

Hubungan metode deparafinisasi dengan kuantitas dan kualitas ekstrak dna hasil isolasi dari sampel arsip jaringan dalam blok parafin terfiksasi formalin

Ray Suga Aulia Sentani¹, Zen Hafy², Subandrate³

¹ Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya

² Bagian Histologi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya

³ Bagian Biokimia dan Kimia Medik, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya

RaySuga_p7_xav1@yahoo.com

Abstrak

Kuantitas dan kualitas hasil ekstraksi DNA dari jaringan FFPE sangat tergantung dari proses awal yang harus dilakukan pada sampel sebelum masuk kedalam tahapan ekstraksi DNA. Proses awal yang sangat menentukan keberhasilan ekstraksi DNA ini adalah proses deparafinisasi, yaitu proses penghilangan parafin jaringan dari parafin. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan kualitas DNA yang diambil dari sampel arsip FFPE (*Formalin-fixed paraffin-embedded tissue*) dengan metode deparafinisasi menggunakan *xylene* dan *mineral oil* di RSUP Dr. Mohammad Hoesin Palembang. Sebanyak 16 sampel arsip FFPE diambil dari Laboratorium Patologi Anatomi RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang. Seluruh sampel kemudian dibagi menjadi 2 bagian sama rata kemudian dilakukan proses deparafinisasi menggunakan *xylene* dan *mineral oil*. DNA yang telah diisolasi akan diuji kuantitasnya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 260nm. Uji kualitas akan dilakukan dengan menghitung *OD Ratio* 260nm:280nm. Selain itu DNA juga akan diamplifikasi lalu dilakukan visualisasi dengan sinar UV. Konsentrasi yang didapatkan kemudian diuji dengan uji Wilcoxon dan menunjukkan adanya hubungan signifikan antara metode deparafinisasi dan konsentrasi yang didapat ($P=0.036$). Primer *beta-actin* (524bp) tidak ditemukan potongan gen yang diinginkan setelah elektroforesis, kemudian diuji dengan primer *Mitin* (142bp) menunjukkan potongan gen yang diinginkan pada saat elektroforesis dan visualisasi UV. Terdapat hubungan yang signifikan antara metode deparafinisasi FFPE dengan kuantitas dan kualitas DNA yang didapat.

Kata kunci: FFPE, Isolasi, DNA, *Beta-actin*, *Formalin fixed paraffin embedded Tissue*

Abstract

The quantity and quality of DNA extracted from FFPE tissue is highly dependent on the initial process that must be performed on the sample prior to entry into the DNA extraction stage. The initial process to determine the success of DNA extraction are deparaffinization process, namely the process of removal of paraffin from paraffin tissue. This study aimed to compare the quality of DNA extracted from samples archived FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded tissue) with deparaffinization method using *xylene* and *mineral oil* at the Hospital Dr. Mohammad Hoesin Palembang. A total of 16 samples were taken from archival FFPE Pathological Anatomy Laboratory dr. Mohammad Hoesin Palembang. The entire sample divided into two equal parts and then do deparaffinization process using *xylene* and *mineral oil*. The quantity of DNA isolated was tested using spectrophotometer with a wavelength of 260nm. Quality testing will be done by calculating the ratio OD 260nm: 280nm. Besides DNA will also be amplified and do visualization with UV light. Concentrations obtained were then tested by the Wilcoxon test and get the results that there is significant influence between methods deparaffinization concentrations obtained ($P = 0.036$). Primary *beta-actin* (524bp) that can not be found pieces of the gene of interest after electrophoresis, then tested with primary *Mitin* (142bp) to show pieces of the gene of interest at the time of electrophoresis and visualization UV. There is a significant relationship between deparaffinization FFPE method with the quantity and quality of DNA obtained.

Keywords: FFPE, Isolation, DNA, *Beta-actin*, *Formalin fixed paraffin embedded Tissue*

1. Pendahuluan

Perkembangan dan penyebaran penyakit dikarakterisasi berdasarkan penyimpangan genetik dan epigenetik termasuk penyusunan ulang kromosom, penambahan dan pengurangan DNA dan metilasi DNA. Kemajuan Teknologi profiling “*genome-wide*”, seperti mikro-arrays meningkatkan kemampuan kita untuk mengidentifikasi dan mendeteksi penyimpangan-penyimpangan spesifik. Teknologi telah berkembang, faktor pembatas yang dihadapi adalah terbatasnya sampel tersedia yang mempunyai kualitas baik¹.

Jaringan dalam blok parafin terfiksasi formalin atau FFPE (*Formalin-fixed paraffin-embedded tissue*) telah secara luas dan puluhan tahun digunakan dalam studi-studi imunohistokimia. Jaringan FFPE tidak hanya merupakan sediaan sampel jaringan yang bisa bertahan lama, tapi juga merupakan sumber material biologis berlimpah yang mudah didapat dan memiliki biaya rendah untuk penggunaan skala besar². Kuantitas dan kualitas hasil ekstraksi DNA dari jaringan FFPE sangat tergantung dari proses awal yang harus dilakukan pada sampel sebelum masuk kedalam tahapan ekstraksi DNA. Proses awal salah satunya yang sangat menentukan keberhasilan ekstraksi DNA ini adalah proses deparafinisasi, yaitu proses penghilangan parafin atau pembebasan jaringan dari parafin.³ Proses Berbagai teknik deparafinisasi sudah dipelajari dan dilaporkan dalam beberapa jurnal penelitian yang memberikan hasil beragam. Di antara metode deparafinisasi yang banyak dilaporkan adalah metode pemanasan kering, metode pemanasan dalam larutan dengan PH basa, dan dengan menggunakan larutan *Xylene* yang bersifat toksik. Saat ini sudah dikembangkan juga metode baru dengan menggunakan *Mineral Oil* yang tidak bersifat toksik dan diduga tidak mengganggu struktur DNA jaringannya.⁴ Minyak mineral dapat digunakan untuk menghilangkan lilin secara efektif dari sampel FFPE tanpa mempengaruhi kualitas DNA.

Walaupun berbagai metode deparafinisasi yang sudah dilaporkan, sejauh

ini belum ada yang membandingkan secara langsung kualitas dan kuantitas DNA hasil isolasi dari FFPE yang mendapat perlakuan deparafinisasi dengan larutan *xylene* dan larutan *mineral oil*. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui metode deparafinisasi yang mana di antara kedua metode di atas yang paling optimal dan efektif untuk mengekstraksi DNA dari jaringan FFPE yang tersimpan di Bagian Patologi Anatomi RSMH Palembang.

2. Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium berpembanding untuk membandingkan kualitas dan kuantitas ekstrak DNA hasil isolasi dari jaringan FFPE dengan metode deparafinisasi menggunakan larutan *xylene* dan deparafinisasi menggunakan *mineral oil*. Populasi penelitian ini adalah jaringan arsip FFPE yang tersimpan di Sentra Diagnostik Patologi Anatomi RSUP Dr. Moh. Hoesin (RSMH) Palembang. Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya (FK Unsri). Berdasarkan pertimbangan waktu dan biaya penelitian, sebanyak 16 sampel arsip jaringan FFPE yang berusia kurang dari 5 tahun akan diambil sebagai sampel dalam penelitian ini.

Data numerik dari kedua kelompok sampel penelitian ini akan dianalisis menggunakan uji *t* untuk sampel berpasangan (*paired t-test*). Apabila data tidak berdistribusi normal maka sebaiknya digunakan uji *Wilcoxon Signed Rank Test*. Data hasil pemeriksaan PCR yang bersifat dikotomi (postif dan negatif) akan dianalisis menggunakan uji McNemar (McNemar's test) untuk variable kategori berpasangan.⁵

3. Hasil

Dalam penelitian ini dilakukan perbedaan perlakuan pada metode deparafinisasi dengan menggunakan *mineral oil* dan *xylene*. Setelah proses Isolasi DNA telah dilakukan DNA siap untuk dianalisis dengan Spektrofotometer untuk mengetahui kuantitas dan kualitas DNA yang terkandung didalamnya. Hasil

spektrofotometri didapatkan data pada serapan 260 (A260), serapan 280 (A280), rasio A260/A280, dan konsentrasi DNA dalam ug/ml yang disajikan dalam Tabel 1 dan 2.

Tabel 1. Konsentrasi Isolat DNA

No.	Xylene			Mineral Oil				
	A260	A280	Rasio	Konsentrasi ug/ml	A260	A280	Rasio	Konsentrasi ug/ml
1	0.500	0.442	1.131	2500	0.296	0.260	1.138	1480
2	0.311	0.261	1.192	1555	0.265	0.234	1.132	1325
3	0.252	0.224	1.125	1260	0.296	0.273	1.084	1480
4	0.313	0.269	1.164	1565	0.284	0.240	1.183	1420
5	0.349	0.285	1.225	1745	0.250	0.227	1.101	1250
6	0.480	0.465	1.032	2400	0.258	0.230	1.122	1290
7	0.443	0.325	1.363	2215	0.249	0.226	1.102	1245
8	0.279	0.244	1.143	1395	0.229	0.209	1.096	1145
9	0.293	0.259	1.131	1465	0.450	0.408	1.103	2250
10	0.263	0.233	1.129	1315	0.266	0.242	1.099	1330
11	0.285	0.240	1.188	1425	0.218	0.198	1.101	1090
12	0.274	0.245	1.118	1370	0.280	0.245	1.143	1400
13	0.257	0.228	1.127	1285	0.240	0.218	1.101	1200
14	0.246	0.220	1.118	1230	0.235	0.215	1.093	1175
15	0.244	0.218	1.119	1220	0.255	0.230	1.109	1275
16	0.271	0.240	1.129	1355	0.243	0.217	1.120	1215

Tabel 2. Nilai rata-rata Konsentrasi Isolat DNA

Subjek	Perlakuan	
	Xylene	Mineral Oil
A260	0.316	0.269
A280	0.274	0.242
Rasio A260/280	1.152125	1.114188
Konsentrasi (ug/ml)	1581.25	1348.125

Hasil rata-rata data Spektrofotometri menunjukkan bahwa metode deparafinisasi dengan menggunakan *xylene* menghasilkan konsentrasi yang lebih tinggi daripada metode deparafinisasi dengan menggunakan *mineral oil* dengan perbedaan sebesar 233.13 ug/ml.

Sebelum dianalisis dengan uji beda rerata, uji normalitas telah dilakukan pada data rerata konsentrasi DNA hasil pengukuran dengan spektrofotometri untuk mengetahui apakah data tersebut terdistribusi normal. Hasil uji normalitas dicantumkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Uji Normalitas Kolmogorov - Smirnov

Kadar DNA (ug/ml)	Rata-Rata (Mean) ± SD	P value*
Xylene	1581.25±418.57	0,004
Mineral Oil	1348.125 ± 266.26	0,010

*Uji normalitas dengan Kolmogorov-Smirnov berdistribusi normal apabila $p > 0.05$

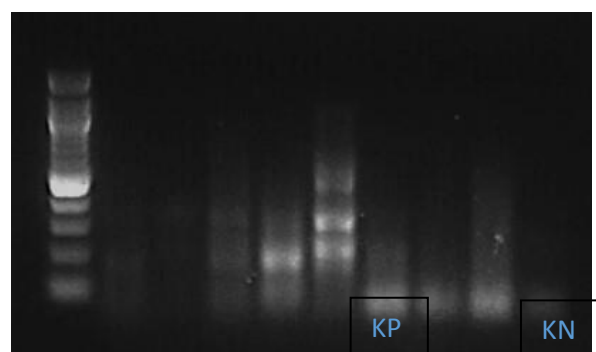
Dari analisis normalitas Kolmogorov-Smirnov didapatkan bahwa data berdistribusi tidak normal, maka pendekatan yang digunakan adalah analisis non-parametrik yaitu dengan menggunakan Wilcoxon test. Hasil Wilcoxon test disajikan dalam Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Wilcoxon Test

Kelompok	n	Rata-Rata (Mean) ± SD	P value*
Xylene	16	1581.25±418.57	0,036
Mineral Oil	16	1348.125 ± 266.26	

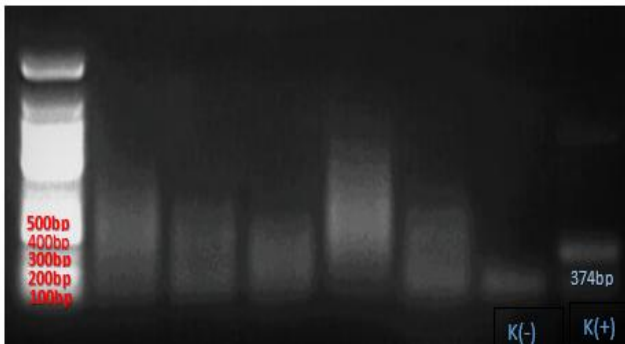
*Uji Wilcoxon test dengan $P < 0.05$

Berdasarkan hasil *Wilcoxon Signed Rank Test*, didapatkan nilai p value sebesar 0,036, di mana kurang dari batas kritis penelitian 0,05 menunjukkan terdapat hubungan bermakna kadar kuantitas DNA hasil isolasi dari FFPE antara kelompok perlakuan metode deparafinisasi *xylene* dan *mineral oil*. Elektroforesis dan visualisasi sampel menggunakan beta-actin didapatkan seluruh sampel dengan hasil negatif sehingga tidak bisa dianalisis hubungan kualitas DNA dengan metode deparafinisasi dengan menggunakan *xylene* maupun *mineral oil*.

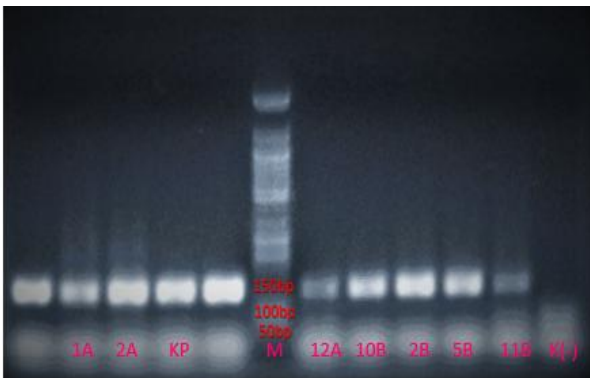


Gambar 1. Hasil elektroforesis menggunakan primer beta actin menunjukkan hasil negatif pada seluruh sampel pada ketinggian pita 564bp. Marker = DNA ladder 100bp.

Elektroforesis dan visualisasi sampel menggunakan primer MitND didapatkan seluruh sampel dengan hasil negatif sehingga tidak bisa dianalisis hubungan kualitas DNA dengan metode deparafinisasi menggunakan xylene dan mineral oil.



Gambar 2. Hasil elektroforesis menggunakan primer MitND menunjukkan hasil negatif pada seluruh sampel pada ketinggian pita 374pb. Marker = DNA ladder 50bp.



Gambar 3. Hasil elektroforesis menggunakan primer Mitin(142bp) Marker = DNA ladder 50bp.

Hasil elektroforesis dan visualisasi sampel menggunakan primer Mitin memiliki hasil positif dan negatif sehingga hubungan kualitas DNA dengan dapat dianalisis.

Hasil terlihat bahwa terdapat 10 sampel yang positif dan 6 sampel negatif dari perlakuan dengan menggunakan xylene,

sementara itu semua sampel (16) yang di deparafinisasi dengan mineral oil menunjukkan hasil yang positif. Hal ini menunjukkan bahwa kualitas DNA hasil deparafinisasi dengan mineral oil lebih baik dari pada dengan menggunakan xylene.

Berdasarkan hasil uji McNemar dan didapatkan hasil $P = 0.031$, menunjukkan adanya hubungan signifikan antara metode deparafinisasi menggunakan xylene dan mineral oil terhadap kualitas DNA hasil ekstraksi jaringan FFPE

Tabel 5. Kualitas DNA amplifikasi primer Mitin terhadap metode deparafinisasi menggunakan xylene dan mineral oil

Nomor	Kualitas DNA	
	Xylene	Mineral Oil
1	Positif (+)	Positif (+)
2	Positif (+)	Positif (+)
3	Positif (+)	Positif (+)
4	Negatif (-)	Positif (+)
5	Positif (+)	Positif (+)
6	Negatif (-)	Positif (+)
7	Positif (+)	Positif (+)
8	Negatif (-)	Positif (+)
9	Positif (+)	Positif (+)
10	Positif (+)	Positif (+)
11	Positif (+)	Positif (+)
12	Positif (+)	Positif (+)
13	Negatif (-)	Positif (+)
14	Positif (+)	Positif (+)
15	Negatif (-)	Positif (+)
16	Negatif (-)	Positif (+)

Tabel 6. Perbedaan kualitas DNA amplifikasi primer Mitin terhadap metode deparafinisasi menggunakan *xylene* dan *mineral oil*.

Kelompok Perlakuan	Negatif	Positif	Nilai P
Kualitas DNA Deparafinisasi dengan menggunakan <i>xylene</i>	6	10	0,031
Kualitas DNA Deparafinisasi dengan menggunakan <i>mineral oil</i>	0	16	

Hasil terlihat bahwa terdapat 10 sampel yang positif dan 6 sampel negatif dari perlakuan dengan menggunakan *xylene*, sementara itu semua sampel (16) yang di deparafinisasi dengan *mineral oil* menunjukkan hasil yang positif. Hal ini menunjukkan bahwa kualitas DNA hasil deparafinisasi dengan *mineral oil* lebih baik dari pada dengan menggunakan *xylene*.

Berdasarkan hasil uji *McNemar* dan didapatkan hasil $P = 0.031$, menunjukkan adanya hubungan signifikan antara metode deparafinisasi menggunakan *xylene* dan *mineral oil* terhadap kualitas DNA hasil ekstraksi jaringan *FFPE*

4. Pembahasan

Hasil yang didapatkan dari rata-rata konsentrasi DNA dengan perlakuan metode deparafinisasi dengan menggunakan *xylene* lebih banyak dibandingkan DNA dengan perlakuan metode deparafinisasi menggunakan *mineral oil* dengan perbedaan sebesar 233.13ug/ml. Kuantitas DNA metode *xylene* lebih baik dibandingkan dengan metode *mineral oil*. Hasil *Wilcoxon* test didapatkan nilai $P < 0.05$ yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antara kuantitas DNA dengan perlakuan metode deparafinisasi *xylene* dan *mineral oil*⁶. DNA hasil isolasi dilakukan cek kuantitas dan kualitas untuk melihat konsentrasi dan kemurniannya dengan menggunakan spektrofotometer dan gel elektroforesis. Pengukuran konsentrasi DNA dengan spektrofotometer dilakukan pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan protein diukur pada panjang gelombang 280.

Larutan DNA kemurniannya dapat dihitung melalui perbandingan A260 nm dengan A280 nm. Serapan 1 pada gelombang 260 nm yaitu **50ug**. Batas kemurnian yang biasa dipakai dalam analisis molekuler pada rasio A260/A280 adalah 1,8-2,0.⁷

Hasil PCR dan elektroforesis dengan 3 primer, hanya DNA yang di amplifikasi dengan primer Mitin (142bp) yang dapat menghasilkan gambaran pita saat elektroforesis, DNA yang di amplifikasi dengan primer Beta-actin (564bp) dan MitND (374bp) tidak menghasilkan gambaran pita saat elektroforesis. DNA telah mengalami defragmentasi sehingga DNA hanya dapat di amplifikasi dengan primer pendek sedangkan amplifikasi dengan primer panjang tidak bisa dilakukan⁸

Hasil uji *McNemar* menunjukkan adanya hubungan signifikan antara metode deparafinisasi menggunakan *xylene* dan *mineral oil* terhadap kualitas DNA hasil ekstraksi jaringan *FFPE*. Kualitas pita DNA yang dihasilkan dengan metode deparafinisasi dengan menggunakan *mineral oil* lebih baik dari pada menggunakan *xylene*⁹.

Hasil penelitian yang dilakukan secara kuantitas *xylene* lebih baik daripada *mineral oil*, namun, dari segi kualitas yang dinilai melalui visualisasi elektroforesis diketahui bahwa *mineral oil* lebih baik daripada *xylene*. Hasil pengukuran yang ditunjukkan oleh spektrofotometer merupakan nilai total serapan UV panjang gelombang 260 oleh keseluruhan atau asam nukleat yang terdapat di dalam sampel hasil ekstraksi yang diukur, yang bisa terdiri dari molekul DNA, potongan - potongan DNA yang sudah degradasi, molekul RNA, potongan RNA yang sudah terdegradasi, dan nukleoti data molekul lainnya yang mungkin bisa menyerap UV 260. Oleh karena itu, konsentrasi tinggi yang terbaca pada hasil spectrometer tidak bisa langsung menggambarkan seberapa baik kualitas molekul DNA nya atau integritas untai DNA nya. Konsentrasi DNA tinggi pada kelompok deparafinisasi dengan *xylene* hanya mengindikasikan kemampuan *xylene* yang

cukup baik untuk melepaskan DNA atau nukleat dari ikatan paraffin, namun bisa jadi karena sifatnya yang toksik terhadap jaringan larutan ini juga bisa merusak keutuhan fragmen/integritas DNA tersebut. *Mineral oil*, pelarut yang lebih natural ini mungkin tidak sekuat *xylene* dalam membebaskan semua DNA dari ikatan formalin, akan tetapi tidak toksik atau lebih aman bagi molekul DNA nyasendiri. Kualitas atau integritas molekul DNA yang sebenarnya baru baru bisa diketahui setelah diamplifikasi dengan PCR dilanjutkan dengan elektroforesis¹⁰.

Studi analisis DNA lebih baik menggunakan metode *mineral oil* walaupun dari segi kuantitas lebih baik *xylene*. Lin J *et al* (2009) proses deparafinisasi FFPE menggunakan *mineral oil* menghasilkan isolat DNA yang berkualitas¹¹.

5. Kesimpulan

Metode deparafinisasi menggunakan *mineral oil* menghasilkan kualitas yang lebih baik dikarenakan pelarut yang lebih natural ini tidak sekuat *xylene* dalam membebaskan semua DNA dari ikatan formalin, akan tetapi tidak toksik atau lebih aman bagi molekul DNA nya sendiri. *Xylene* memiliki kuantitas yang lebih baik mengindikasikan kemampuan *xylene* yang cukup baik untuk melepaskan DNA dari ikatan paraffin, namun sifatnya yang toksik terhadap jaringan larutan ini juga bisa merusak keutuhan fragmen / integritas DNA tersebut.

Daftar Pustaka

1. Harfriani, Analyses, J.Vis.Exp. 2011.DNA extraction from paraffin embedded material for genetic and epigenetic analyses. 26(49). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21490570>(Diakses 15 Agustus 2016).
2. Bancrooft, J. D.G.,Gamble ,M. 2002. Bancroft's Theory and practice of histological techniques. Elsevier Limited, China.
3. Campbell, N.A. & Reece, J.B. 2008. Biologi (edisi ke-8). Terjemahan Oleh: Wulandari, D. T. Erlangga, Jakarta, Indonesia, hal. 8-9 & 93.
4. Coleman, W.B., Tsongalis, G.J. 2010. Essential concepts in molecular pathology. Elsevier-Academic, Amsterdam.
5. Corkill, G., Rapley, R. 2008. The Manipulation of Nucleic Acids: Basic Tools and Techniques. Dalam: Walker, J.M., Rapley, R. (Editor). Molecular Biomethods Handbook (halaman 3-15). Humana Press, New Jersey, Amerika Serikat.
6. F. Lewis., N. J. Maughan., V. Smith., K. Hillan. 2001. Unlocking the archive – gene expression in paraffin embedded tissue.[http:// onlinelibrary.wiley.com /doi/10.1002/ 1096-9896 \(200109\) 195 :1 %3C66 : :AID-PATH 921 %3E3 .0.CO;2-F/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1096-9896(200109)195:1%3C66::AID-PATH921%3E3.0.CO;2-F/full)(Diakses 10 Agustus 2016).
7. Font, Aida., Frederic .Tort., Aleix ,Navarro-Sastre., Victoria, Cus., Judit,Garcia Villoria., Paz, Briones., and Antonia Ribes. 2011. Quantitative Analysis of mtDNA Content in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Muscle Tissue. JIMD ReportsDOI:10.1007/8904_2011_27. [http://www.ncbi.nlm.nih. Gov / pmc /articles /PMC3509826/ pdf/978- 3– 642 – 17708 - 8 Chapter 27.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.Gov/pmc/articles/PMC3509826/pdf/978-3-642-17708-8_Chapter_27.pdf)(Diakses 10 Agustus 2016).
8. Frederick, A. Bettelheim., Joseph, Marvin., Landesberg. 2007. *Laboratory Experiments for General, Organic And Biochemistry*. USA: Brooks.
9. Gilbert dkk. 2007. The Isolation of Nucleic Acids from Fixed, Paraffin-Embedded Tissues–Which Methods are Useful When?. [http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371%2Fjournal.pone.0000537](http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0000537)(Diakses 2 Agustus 2016).
10. Heikal, N., Nussenzveig, R.H., Agarwal, A.M. 2014. Deparaffinization with mineral oil: a simple procedure for extraction of

- high-quality DNA from archival formalin-fixed paraffin-embedded samples.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24897067>(Diakses 20 Agustus 2016).
11. Jianghai, Lin., Stephen,H, Kennedy., Therese,Svarovsky., Jeffrey, Rogers., Joseph, W,Kemnitz., Anlong, Xu., and Krina. T. Zondervan. 2009. High-quality genomic DNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded samples deparaffinized using mineral oil. Anal Biochem.US. 395(2): 265–267.
 12. Khosravinia, H et al. 2007. Optimazing Factors influencing DNA extraction from fresh whole from avian blood. African Journal of Technology.Vol. 6(4).
 13. Kokkat dkk. 2013. Archived Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Blocks: A Valuable Underexploited Resource for Extraction of DNA, RNA, and Protein. Biopreservation and Biobanking. Mary Ann Lieber Inc. Amerika Serikat. 11 (2): 101-106.
 14. Kumar, V., Abbas ,A.K., Fausto, N., Aster ,J.C. 2009. Robbins and Cotran Pathologic basis of disease. Saunders-Elsevier, Philadelphia.
 15. Ludyga, Natalie,Barbara, Grünwald.,Omid, Azimzadeh., Sonja ,Englert., Heinz, Höfler., Soile ,Tapio., Michaela, Aubele. 2012. Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. Virchows Arch (2012) 460:131–140.
 16. Luigi, Giacomazzi., P. Umari., and Alfredo Pasquarello. 2005. *Medium-Range Structural Properties of Vitreous Germania Obtained through First Principles Analysis of Vibrational Spectra*. Phys. Rev. Lett 95, 075505.
 17. Luke Doiron. 2015. Human Tissue Sample Blog:A Great Technique for Isolating DNA from FFPE Tissue.<http://www.conversantbio.com/blog/a-great-technique-for-isolating-dna-from-ffpe-tissue> (Diakses 7 Agustus 2016).
 18. Luke Doiron. 2014. Human Tissue Sample Blog: 4 Methods for Extracting DNA from FFPE Tissue Samples .<http://www.conversantbio.com/blog/bid/397111/4-methods-for-extractin-dna-from-ffpe-tissue-samples> (Diakses 7 Agustus 2016)
 19. Pikor, Larissa .A., Katey S.S. Enfield, Heryet ,Cameron., Wan L. Lam. 2011. DNA Extraction From Paraffin Embedded Material for Genetic and Epigenetic.
 20. Sambrook, J., Fritschi, E. F and Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 21. Surzycki, S. 2000. Basic Techniques in Molecular Biology: General Aspects of DNA Isolation and Purification. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, Amerika Serikat, hal. 1-2.
 22. Theophilus, B.D.M. 2008. Principles and Medical Applications of the Polymerase Chain Reaction. Dalam: Walker, J.M., Rapley, R. (Editor). Molecular Biomethods Handbook (halaman 29-31). Humana Press, New Jersey, Amerika Serikat.
 23. Qiagen. 2010. Unlocking Your FFPE Archive. <http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=200780> (Diakses 7 Agustus 2016).

