Molecular Oncology*. doi:10.1016/j.molonc.2015.12.005.
- Sjoholm, Malin I L, Gunilla Hoffmann, Stefan Lindgren, Joakim Dillner, and Joyce Carlson. 2005. “Comparison of Archival Plasma and Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue for Genotyping in Hepatocellular Carcinoma” 14: 251–55.
- Terpe, Kay, Tli Vent, and Tma Uitma. 2013. “Overview of Thermostable DNA Polymerases for Classical PCR Applications : From Molecular and Biochemical Fundamentals to Commercial Systems,” 10243–54. doi:10.1007/s00253-013-5290-2.
- Tsiatis, Athanasios C., Alexis Norris-Kirby, Roy G. Rich, Michael J. Hafez, Christopher D. Gocke, James R. Eshleman, and Kathleen M. Murphy. 2010. “Comparison of Sanger Sequencing, Pyrosequencing, and Melting Curve Analysis for the Detection of KRAS Mutations.” *The Journal of Molecular*

- Diagnosics* 12: 425–32. doi:10.2353/jmoldx.2010.090188.
- Tuma, Rabiya S, Matthew P Beaudet, Xiaokui Jin, Laurie J Jones, Ching-ying Cheung, Stephen Yue, and Victoria L Singer. 1999. “Characterization of SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain : A Dye Optimized for Use with 300-Nm Ultraviolet Transilluminators” 288: 278–88.
- Walsh, P. Sean, Henry A. Erlich, and Russell Higuchi. 1992. “Preferential PCR Amplification of Alleles: Mechanisms and Solutions.” *Genome Research* 1: 241–50. doi:10.1101/gr.1.4.241.
- Wang, Jun, Karen Chuang, Mandeep Ahluwalia, Sarika Patel, Manette Umblas, Daniel Mirel, Russell Higuchi, and Soren Germer. 2005. “High-Throughput SNP Genotyping by Single-Tube PCR with Tm-Shift Primers.” *BioTechniques* 39: 885–92. doi:10.2144/000112028.
- Weiler, Natalie E C, Anuska S. Matai, and Titia Sijen. 2012. “Extended PCR Conditions to Reduce Drop-out Frequencies in Low Template STR Typing Including Unequal Mixtures.” *Forensic Science International: Genetics* 6: 102–7. doi:10.1016/j.fsigen.2011.03.002.
- Weissensteiner, Thomas, and Jerry S. Lanchbury. 1996. “Strategy for Controlling Preferential Amplification and Avoiding False Negatives in PCR Typing.” *BioTechniques* 21: 1102–8.
- Wenzel, J, Heidi Rossmann, Christian Fottner, Stefan Neuwirth, Carolin Neukirch, Peter Lohse, Julia K Bickmann, et al. 2009. “Identification and Prevention of Genotyping Errors Caused by G-Quadruplex – and I-Motif – Like Sequences METHODS :” 1371: 1361–71. doi:10.1373/clinchem.2008.118661.
- Wu YL, Sequist LV, Hu CP, Feng J, Lu S, Huang Y, Li W, Hou M, Schuler M, Mok T, Yamamoto N, O’Byrne K, Hirsh V, Gibson N, Massey D, Kim M, Yang JC. 2017. “EGFR Mutation Detection in Circulating Cell-Free DNA of Lung Adenocarcinoma Patients: Analysis of LUX-Lung 3 and 6.” *Br J Cancer*. Br J Cancer, 175–85.
- Xie, D, X O Shu, Z Deng, W Q Wen, K E Creek, Q Dai, Y T Gao, F Jin, and W Zheng. 2000. “Population-Based, Case-Control Study of HER2 Genetic Polymorphism and Breast Cancer Risk.” *J. Natl. Cancer Inst.* 92: 412–17. doi:10.1093/jnci/92.5.412.
- Yang, Young Geun, Jong Yeol Kim, Young-Han Song, Doo-Sik Kim. 2007. “A Novel Buffer System , AnyDirect , Can Improve Polymerase Chain Reaction from Whole Blood without DNA Isolation” 380: 112–17. doi:10.1016/j.cca.2007.01.019.