

Hubungan Lama Penyimpanan Sampel Arsip Jaringan dalam Blok Parafin Terfiksasi Formalin dengan Kualitas Hasil Ekstraksi DNA Mitokondria Jaringan

Zen Hafy¹, Veny Larasati¹, Riana Sari Puspita¹, Novizar S², Haekal M², Rafdi A², Sentani R²

¹Bagian Histologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya, Palembang, Indonesia

²Program Pendidikan Dokter Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya, Palembang, Indonesia
E-mail: zhafy@yahoo.com

Abstrak

Sampel arsip jaringan terfiksasi formalin dalam blok paraffin atau *Formalin-fixed paraffin-embedded* (FFPE) menyediakan sumber materi biologis yang melimpah dalam studi molekuler saat ini. Kualitas asam nukelat, terutama mtDNA yang diekstraksi dari jaringan FFPE dapat dipengaruhi oleh waktu penyimpanan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui apakah lama waktu penyimpanan jaringan FFPE mempengaruhi kualitas hasil ekstraksi mtDNA di Bagian Patologi Anatomi RSUP Dr. Mohammad Hoesin Palembang. DNA diekstraksi dari 16 sampel arsip FFPE yang diambil secara acak dari Laboratorium Patologi Anatomi RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang. Sampel tersebut dibagi menjadi dua kelompok berdasarkan lama waktu penyimpanan (kurang dari 1 tahun dan 1 sampai 5 tahun). Isolasi DNA dari kedua grup diamplifikasi menggunakan PCR dengan dua primer mitokondria yang didesain khusus masing-masing sepanjang 320 pb dan 142 pb. Visualisasi hasil PCR dilakukan dengan metode elektroforesis. Tidak ada sampel dari kedua kelompok lama waktu penyimpanan yang dapat diamplifikasi dengan menggunakan primer sepanjang 320pb. Namun, hasil PCR menggunakan primer 142 pb menunjukkan hasil yang positif pada semua sampel dari kedua kelompok lama waktu penyimpanan. Penelitian ini mengisyaratkan bahwa kualitas mtDNA hasil isolasi dari sampel arsip FFPE yang ada di Bagian Patologi Anatomi RSUP Dr. Mohammad Hoesin Palembang tidak dipengaruhi oleh lamanya waktu penyimpanan arsip. Lebih lanjut, penelitian ini menunjukkan bahwa mtDNA yang diekstraksi dari sampel arsip FFPE sudah mengalami degradasi sehingga kurang baik bila digunakan untuk analisis genetik yang membutuhkan amplicon DNA yang Panjang.

Kata kunci: FFPE, mtDNA, degradasi.

Abstract

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) archival tissue presents a readily available resource in molecular study nowadays. The quality of nucleic acid, especially mitochondrial DNA (mtDNA) extracted from FFPE tissue could be affected by the storage time. Thus, this study investigated if the FFPE tissue's storage time had an effect on the quality of the extracted mtDNA at Department of Pathology RSUP Dr. Mohammad Hoesin Palembang. DNA was extracted from 16 randomly selected archival FFPE tissues in Laboratory of Pathology Anatomy, RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang. The samples were grouped based on their storage time (less than 1 year and 1 to 5 yrs. old). The isolated DNA from each group was amplified using PCR with two primer pairs specifically design to amplify mtDNA of 320 bp and 142bp length, respectively. The PCR products were visualized by electrophoresis method. None of the samples from both groups could be amplified with the 320bp primers. However, the PCR result of the 149 bp primers showed positive for all of the samples from each study group. The study indicated that the storage time does not affect the quality of mtDNA isolated from the FFPE samples archived in Department of Pathology RSUP Dr. Mohammad Hoesin Palembang. Furthermore, the study showed that the mtDNA extracted from FFPE tissue has been degraded, therefore, the samples are not suitable for genetic studies require a long mtDNA amplicon.

Keywords: FFPE, mtDNA, Mito In, Mito ND

1. Pendahuluan

DNA mitokondria (mtDNA) manusia terletak di dalam matriks mitokondria pada sel eukariotik. MtDNA mempunyai jumlah salinan 1000-10.000, dan mempunyai ukuran yang relatif kecil yaitu 16.569 pasang basa.^{1,2} MtDNA telah banyak digunakan sebagai penanda molekul untuk studi genetika populasi, penelusuran asal-usul dan pelacakan beberapa penyakit degeneratif, penuaan, serta kanker yang terkait dengan garis keturunan ibu.^{3,4} MtDNA dapat diperoleh dari darah, jaringan baru hasil biopsi potong beku atau *fresh frozen tissue* dan arsip jaringan terfiksasi formalin dalam blok paraffin atau FFPE (*Formalin-fixed paraffin-embedded*). Sampel arsip FFPE sangat besar manfaatnya karena tersedia dalam jumlah yang banyak dan mudah diakses guna mempelajari berbagai biomarker untuk memfasilitasi prosedur diagnosis, terapi target, menentukan prognosis, serta dapat menjadi sumber tersedia bagi penelitian retrospektif skala besar.⁵ Namun demikian, tantangan utama penggunaan FFPE dalam penelitian genetik adalah sulitnya mendapatkan DNA yang berkualitas khususnya karena kerusakan DNA akibat proses fiksasi jaringan dengan formalin dan tentunya pengaruh kondisi dan lama waktu penyimpanan sampel arsip.

Molekul mtDNA yang tidak dilindungi oleh histon jauh lebih rentan terhadap kerusakan akibat proses fiksasi dengan formalin dibanding DNA inti.² Berbagai teknik ekstraksi mtDNA telah dikembangkan untuk mendapatkan isolat mtDNA dari jaringan FFPE agar bisa diperlakukan atau dianalisis lebih lanjut misalnya untuk diamplifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan lain-lain. Namun, untuk mendapatkan hasil ekstraksi mtDNA dari FFPE yang cukup baik secara kualitas dan integritas agar bisa dianalisis lebih lanjut masih merupakan tantangan tersendiri bagi para peneliti di bidang molekular. Umur atau lama waktu arsip jaringan blok parafin tersebut tersimpan

diyakini mempengaruhi kualitas dan integritas mtDNA hasil ekstraksi dari FFPE.⁶ Sampel DNA yang diekstraksi dari jaringan FFPE yang disimpan dalam periode waktu yang lama diyakini tidak terlalu cocok untuk analisis jika dibutuhkan molekul DNA yang lebih panjang.⁷ Walaupun demikian, beberapa penelitian yang membandingkan kualitas hasil ekstraksi DNA sampel arsip jaringan FFPE dengan lama penyimpanan berbeda justru melaporkan hasil yang sebaliknya, dimana sampel yang tersimpan lebih dari 10 ternyata menunjukkan kualitas hasil ekstraksi DNA yang sama baiknya dengan sampel baru.^{8,9}

Studi ini didesain untuk menganalisis kualitas mtDNA yang diisolasi dari sampel arsip jaringan FFPE baru dan lama yang tersimpan di bagian Patologi Anatomi RSMH Palembang.

2. Metode

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan desain pengambilan data potong lintang. Penelitian ini dirancang sebagai penelitian pendahuluan untuk melihat hubungan lama waktu penyimpanan arsip jaringan FFPE dengan kualitas ekstrak mtDNA.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekular FK Unsri dan Bagian Patologi Anatomi RSUP Dr. Mohammad Hoesin Palembang. Seluruh kegiatan dari mulai pengumpulan sampel, pengerjaan di laboratorium, pengumpulan data hingga analisis data dilaksanakan pada bulan September hingga November 2016. Populasi penelitian ini adalah jaringan arsip FFPE yang tersimpan di Bagian Patologi Anatomi RSUP Dr. Mohammad Hoesin Palembang. Sebagai penelitian pendahuluan, penelitian ini hanya akan mengambil sampel dalam jumlah tertentu dari populasi penelitian yang merepresentasikan variabel uji untuk tiap grup penelitian.

Sebanyak 16 sampel FFPE yang memenuhi kriteria inklusi telah dikumpulkan

dari Bagian Patologi Anatomi RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang pada November 2016. Sampel dipilih berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi. Sampel dibagi menjadi dua kelompok yaitu sampel dengan lama waktu penyimpanan kurang dari satu tahun dan sampel dengan lama waktu penyimpanan lebih dari satu tahun.

Setiap blok sampel dipotong secara seri sebanyak 10 potongan dengan ketebalan 8-10 mikrometer setiap potongannya dan dimasukkan ke dalam mikrotube 1.5ml. Sampel akan dideparafinasi dengan metode basah menggunakan cairan *xylene* atau *mineral oil* yang dilanjutkan dengan pencucian dengan etanol konsentrasi bertingkat, sampel-sampel disentrifugasi dan dikeringkan di suhu 37°C.

Sebanyak 20 ul enzim Proteinase K dan 200 ul larutan daparnya ditambahkan kedalam endapan sampel yang telah kering untuk diinkubasi di dalam inkubator. Setelah proses inkubasi, semua sampel akan diisolasi DNA nya dengan menggunakan QiaAMP DNA FFPE kit dari QiaGen. Isolat DNA kemudian diuji dengan spektrofotometri untuk mengetahui kemurnian DNA. Kemurnian DNA dinyatakan dengan membandingkan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (A260/A280).

Kualitas hasil isolat DNA akan dilihat dengan menggunakan metode *gel-based* PCR dengan menggunakan 2 pasangan primer hasil modifikasi yang dinamai Mito ND dan Mito IN yang menghasilkan amplicon masing-masing 320 pb dan 142 pb. Sikuen masing-masing pasangan primer sebagai berikut:

Mito ND:

5'-GTCATCTACTCTACCATCTT-3'

5'-TCGGGGGTATGCTGTTCG-3'

Mito IN:

5'-CTCAACTTAGTATTATACCC-3'

5'GGAAATACTTGATGGCAGCT-3'

PCR dari hasil isolasi DNA dilakukan dengan volume total PCR 50µL terdiri dari 1

µl primer (1,5 µg/ml), 1 µl (200 µM) *deoxynucleoside triphosphates* (dNTPs), 5 µl *buffer* PCR (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3), 1,5 µl (2.5 mM) MgCl₂, 0,2 µl (1 unit) *Taq polymerase*, 5µl *DNA template* dan ditambah air sampai volume 50 µl. Campuran tersebut diamplifikasi menggunakan mesin *PCR i-cycler Biorad* (*Biorad System, USA*). PCR dilakukan dengan 2 macam pasangan *primer* untuk memastikan bahwa area target benar-benar dapat diidentifikasi. Sampel DNA diamplifikasi sebanyak 35 siklus dengan kondisi amplifikasi: denaturasi awal 94°C selama 4 menit yang dilanjutkan dengan denaturasi 94°C selama 45 detik, tahap *annealing* primer 54 °C selama 1 menit 15 detik dan pemanjangan (ekstensi) DNA pada 72 °C selama 45 detik. Pada akhir siklus ke 35 dilakukan penambahan waktu ekstensi 72 °C selama 8 menit.

Hasil PCR dilihat kualitasnya menggunakan teknik elektroforesis pada gel agarose konsentrasi 1.5% yang diberikan ethidium bromide untuk selanjutnya divisualisasi dengan sinar UV pada mesin GelDoc (*Biorad*).

3. Hasil

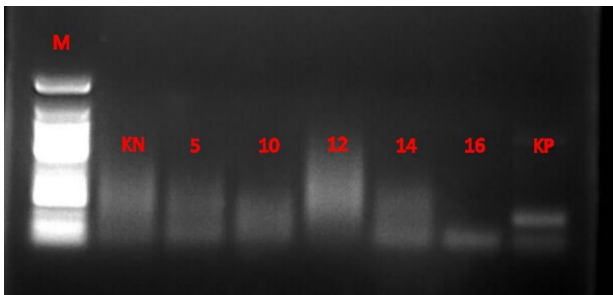
Penilaian kualitas kemurnian DNA hasil isolasi dinilai dengan membandingkan pembacaan DNA pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (A260/A280). Hasil rata-rata pengukuran spektrofotometri pada kedua kelompok sampel tidak jauh berbeda. Nilai rata-rata hasil spektrofotometri disajikan dalam tabel 1.

Tabel 1. Nilai rata-rata hasil spektrofotometri

Subjek	Usia Penyimpanan FFPE	
	< 1 tahun	> 1 tahun
A260	0.32250	0.26288
A280	0.27363	0.23300
Rasio A260/280	1.17212	1.12750

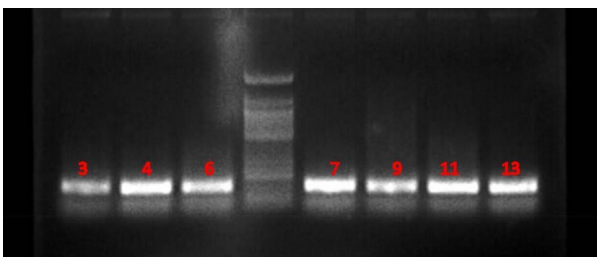
Visualisasi hasil PCR dengan primer Mito ND yang diharapkan akan menghasilkan amplicon

sepanjang 320 pb ternyata menunjukkan hasil negatif pada semua sampel penelitian pada dua kelompok lama waktu penyimpanan. Hasil visualisasi hanya terlihat berupa sebaran DNA dan fragmen - fragmen DNA yang tidak spesifik. Visualisasi hasil PCR dengan primer Mito ND menggunakan elektroforesis disajikan dalam gambar 1.



Gambar 1. Hasil elektroforesis menggunakan primer Mito ND menunjukkan hasil negatif pada seluruh sampel pada ketinggian pita DNA 320 bp. M = DNA Marker 50 bp. M adalah Marker dan KP adalah Kontrol Positif

Sebaliknya, visualisasi elektroforesis untuk produk PCR dengan primer Mito In menunjukkan hasil positif pada semua sampel penelitian, yaitu dengan didapatkannya pita DNA sepanjang 142 bp pada semua sampel. Visualisasi hasil PCR dengan primer Mito In menggunakan elektroforesis disajikan dalam gambar 2.



Gambar 2. Hasil elektroforesis menggunakan primer Mito In menunjukkan hasil positif pada seluruh sampel pada ketinggian pita DNA 142 bp. M = DNA Marker 50 bp.

4. Pembahasan

Formalin fixation and paraffin embedding (FFPE) merupakan salah satu metode

penyimpanan sampel arsip yang dapat digunakan untuk menyimpan sampel arsip dalam jangka waktu lama di Bagian Patologi Anatomi. Penyimpanan dalam bentuk blok FFPE ini memungkinkan suatu sampel jaringan dapat disimpan selama bertahun-tahun. Blok FFPE di RSUP Dr. Mohammad Hoesin Palembang menyimpan sampel-sampel jaringan dengan penyakit degeneratif yang sangat banyak dan dapat menjadi sumber ilmu pengetahuan yang melimpah, sehingga sangat penting untuk mengetahui kualitas DNA dari blok FFPE tersebut. Umur atau lama waktu arsip jaringan blok parafin tersebut tersimpan diyakini memengaruhi kualitas dan integritas mtDNA hasil ekstraksi dari FFPE.⁶ Oleh karena itu, mengetahui hubungan lama waktu penyimpanan dengan kualitas mtDNA hasil ekstraksi dari FFPE di bagian Patologi Anatomi RSUP Dr. Mohammad Hoesin Palembang merupakan suatu hal yang esensial bagi penelitian di bidang biologimolekuler.

Untuk dapat menganalisis isolat DNA dari blok FFPE perlu dilakukan proses ekstraksi DNA berupa deparafinisasi dan isolasi DNA. Setelah dideparafinisasi dan dilakukan isolasi DNA, isolat DNA kemudian diuji dengan spektrofotometri untuk mengetahui kemurnian DNA. Kemurnian DNA dinyatakan dengan membandingkan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (A260/A280).

Pada penelitian ini, hasil pengukuran spektrofotometri yang dilakukan pada isolat DNA dari 16 sampel arsip FFPE, menunjukkan kadar kemurnian yang kurang baik karena semuanya berada di rentang rasio 1.6-2.0 yang merupakan rentang ideal nilai pengukuran DNA. Rendahnya tingkat kemurnian isolat DNA bisa disebabkan oleh kontaminasi protein dan molekul lain yang tidak hilang saat dilakukan isolasi. Terlepas dari rendahnya kualitas DNA hasil isolasi, bila dilihat hasil pengukuran rata-rata untuk setiap sampel seperti yang ditunjukkan tabel 1 di

atas, ternyata isolat DNA dari FFPE yang disimpan dibawah satu tahun memiliki kemurnian yang relatif lebih tinggi dibandingkan dengan yang disimpan lebih dari satu tahun.

Kemurnian isolat DNA dari blok FFPE dapat dipengaruhi oleh banyak faktor, seperti proses fiksasi dengan formalin, teknik isolasi dan purifikasi DNA yang belum sempurna, dan beberapa faktor teknis lainnya. Proses fiksasi dengan formalin membuat *crosslinking* antara asam nukleat dan protein. Semakin lama waktu penyimpanan maka akan semakin kuat *crosslink* yang terjadi. Selain itu, teknik isolasi dan purifikasi yang kurang tepat dan tidak sempurna juga mempengaruhi tingkat pelepasan *crosslinking* antara asam nukleat dan protein.⁶

Pengujian kualitas isolat DNA menggunakan teknik PCR dan elektroforesis menunjukkan pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan 2 jenis primer, yaitu primer Mito ND (320 bp) dan Mito In (149 bp). Penggunaan 2 pasang primer dengan ukuran berbeda ini untuk melihat seberapa besar fragmentasi molekul-molekul DNA yang umumnya mengalami degradasi akibat proses parafinasi dan fiksasi dengan formalin. Sampel hasil amplifikasi PCR kemudian dielektroforesis. Pada umumnya bila molekul DNA mulai mengalami degradasi atau kerusakan maka molekulnya akan terpotong-potong atau terfragmentasi oleh enzim endonuklease sehingga biasanya hanya fragmen-fragmen DNA yang berukuran kurang dari 200pb yang masih bisa diamplifikasi dengan PCR. Pada kerusakan tingkat lanjut, DNA akan benar-benar terdegradasi akibat masifnya aktifitas enzim eks nuklease yang akan mengurai satu demi satu basa-basa nukleotida DNA tersebut. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa semua sampel arsip sampel FFPE pada penelitian ini sudah mengalami fragmentasi pada DNA nya sehingga hasil amplifikasi untuk ampikon

sepanjang 320pb tidak didapatkan pada semua sampel penelitian baik yang berusia di bawah satu tahun maupun di atas satu tahun. Walaupun demikian, amplifikasi untuk ampikon berukuran 149 menunjukkan hasil yang positif dan berkualitas baik untuk semua sampel.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semua sampel pada penelitian ini baik itu kelompok sampel yang kurang dari setahun maupun lebih dari setahun penyimpanannya sudah mulai mengalami fragmentasi. Dengan kata lain, penelitian ini mengisyaratkan waktu penyimpanan atau umur sampel arsip tidak memberikan pengaruh langsung terhadap intergritas atau kualitas mtDNA pada sampel arsip FFPE penelitian ini. Kesimpulan ini sejalan dengan sejumlah penelitian terdahulu yang dilakukan di beberapa negara. Lin dan kawan-kawan melaporkan bahwa DNA dari seluruh sampel arsip FFPE yang diujinya dari tahun penyimpanan yang berbeda, ternyata hanya dapat diamplifikasi secara efektif sampai ukuran 191bp, Lin juga menyimpulkan bahwa isolat DNA dari FFPE hanya baik untuk analisis tingkat genetik yang hanya membutuhkan molekul DNA yang pendek, seperti *Single Nucleotide Polymorphism*, *Micosatelite*, dan *methylation status analyses*.⁷ Ludyga dan kawan-kawan melaporkan bahwa total DNA hasil isolasi dari sampel arsip FFPE yang berusia 40 tahun relatif memiliki kualitas yang sama dibandingkan dengan sampel arsip FFPE usia 10 tahun.⁹ Penelitian yang dilakukan Kokkat dan kawan-kawan yang membandingkan hasil ekstraksi DNA jaringan FFPE dari arsip jaringan parafin yang berusia antara 2001– 2013, juga tidak mendapatkan perbedaan yang signifikan pada kualitas DNA antara sampel arsip yang berusia beberapa tahun dengan arsip jaringan FFPE yang baru disimpan selama 1–2 bulan.⁸

Fragmentasi DNA ini dapat disebabkan oleh banyak faktor, Selain umur atau lama waktu penyimpanan, terdapat faktor lain yang

dapat memengaruhi validitas hasil penelitian kualitas DNA dalam FFPE yaitu kondisi ketika dilakukan fiksasi formalin pada proses pembuatan, iklim, pH, suhu dan kelembapan lingkungan penyimpanan FFPE.^{6,10} Secara umum digambarkan bahwa ada 3 faktor yang dapat menyebabkan DNA terfragmentasi di dalam FFPE, yaitu faktor proses pra-fiksasi, faktor fiksasi dan parafinisasi, dan faktor post-fiksasi. Selain proses fiksasi, proses ekstraksi juga dapat mempengaruhi terjadinya degradasi DNA seperti faktor *pre-treatment*, faktor metode ekstraksi, dan faktor manipulasi DNA post-ekstraksi.¹⁰

5. Kesimpulan

Secara keseluruhan dari penelitian ini diketahui bahwa hubungan kualitas mtDNA tidak tergantung dari lama waktu penyimpanan sampel arsip FFPE. Sebagai penelitian pendahuluan dengan jumlah sampel yang terbatas tentunya penelitian ini belum bisa menyatakan bahwa semua sampel arsip FFPE yang tersimpan di tempat penelitian dilaksanakan memiliki kualitas DNA yang kurang baik. Setidaknya hasil penelitian ini bisa memberikan masukan yang berarti bagi penelitian-penelitian genetik selanjutnya yang akan menggunakan sampel arsip FFPE di lingkungan tempat penelitian ini sehingga bisa lebih menyesuaikan metode analisis yang akan dilakukan.

Daftar Pustaka

1. Clayton, D. A. Mitochondrial DNA Replication. *DNA Replication Eukaryot. Cell* 1015–1027 (1996).
2. Clayton, D. A. Mitochondrial DNA replication: What we know. *IUBMB Life*, 55(4–5), 213–217. (2003)
3. Jakupciak, J. P., Dakubo, G. D., Maragh, S. & Parr, R. L. Analysis of potential cancer biomarkers in mitochondrial DNA. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 8, 500–506 (2006).
4. Cza as rnecka, A. M., Gammazza, A. M., Felice, V. Di, Zummo, G., & Cappello, F. (2007). Cancer as a “Mitochondriopathy.” *Journal of Cancer Molecules*, 71–79.
5. Font, A., Tort, F., Navarro-Sastre, A., Cusi', V., Garcia-Villoria, J., Briones, P., Ribes, A. Quantitative Analysis of mtDNA Content in Formalin-Fixed Parffin-Embedded Muscle Tissue. *JIMD Reports* 125 -129 (2011).
6. Xie, R., Chung, JY., Ylaya, K., Williams R. L., Guerero, N., Nakatsuka, N., Badie, C., Hewitt, M. S., Factors Influencing the Degradation of Archival Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Sections. *J. Histochem. Cytochem.* 59, 356–365 (2011).
7. Lin, J., Kennedy, S. H., Svarovsky. T., Rogers, J., Kemnitz, J. W., Xu, A., Zondervan, K. T. High-quality genomic DNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded samples deparaffinized using mineral oil. *Anal. Biochem.* 395, 265–267 (2009).
8. Kokkat, T. J., Patel, M. S., McGarvey, D., LiVolsi, V. A. & Baloch, Z. W. Archived Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Blocks: A Valuable Underexploited Resource for Extraction of DNA, RNA, and Protein. *Biopreserv. Biobank.* 11, 101–106 (2013).
9. Ludyga, N., Grunwald, B., Azimzadeh, O., Englesrt, S., Hofler, H., Tapio, S., Aubele, M. Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. *Virchows Arch.* 460, 131–140 (2012).
10. Gilbert, M. T. P., Haselkorn, T., Bunce, M., Sanchez, J. J., Lucas, S. B., Jewell, L. D., ... Worobey, M. (2007). The Isolation of Nucleic Acids from Fixed, Paraffin-Embedded Tissues-Which Methods Are Useful When? *PLoS ONE*, 2(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000537>