

OPTIMALISASI KONSENTRASI POLIAKRILAMID UNTUK DETEKSI MUTASI GEN PADA METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION-SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM* (PCR-SSCP) DAN UJI PELABELAN ISOTOPIKNYA

Mukh Syaifudin¹⁾, Yunus Muhadi²⁾, Riskiono Slamet²⁾ dan Teja Kisananto¹⁾

1) Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi, Badan Tenaga Nuklir Nasional, Jakarta

2) Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta, Jakarta
email: mukh_syaifudin@batan.go.id

Abstract

Single strand conformation polymorphism (SSCP) method is one of further analysis methods in genetics that use polymerase chain reaction (PCR) product for fast detection of genetic mutation based on the alteration of nucleic acid migration on non denatured polyacrylamide gel. This method is also widely used in biodiversity study. Aim of the research was to get an optimal concentration of acrylamide so that the best visualization of deoxyribonucleic acid (DNA) was obtained. Gel was made in certain composition by varying the percentage of acrylamide-bis-acrylamide monomer between 15 to 30% (percentage of volume) and followed by electrophoresis of single strand DNA for a certain time and visualized. The additional of glycerol was also examined at one concentration. Results showed that the best concentration was found at 25% of acrylamide without glycerol. Test on the isotopic labeling of DNA with 0.1 μ Ci of P-32-dCTP and autoradiography showed a better quality in visualization compared to that of non-labeled one.

Keywords: polyacrylamide, gene mutation, PCR-SSCP

1. PENDAHULUAN

Teknik molekuler *polymerase chain reaction* (PCR) dan metode berbasis PCR telah dimanfaatkan secara luas untuk memahami patogenesis dan dasar-dasar genetika sel kanker, yakni kelainan sel akibat terjadinya mutasi gen kunci yang bertanggung jawab dalam pengendalian siklus sel [1,2]. Penelusuran mekanisme molekuler yang melatar belakangi resistensi bakteri terhadap obat antimikroba juga memanfaatkan metode ini [3-5]. PCR-SSCP juga telah digunakan dalam studi biodiversitas yakni untuk mengidentifikasi lokus-lokus gen yang bertanggung jawab terhadap variasi sifat yang memiliki nilai ekonomi penting (*quantitative trait loci*), antara lain untuk pemuliaan hewan guna memperoleh suatu individu unggul [6].

PCR-SSCP merupakan metode yang sangat luas yang didasarkan pada perubahan mobilitas pita asam deoksiribonukleat (DNA) pada gel poliakrilamida non denaturasi yang dapat diakibatkan oleh perubahan hanya pada satu nukleotida. Kelebihan lain dari SSCP adalah dapat diketahuinya jenis-jenis mutasi secara sekaligus dan merupakan metode yang jauh lebih efisien untuk mengetahui *polymorphism* suatu lokus inti [7,8]. Pola migrasi DNA yang karakteristik terbentuk sesuai dengan variasi konformasi yang terjadi karena susunan nukleotida dari rantai tunggal DNA. Dengan demikian prinsip metode SSCP adalah pita-pita tunggal DNA akan memberikan konformasi berbeda, yang dapat disebabkan adanya mutasi basa tunggal, dan dapat dideteksi dengan perubahan laju

migrasi pada gel [9].

Gel poliakrilamida adalah gel yang secara kimia terbentuk dari polimerisasi akrilamid yang berikatan secara *cross-link* dengan *N,N'-methylenebisacrylamide*. Reaksinya adalah polimerisasi radikal bebas dengan bantuan ammonium persulfat (APS) sebagai inisiator dan *N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine* (TEMED) sebagai katalis [10]. Karena gel poliakrilamid dapat memisahkan DNA dengan resolusi tinggi dan hasilnya sangat murni, maka sangat baik digunakan untuk analisa molekuler lanjut. Para peneliti mencoba menemukan suatu formula atau komposisi gel akrilamid untuk memperoleh kualitas yang baik dan uji efisiensi lainnya, antara lain penambahan polietilen glikol, gliserol, variasi konsentrasi akrilamid, dan suhu elektroforesis [11-12].

Beberapa peneliti juga melakukannya dengan melabel DNA menggunakan isotop P-32 untuk memperoleh kualitas yang baik [3,13,14]. Selama beberapa dekade terakhir, perspektif aplikasi radioisotop telah mengalami transformasi total, selain digunakan dalam pencitraan untuk memperoleh informasi fungsional suatu senyawa, juga untuk mendalami berbagai macam proses fisiologi dan patologi. Pelabelan radioisotop dalam biologi molekuler, imunologi dan biokimia pun dimaksudkan untuk menelusuri fenomena mendasar suatu penyakit yang ditunjang dengan perkembangan yang menakjubkan akan senyawa yang dilabel radioisotop dengan desain yang baik. Aplikasi dalam rekayasa genetik, genomik dan proteomik telah lebih luas lagi seperti untuk pelabelan biomolekul antibodi,

oligonukleotida, peptida, dan lain sebagainya [15]. Dalam makalah ini disajikan hasil penelitian konsentrasi monomer akrilamid yang menghasilkan visualisasi terbaik dan uji pelabelan isotopik.

2. METODOLOGI

DNA dan amplifikasi PCR

Ekstrak DNA yang digunakan dalam PCR-SSCP ini adalah ekstrak dari isolat klinis sputum mengandung *M. tuberculosis* dan ekstraksi dilakukan sesuai dengan cara sebelumnya [16]. Sel dilisis dengan larutan Tris-HCl, guanidin tiosianat sebagai *chaotropic agent*, EDTA, dan triton X-100. Ekstraksi, presipitasi DNA masing-masing dilakukan dengan larutan diatom dan aseton, etanol 70% serta sentrifugasi dengan kecepatan tinggi. DNA dilusi dengan buffer TE 1X. Ekstrak DNA diamplifikasi dengan metode PCR menggunakan pasangan primer MF-MR menggunakan tabung PCR pre-mix (Accu Power PCR Premix; Bioneer, Daejeon, Korea) yang terdiri dari 50mM Tris-HCl (pH 8,3), 40 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 250 µM dNTP, 1U *Taq* DNA polymerase dan *gel loading dye*. Primer (20 pmol) dan DNA target di tambahkan dalam campuran tersebut sehingga volume menjadi 20 µl. Amplifikasi meliputi tahap denaturasi awal pada suhu 95°C, 5 menit 1 siklus, dilanjutkan dengan 30 siklus yang tiap siklus meliputi tahap denaturasi : 95°C, 30 detik, *annealing* 60°C, 30 detik dan *extension*, 72°C, 45 detik, diakhiri dengan *extended extension* pada 72°C, 5 menit, 1 siklus. Hasil PCR dideteksi dengan elektroforesis gel agarosa 1,5%. Hasil amplifikasi sampel dan kontrol positif (berukuran 342 pasang basa) digunakan untuk proses SSCP.

Pembuatan gel akrilamida

Disusun peralatan untuk membuat gel dengan menyusun pelat kaca dan *spacer* pada *gel casting* sedemikian sehingga tidak ada kebocoran. Setelah itu gel dibuat dengan mencampur antara larutan MDE (*mutation detection enhancement*) 2X dengan variasi konsentrasi volume (1,55; 2,0; 2,5 dan 3,0 ml terhadap volume total) sehingga terdapat variasi konsentrasi volume masing-masing (15, 20, 25 dan 30%) dengan akuabidest dan larutan TBE 10X serta amonium persulfat (APS) 10%+TEMED. Karena konsentrasi MDE yang digunakan adalah 30% maka konsentrasi akrilamid-bis-akrilamid dari konsentrasi volume 15, 20, 25 dan 30% adalah 4,5; 6,0; 7,5 dan 9%. Adapun komposisi masing-masing komponen disajikan dalam Tabel 1 untuk dua *plate* gel. Pada satu percobaan, ke dalam campuran akrilamida 25% ditambahkan gliserol dengan konsentrasi volume 10%.

Analisis SSCP untuk deteksi mutasi gen.

Analisis SSCP dilakukan dengan mengikuti prosedur standard [17,18]. Sebanyak 7 µl DNA produk PCR (konsentrasi sama atau hampir sama) dicampur dengan 7 µl SSCP *loading dye* (95% formamide (Biorad) dan 5% 10X *blue juice*). Sampel didenaturasi

pada 95°C selama 4-5 menit, kemudian diletakkan di atas es dan dielektroforesis pada gel poliakrilamid dalam larutan 0,5X TBE dengan variasi konsentrasi volume MDE (2X MDE™ gel (FMC BioProducts, Rockland, ME, USA) pada voltase 100 Volt, suhu kamar selama 1 jam. Pada satu percobaan, elektroforesis dilakukan pada ruangan dingin (4°C) selama semalam (8 jam). Setelah dielektroforesis, gel diambil dan direndam dalam larutan etidium bromida (1 µg/ml) selama 15 menit dan akiabisdes 20 menit, kemudian dilakukan visualisasi pada UV transiluminator dan pemotretan dengan kamera Polaroid dilengkapi printer elektrik (Mitsubishi).

Tabel 1. Komposisi masing-masing komponen untuk pembuatan gel akrilamida.

% volume total	Aquabi -dest (ml)	MDE (ml)	TBE 10X (ml)	APS 10% (µl)	TE- MED (µl)
15	7,80	1,55	0,60	40	4
20	7,36	2,00	0,60	40	4
25	6,86	2,50	0,60	40	4
30	6,36	3,00	0,60	40	4
Volume total : 10,004 ml					

Untuk uji analisis SSCP radioaktif dilakukan dengan mengikuti prosedur standard di atas tetapi pada saat amplifikasi DNA dengan PCR dilakukan penambahan dCTP berlabel isotop P-32 dengan aktivitas 0,1 µCi per sampel dengan sistem proteksi radiasi yang memadai. Kondisi proses PCR sama seperti PCR non isotopik. Selanjutnya DNA berlabel P-32 dielektroforesis pada satu konsentrasi volume gel akrilamid (25%) selama 1 jam dan dilakukan proses autoradiografi sesuai prosedur standard.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

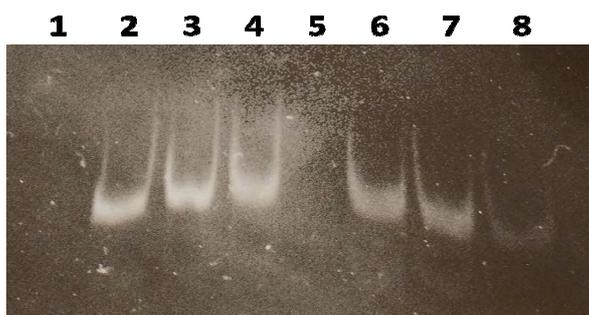
Hasil elektroforesis pada medium gel poliakrilamid dengan konsentrasi 15% dapat dilihat pada Gambar 1. Pita-pita DNA pada gel poliakrilamid konsentrasi 15% terlihat tidak jelas (samar), bahkan bisa dikatakan tidak muncul. Hal ini disebabkan karena konsentrasi dari akrilamid dalam matriks gel yang rendah dimana ikatan-ikatan antar monomer maupun monomer dengan *crosslinker*-nya tidak baik. Rongga-rongga yang terbentuk dari hasil-hasil ikatan antar monomer maupun monomer dengan *crosslink*-nya rendah, sehingga untai tunggal DNA tidak dapat dengan mudah melewati rongga-rongga (poros) pada gel poliakrilamid 15% [11, 19]. Sifat hidrogel akrilamid bergantung pada konsentrasi monomer, dimana untuk gel dengan konsentrasi monomer rendah maka akan lebih lemah yang menyebabkan lemahnya daya penetrasi rantai polimer dalam suatu jejaring kerja (*network*). Air paling umum digunakan sebagai medium reaksi polimerisasi karena lebih murah dan tidak beracun [20]. Terlebih lagi gel ini biasanya digunakan dalam lingkungan berair.

Hasil elektroforesis dengan menggunakan gel poliakrilamid konsentrasi 20% dapat dilihat pada Gambar 2. Pita-pita DNA masih belum jelas terlihat dan sedikit membelok serta tidak terlihat masing-masing untai tunggal DNA. Meskipun demikian pita-pita DNA pada gel poliakrilamid konsentrasi 20% terlihat lebih jelas dibandingkan dengan gel konsentrasi 15%, hal ini disebabkan naiknya konsentrasi akrilamid atau naiknya jumlah rongga-rongga dalam matrik gel untuk dilalui molekul DNA. Selain itu mobilitas pita-pita tunggal DNA sampel yang terlihat tidak menunjukkan adanya mobilitas *single strand* yang menjadi ciri khas (khusus) dari teknik analisis SSCP [11, 12, 19].

Hasil elektroforesis dengan gel poliakrilamid konsentrasi 25% dapat dilihat pada Gambar 3. Terlihat mobilitas pita-pita DNA pada semua kolom dan *marker* DNA (M) kecuali no 1 dan 7 yang mungkin disebabkan karena kesalahan teknis. Pita-pita DNA pada gel poliakrilamid konsentrasi 25% lebih baik dibandingkan dengan konsentrasi 20% dan 15% dima-



Gambar 1. Hasil visualisasi gel poliakrilamid dengan konsentrasi 15%.

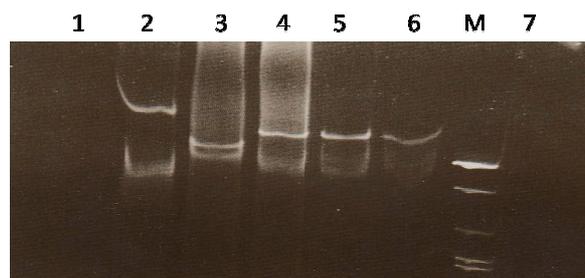


Gambar 2. Hasil visualisasi gel poliakrilamid dengan konsentrasi 20%.

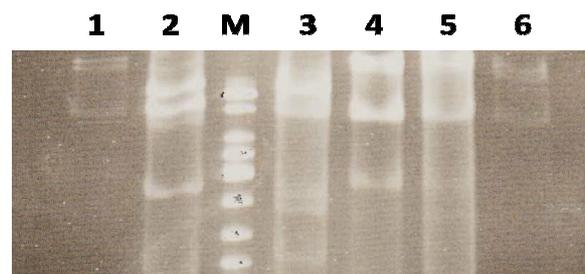
na pada konsentrasi gel poliakrilamid 25% pita-pita DNA terlihat jelas, beberapa diantaranya diduga mengandung mutasi gen. Selain konsentrasi gel poliakrilamid terdapat pengaruh lain seperti efek pemanasan juga dapat mengakibatkan tidak timbulnya mobilitas *single strand* pada DNA sampel, karena fungsi utama dari pemanasan pada metode SSCP adalah membentuk mobilitas DNA menjadi *single strand* dengan cara memutuskan ikatan-ikatan hidrogen pada pasangan-pasangan basa yang terdapat pada rantai DNA [18-20]. Peneliti juga menemukan bahwa Gel MDE lebih baik daripada gel poliakrilamid

dan elektroforesis pada suhu 8°C lebih daripada elektroforesis pada suhu 23°C [21].

Hasil elektroforesis dengan gel poliakrilamid konsentrasi 30% dapat dilihat pada Gambar 4. Terlihat adanya pita-pita DNA yang sangat jelas namun hampir semua pita *smear* (memulus) di sepanjang kolomnya sehingga konsentrasi ini kurang baik digunakan untuk elektroforesis karena terlalu tingginya akrilamida-bis-akrilamida dalam matriks gel.



Gambar 3. Hasil visualisasi gel poliakrilamid dengan konsentrasi 25%. M : marker DNA.



Gambar 4. Hasil visualisasi gel poliakrilamid dengan konsentrasi 30%. M : marker DNA.

Uji menggunakan penambahan gliserol 10% dan elektroforesis pada ruangan 4°C tidak mempengaruhi kualitas visualisasi gel (masing-masing disajikan pada Gambar 5 dan 6). Pada penelitian oleh Liu dkk [21] menyatakan untuk suatu mutasi tertentu, gliserol mampu mempertinggi efisiensi komponen SSCP. Namun pada umumnya persentase mutasi pada gel dengan gliserol sedikit lebih tinggi dibandingkan tanpa gliserol (56% versus 61% untuk gel poliakrilamid tanpa dan dengan gliserol, dan 64% vs. 77% untuk gel MDE tanpa dan dengan gliserol). Satu faktor kritis yang juga mempengaruhi presisi SSCP adalah suhu selama elektroforesis. Suhu mempengaruhi viskositas matriks polimer dan pemilahan fragmen DNA, serta mempengaruhi konformasi kedua DNA. Fluktuasi suhu ambient juga menyebabkan fragment DNA bermigrasi tidak normal (anomaly) meskipun hanya sedikit [22]. Akan tetapi hal tersebut tidak ditemukan dalam penelitian ini.

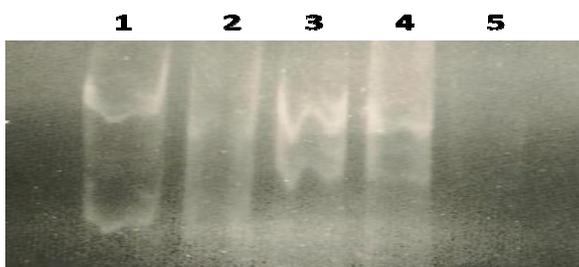
Mobilitas rantai tunggal atau ganda DNA dalam gel bergantung pada ukuran panjang untai, tetapi relatif tidak bergantung pada deret nukleotidanya, namun dipengaruhi oleh perubahan sangat kecil deret, mungkin satu dari ratusan nukleotida. Perubahan kecil akan sangat jelas karena sifat yang relatif tidak stabil

dari DNA untai tunggal; tanpa ada pasangannya, untai tunggal akan berikatan antar-untai (antar basa itu sendiri) menyebabkan suatu *loop* dan pelipatan yang menyebabkan suatu untai tunggal yang terlihat sebagai tiga dimensi unik, berapapun panjangnya [23].

Metode molekuler PCR dengan *probe* (pelacak) bertanda P-32 radioaktif merupakan metode yang cepat dan akurat untuk mengidentifikasi suatu patogen



Gambar 5. Hasil visualisasi gel poliakrilamid konsentrasi 25% dengan penambahan gliserol, K⁺ : DNA kontrol positif.



Gambar 6. Hasil visualisasi gel poliakrilamid konsentrasi 25% dan elektroforesis pada suhu 4°C.

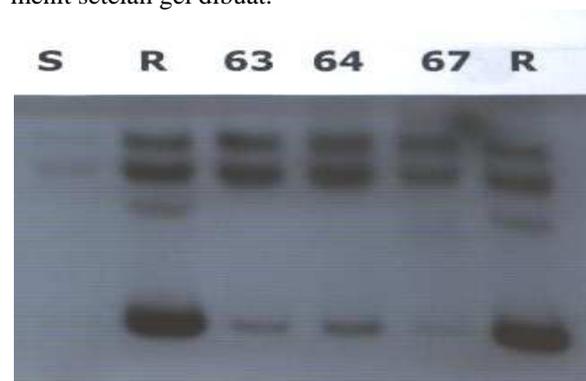
dan bahkan *strain*-nya. PCR mampu menggandakan DNA atau RNA sampai 1 juta kali atau lebih dan dapat dengan mudah diukur menggunakan pelacak asam nukleat bertanda radioaktif untuk mengidentifikasi fragment DNA [24]. Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa meskipun relatif mahal, metode radioaktif ternyata lebih sensitif daripada metode non radioaktif [3,14]. Dalam penelitian ini, hasil SSCP dengan pelabelan isotopik disajikan dalam Gambar 7, yang membuktikan bahwa metode radioaktif relatif lebih sensitif atau lebih baik daripada metode non radioaktif. Akan tetapi jika ditinjau dari segi biaya, hal ini perlu dipertimbangkan karena menyangkut pemanfaatan isotop yang harganya mahal dan perlu keterampilan teknis khusus menyangkut proteksi radiasi selama preparasi PCR, proses elektroforesis dan juga penanganan sampahnya [24].

Dalam penelitian ini terbukti SSCP radioaktif lebih sensitif dibandingkan SSCP konvensional atau non radioaktif yakni pewarnaan etidium bromida. Meskipun berbagai macam penelitian membuktikan sensitivitas probe radioaktif yang jauh lebih tinggi, namun memiliki keterbatasan yakni waktu paro isotop yang pendek dan bahaya radiasi yang dimilikinya

[3,14].

Dengan demikian, keberhasilan teknik SSCP dipengaruhi oleh konsentrasi akrilamid, suhu elektroforesis yang konstan, kondisi pH dimana DNA biasanya didenaturasi dalam larutan dengan pH tinggi (aditif gliserol dapat menurunkan pH dan menggunakan buffer Tris-borat) dan ukuran fragmen DNA serta faktor lain yang banyak dibahas dalam literatur [9, 11-13]. Dengan menggunakan polietilen glikol, A. Marfoff dkk [25] mampu membuktikan bahwa waktu untuk SSCP jauh lebih cepat (1-3 jam dibandingkan 7 jam untuk SSCP konvensional) dengan hasil yang baik. Suhu elektroforesis pun biasanya dilakukan pada dua macam yakni 25°C atau 4°C sebagai standard [11], seperti dilakukan pada penelitian ini meskipun tidak ditemukan perbedaan antara kedua suhu tersebut.

Dengan kondisi optimal, 80-90% perubahan basa yang terjadi dapat dideteksi dengan SSCP. Gel poliakrilamid pun seharusnya dipre- elektroforesis terlebih dahulu sebelum digunakan untuk mengeliminasi kotoran bermuatan seperti derivat amonium persulfat dari matrik gel. Jika hal ini tidak dilakukan maka kotoran bermuatan tersebut akan membentuk kompleks dengan fragmen DNA, yang merubah mobilitas elektroforetiknya. Reaksi polimerisasi pun memerlukan waktu hingga 24 jam untuk sempurna, oleh karena itu untuk penentuan kadar DNA secara akurat maka gel harus digunakan setelah 24 jam. Akan tetapi hal ini tidak dilakukan. karena dianggap tidak ada kotoran yang terjadi dan elektroforesis dilakukan dengan waktu standard 30 menit setelah gel dibuat.



Gambar 7. Hasil visualisasi (autoradiografi) SSCP radioaktif dimana DNA dilabel dengan P-32.

Keterangan : S adalah DNA strain sensitif obat, R: resisten obat.

4. KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa diantara konsentrasi 20-30% volume poliakrilamid, yang terbaik ditemukan pada 25% volume akrilamid (atau 7,5%) tanpa penambahan gliserol dan elektroforesis pada suhu ruang. Uji pelabelan isotopik DNA dengan P32-dCTP 0,1 µCi dan autoradiografi menunjukkan adanya kualitas visualisasi yang relatif lebih baik dibandingkan dengan non pelabelan.

DAFTAR REFERENSI

1. K.W. Kinzler and B. Vogelstein, The genetic basis of human cancer, Revised edition, McGraw-Hill, Medical Pub. Division; New York, 2002.
2. P.F. Andrew, O. Rolf and H. Steven, The epigenetic progenitor origin of human cancer, *Nature Reviews Genetics*, 7, 2006, 21-33.
3. M. Syaifudin dan M.L. Rosilawati, Identifikasi *M. tuberculosis* dengan PCR dupleks dan analisis resistensinya dengan SSCP radioaktif, *Prosiding Presentasi Ilmiah Keselamatan Radiasi dan Lingkungan XI*, 21 Desember 2005, 168-182.
4. S.S. Negi, U. Singh, S. Gupta, S. Khare, A. Rai, and S. Lal, Characterization of *rpoB* gene for detection of rifampicin drug resistance by SSCP and sequence analysis, *Indian J Med Microbiol.*, 27(3), 2009, 226-30.
5. S.V. Ramaswamy, R. Reich, S.J. Dou, L. Japerse, X. Pan, A. Wanger, T. Quitugua and E.A. Graviss, Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 2003, 47(4), 1241-1250.
6. Sutarno, A. Junaidi dan B. Tappa, Polimorfisme *MspI* pada lokus 2 gen hormon pertumbuhan sapi PO dan pengaruhnya terhadap capaian berat badan harian, *Biodiversitas*, 6 (2), 2005, 77-81.
7. M. Orita, H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi and T. Sekiya, Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as SSCPs, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86 (8), 1989, 2766-2770.
8. A. Savov, D. Angelicheva, A. Jordanova, A. Eigel, and L. Kalaydjieva, High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis, *Nucleic Acids Research*, 20 (24), 1992, 6741-6742.
9. P.S. Andersen, C. Jespersgaard, J. Vuust, M. Christiansen and L.A. Larsen, High-throughput single strand conformation polymorphism mutation detection by automated capillary array electrophoresis: validation of the method, *Human Mutation*, 21(2), 2003, 116-122.
10. D.M. Gersten and KE. Bijwaard, Polyacrylamide gel electrophoresis in vertical, inverse and double-crossing gradients of soluble polymers, *Electrophoresis*, 13(5), 1992, 282-286.
11. D. Glavac and M. Dean, Optimization of the single-strand confirmation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations, *Human Mutation*, 2 (5), 1993, 404-414.
12. X. Chen, T. Baumstark, G. Steger and D. Riesner, High resolution SSCP by optimization of the temperature by transverse TGGE. *Nucleic Acids Research*, 23 (21), 1995, 4524-4525.
13. H. Peng, M. Du, J. Ji, P.G. Isaacson and L. Pan, High resolution SSCP analysis using polyacrylamide agarose composite gel and a background-free silver staining method. *Biotechnology*, 19, 1995, 411-414.
14. N. Sivaprasad, Application of radioisotope in Healthcare An Overview, Board of Radiation and Isotope Technology, BARC Vashi Complex, Navi Mumbai India, 2006.
15. H.H. Lee, W.J. Lo, and K.B. Choo, Mutational analysis by a combined application of the multiple restriction fragment-single strand conformation polymorphism and the direct linear amplification DNA sequencing protocols, *Anal Biochem.*, 205(2), 1992, 289-293.
16. R. Boom, C.J.A. Sol, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M.E. Wertheim-Van Dillen and J. Van Der Noorda, Rapid and simple method for purification of nucleic acids, *J. Clin. Microbiol.*, 28(3), 495-503, 1990.
17. M. Orita, H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi and T. Sekiya, Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1989, 2766-2770.
18. T. Hongyo, G.S. Buzard, R.J. Calvert, and C.M. Weghorst, 'Cold SSCP': a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses, *Nucleic Acids Res.* 21(16), 1993, 3637-3642.
19. K. Hayashi and D.W. Yandell, How sensitive is PCR-SSCP?, *Hum. Mutation*, 2, 1993, 338-346.
20. B. Depnath, G. Bit and SK. Saha, Free radical cross-linking copolymerization of acrylamide and *N,N'*-methylene bis-acrylamide by using Fe(III)/thiourea and Ce(IV)/thiourea redox initiator systems, *Indian Journal of Chemical Technology*, 16, 2009, 196-199.
21. Q. Liu and S.S. Sommer, Parameters affecting the sensitivities of dideoxy fingerprinting and SSCP, *Genome Res.*, 4, 1994, 97-108.
22. B.B. Rosenblum, F. Oaks, S. Menchen, and B. Johnson, Improved single-stranded DNA sizing accuracy in capillary electrophoresis, *Nucleic Acids Research*, 25(19), 1997, 3925-3929.
23. U. Melcher, SSCPs. <<http://opbs.okstate.edu/~melcher/MG/MGW1/MG11129.html>>. Diakses 17 Februari 2003.
24. International Atomic Energy Agency, Combating infection in developing countries, Vienna Austria, 2000.
25. A. Markoff, A. Savov, V. Vladimirov, N. Bogdanova, I. Kremensky and V. Ganev, Optimization of single-strand conformation polymorphism analysis in the presence of polyethylene glycol, *Clinical Chemistry* 43(1), 1997, 30-33.

Rekaman Tanya Jawab Saat Presentasi	
Ghaib Widodo (Pusat Teknologi Bahan Bakar Nuklir - BATAN)	
Pertanyaan	Bagaimana cara melakukan elektroforesis pada suhu 4 °C. Mengapa tidak ada pengaruh suhu terhadap hasil visualisasi.
Jawaban	Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan peralatan pompa khusus yang dapat diatur suhunya sesuai keinginan. Tidak ada pengaruh suhu karena kemungkinan visualisasi ditentukan oleh komposisi akrilamid
Adang Hardi Gunawan (Pusat Penelitian Radioisotop dan Radiofarmaka – BATAN)	
Pertanyaan	Mengapa DNA harus didekomposisi dahulu sebelum dielektroforesis dan apakah ada hasil yang DNA nya tidak dipanaskan dahulu?
Jawaban	DNA harus didekomposisi / dipanaskan karena tujuannya adalah mendeteksi mutasi/perubahan basa pada rantai tunggal DNA. Tidak ada hasil dari DNA yang tidak dipanaskan.