

---

**JURNAL METAMORFOSA**  
*Journal of Biological Sciences*  
ISSN: 2302-5697  
<http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>

---

**TEKNIK PERANCANGAN PRIMER UNTUK SEKUEN GEN MDR-1 VARIAN 1199 PADA SAMPEL *BUFFY COAT* PASIEN ANAK DENGAN LLA**

**MDR-1 GENE 1199 VARIANT PRIMER DESIGN TECHNIQUES IN PEDIATRIC PATIENT *BUFFY COAT* SAMPLES WITH LLA**

**Putu Desy Yustinadewi\*<sup>1</sup>, Putu Sanna Yustiantara<sup>1</sup>, Inna Narayani<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Jurusan Farmasi, <sup>2</sup> Prodi Biologi*  
*Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana*  
*Jalan Kampus Unud-Jimbaran, Jimbaran-Bali, Indonesia 80364*  
*\*Email: desyustinadewi27@gmail.com*

## INTISARI

*Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) 1199 dapat diidentifikasi menggunakan sampel *buffy coat* dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Komponen-komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah *template* DNA; sepasang primer, yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA templat; dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates); buffer PCR; magnesium klorida (MgCl<sub>2</sub>) dan enzim polimerase DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Primer sangat mempengaruhi spesifitas dan sensitivitas reaksi PCR. Rancangan suatu primer merupakan salah satu parameter penentu keberhasilan suatu proses PCR (Ebd-Elsalam, 2003). Primer untuk sekuensing gen MDR-1 variant 1199 berhasil didesain dalam kondisi terbaik. Panjang sekuen primer *forward* sejumlah 21 oligonukleotida dan *reverse* sejumlah 20 oligonukleotida dengan fragmen sebesar 225 pb.

*Kata Kunci: PCR, Primer, Varian 1199, Gen MDR-1*

## ABSTRACT

Single Nucleotide Polymorphism (SNP) 1199 can be identified using a buffy coat sample by the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. The components required in the PCR process are DNA templates; A pair of primers, a short oligonucleotide having a complementary nucleotide sequence with the DNA nucleotide sequence of the template; DNTPs (Deoxynucleotide triphosphates); PCR buffer; Magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>) and DNA polymerase enzymes (Handoyo and Rudiretna, 2001). Primers greatly affect the specificity and sensitivity of PCR reactions. The design of a primer is one of the determinants of the success of a PCR process (Ebd-Elsalam, 2003). Primer for sequencing MDR-1 variant 1199 gene successfully designed in the best condition. The length of the forward primary sequence of 21 oligonucleotides and reverse amounts of 20 oligonucleotides with a fragment of 225 bp.

*Keywords: PCR, Primer, Variant 1199, Gen MDR-1*

## PENDAHULUAN

Leukemia limfoblastik akut (LLA) adalah jenis leukemia dimana ditemukan komponen sumsum tulang yang mengandung 30% sel muda (*blast*) (Widiaskara dkk., 2010). LLA masih menjadi kasus kanker anak yang paling sering terjadi di Indonesia, yakni sebesar 65,4% dengan jumlah 60-70 pasien baru per tahunnya (Simanjorang dkk., 2010; Sari dkk., 2010). Kemoterapi juga masih menjadi pilihan utama pengobatan LLA (Dipiro *et al.*, 2008). Terapi kanker dipengaruhi oleh ekspresi dan aktivitas gen MDR1 karena ekspresi P-gp yang berlebihan akibat *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) akan menyebabkan penurunan sensitivitas sel kanker terhadap obat kemoterapi (Dessilly *et al.*, 2014; Hoffmeyer *et al.*, 2000). Gen MDR-1 adalah gen yang sangat polimorfik, terdiri dari 28 ekson dengan berbagai polimorfisme nukleotida tunggal (SNP) (Saidijam *et al.*, 2015). MDR-1 diidentifikasi sebagai gen penyebab resistensi obat (MDR) untuk sel-sel kanker ditemukan sebagai alternatif dalam mekanisme mediator resistensi obat (Brinkman dan Eichelbaum, 2001).

Salah satu SNP yang berpengaruh terhadap terapi LLA adalah SNP 1199. Varian 1199 merupakan gen MDR-1 yang terletak di kromosom 7 pada ekson 11 mengalami perubahan asam amino serin menjadi asparagin (Chen *et al.*, 1990; Dessilly *et al.*, 2014). Berdasarkan penelitian yang dilakukan secara *in vitro* terhadap sel HEK dan LLC-PK1 menunjukkan hasil bahwa resistensi terhadap doxorubicin dan/atau vinkristin lebih tinggi untuk varian G1199A (mutan) dibandingkan dengan varian G1199G (*wild type*) (Crouthamel *et al.*, 2006; Woodahl *et al.*, 2009). Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Gregers *et al.*, (2015) terhadap pasien anak dengan LLA juga menunjukkan adanya peningkatan kekambuhan (*relaps*) pada varian G1199A (mutan) ketika dibandingkan dengan varian G1199G (*wild type*). SNP 1199 dapat diidentifikasi menggunakan sampel *buffy coat* dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

PCR adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro* yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) serta terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda pada setiap siklusnya (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Prinsip dari teknik PCR adalah memperbanyak bagian spesifik dengan enzim DNA polimerase yang diinisiasi oleh pelekatan primer dengan menghubungkan deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) dalam reaksi termal (Raven dan Johnson, 2002). Komponen-komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah *template* DNA; sepasang primer, yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA templat; dNTPs (Deoxynucleotide trifosfat); buffer PCR; magnesium klorida (MgCl<sub>2</sub>) dan enzim polimerase DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Menurut Ebd-Elsalam (2003), primer mempengaruhi spesifitas dan sensitivitas reaksi PCR. Rancangan suatu primer merupakan salah satu parameter penentu keberhasilan suatu proses PCR. Primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Rancangan primer yang kurang baik menyebabkan reaksi PCR tidak bekerja dengan baik sehingga menyebabkan produk PCR yang tidak spesifik dan atau terbentuknya primer dimer. Perancangan primer dapat dilakukan dengan membuat desain menggunakan *software* "primer3".

Perancangan atau desain primer bertujuan untuk memperoleh primer yang tepat digunakan dalam amplifikasi DNA dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Diss, 2003). Perancangan untuk memperoleh suatu primer yang memenuhi kriteria primer yang baik untuk amplifikasi dilakukan secara *in silico*, yaitu merancang/mendesain primer dengan bantuan suatu program dalam komputer. Penelitian ini dilakukan desain primer dengan sekuen gen MDR-1 variant 1199 pada pasien leukemia limfoblastik akut anak menggunakan

sampel *buffy coat*. Tujuan penelitian ini yaitu memperoleh primer yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi varian yang terdapat pada titik 1199 gen MDR-1 yang didesain secara *in silico*. Sehingga dengan primer yang didesain tersebut, dapat digunakan dalam proses amplifikasi menggunakan PCR.

**BAHAN DAN METODE**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebuah laptop atau computer yang berisi *software* berupa Primer3 yang dapat didownload gratis melalui google.com untuk mendesain primer secara *in silico*. Data sekuen gen MDR-1 yang digunakan diperoleh dari database NCBI pada URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> dengan kode genbank NG\_011513.1:167697-167922.

Desain primer dilakukan pada program Primer3. Primer yang didesain berada pada kromosom 7 dengan target pada ekson 11. Sehingga pada kolom “*mispriming library*” dimasukkan sekuen dari ekson 11 hingga intron

11. Selanjutnya klik *pick primers* pada kolom bagian bawah. sehingga program akan memberikan data beberapa pilihan primer. Panjang maksimal dan minimal produk PCR juga dapat ditentukan pada kolom “*product size*”. Primer yang ditargetkan adalah yang memiliki panjang 225 bp. Kondisi primer yang baik dapat disesuaikan dengan mengisi kolom “*general picking primer condition*” sehingga ukuran primer, *melting temperature* (Tm), %GC, dan GC *clamp* dapat sesuai dengan yang diharapkan. *Melting temperature* (Tm) yang diharapkan berkisar 42-65°C dengan persentase GC berada pada rentang 40-60%. Pasangan GC (GC *clamp*) yang ditargetkan sebesar 3 basa G/C dan tidak lebih dari 5 basa G/C.

**HASIL**

Program Primer3 memberikan 4 pilihan pasang primer, setelah dimasukkan panjang primer yaitu 21 oligonukleotida dengan daerah target 1141-1366 (tabel 3.1).

Tabel 1. Kandidat primer dari software primer3

No.	1	2	3	4
Jumlah Nukleotida (bp)	F: 20 R: 20	F: 20 R: 20	F: 20 R: 20	F: 21 R: 20
Tm (°C)	F: 56,65 R: 56,13	F: 57,73 R: 56,13	F: 57,99 R: 56,13	F: 57,58 R: 56,13
Tm Mismatch (< 5°C)	F: 57,6 R: 56,2	F: 57 R: 56,2	F: 55,8 R: 56,2	F: 56,4 R: 56,2
Ta (°C)	F: 51,65 R: 51,13	F: 52,73 R: 51,13	F: 52,99 R: 51,13	F: 52,58 R: 51,13
GC Contens (%)	F: 50% R: 50%	F: 55% R: 50%	F: 45% R: 50%	F: 47% R: 50%
GC Clamp (basa)	F: 1 R: 3	F: 2 R: 2	F: 1 R: 2	F: 1 R: 2
Hairpins (kcal/mol)	F: = -6,02 R: = -	F: = -6,02 R: = -	F: = - R: = -	F: = -0,92 R: = -
Self Dimer (kcal/mol)	F: = -1,92 R: = -5,36	F: = -1,92 R: = -5,36	F: = -10,65 R: = -5,36	F: = - R: = -5,36
Cross Dimer (kcal/mol)	delta G= -	delta G= -9,17	delta G= -	delta G= -
Repeats (basa)	F: = - R: = -	F: = - R: = -	F: = - R: = -	F: = - R: = -
Runs (basa)	F: = 3 R: = -	F: = 3 R: = -	F: = 3 R: = -	F: = 3 R: = -
Amplicon Length (bp)	226 bp	228 bp	232	225

Sekuen primer dengan kriteria terbaik yang dapat digunakan dalam proses PCR yaitu primer *Forward* 5'-AGTGGGCACAAACCAGATAA-3' dan *Reverse* 5'-GGCAATTCACAGACACAGGA-3'. Sekuen primer telah memenuhi kriteria parameter untuk sebuah primer yang digunakan dalam proses PCR (Tabel 1).

## PEMBAHASAN

Secara umum, primer yang ideal memiliki panjang antara 18 sampai 30 oligonukleotida. Panjang ini diharapkan cukup untuk dapat mengikat *template* pada suhu *annealing* dan mendapatkan sekuen yang spesifik (Borah, 2011). Jika primer terlalu pendek maka dapat mengurangi spesifisitas primer sehingga mudah menempel pada *template* dengan suhu *annealing* yang tidak diinginkan. Sedangkan jika primer terlalu panjang tidak mempengaruhi spesifisitas secara bermakna (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Primer yang baik merupakan primer yang memenuhi kriteria parameter primer. Parameter tersebut antara lain: panjang primer, *melting temperature*, ( $T_m$ ), *pair tm mismatch*, *annealing temperature* ( $T_a$ ), *GC clamp*, persentase jumlah G dan C (%GC), *self dimer*, *cross dimer*, *runs*, *repeats*, dan *hairpins*. *Melting temperature* ( $T_m$ ) untuk primer *forward* dan *reverse* primer umumnya berkisar antara 42-65°C. Primer dengan  $T_m$  berkisar antara 52-58°C sangat ideal, sedangkan  $T_m$  di atas 65°C akan mengurangi efektifitas *annealing* sehingga proses amplifikasi DNA kurang berjalan baik (Popp, Prof. Dr. J. and Prof. Dr. M. Bauer, 2015). Analisis menggunakan primer3, yaitu simulasi primer dan DNA *template* gen MDR-1 varian 1199 dalam proses PCR menghasilkan fragmen sebesar 225 pb yang berada pada posisi 1141-1366. Jumlah basa nukleotida primer yang dirancang adalah 21 bp untuk primer *forward* dan 20 bp untuk primer *reverse*. Hasil ini sesuai dengan jumlah basa nukleotida yang dipersyaratkan, yaitu berkisar antara 20-30 bp. Primer dengan panjang kurang dari 18 basa dapat mengurangi spesifisitas primer. Ukuran primer yang pendek memungkinkan terjadinya

*mispriming* (penempelan primer di tempat lain yang tidak diinginkan) tinggi, ini akan menyebabkan berkurangnya spesifisitas dari primer tersebut yang nantinya akan berpengaruh pada efektifitas dan efisiensi proses PCR. Sedangkan, untuk panjang primer lebih dari 30 basa tidak akan mempengaruhi spesifisitas primer secara bermakna dan ini akan menyebabkan biaya pembelian primer lebih mahal (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

*Melting temperature* ( $T_m$ ) adalah temperatur di mana 50% untai ganda DNA terpisah. Syarat  $T_m$  yang baik adalah pada rentang 42-65°C. Primer yang dipilih memiliki  $T_m$  57°C untuk primer *forward* dan 56°C untuk primer *reverse*. Primer dengan  $T_m$  yang terlalu tinggi (>65°C) akan mengurangi efektifitas *annealing* sehingga proses amplifikasi DNA kurang berjalan dengan baik. Sedangkan  $T_m$  yang terlalu rendah memiliki kecenderungan menempel ditempat lain dan menghasilkan produk yang tidak spesifik.  $T_m$  dapat dihitung secara manual dengan rumus  $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ . Pemilihan  $T_m$  suatu primer sangat penting karena  $T_m$  primer akan sangat berpengaruh dalam pemilihan suhu *annealing* proses PCR (Borah, 2011; Handoyo dan Rudiretna, 2001). Perbedaan  $T_m$  sepasang primer sebaiknya tidak lebih dari 5°C. Suhu *annealing* primer umumnya adalah 3-5°C di bawah  $T_m$ , maka suhu *annealing* untuk primer *forward* 52°C dan untuk primer *reverse* 51°C dimana perbedaan  $T_m$  sepasang primer hanya 1°C. *Annealing temperature* ( $T_a$ ) merupakan suhu yang diperkirakan primer dapat berikatan dengan *template* (DNA) dengan stabil (DNA-DNA *hybrid stability*). Apabila suhu *annealing* tinggi maka primer dan DNA *template* sulit untuk berikatan sehingga akan menghasilkan produk PCR yang rendah (kurang efisien). Namun jika  $T_a$  terlalu rendah akan menyebabkan terjadinya penempelan primer pada DNA *template* yang tidak spesifik.

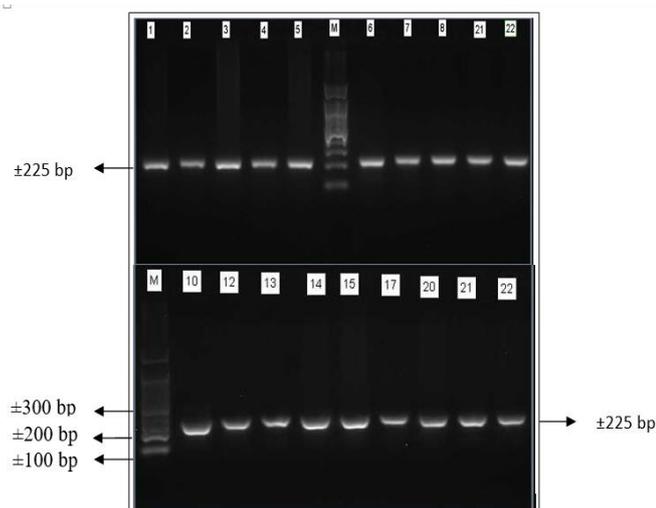
Persentase GC adalah persentase banyaknya guanin dan sitosin dalam suatu primer, %GC sebaiknya berada pada rentang 40-60% (Borah, 2011). Primer yang didesain memiliki %GC yang masih berada pada

rentang, yakni sebesar 47% untuk primer *forward* dan 50% untuk primer *reverse*. Primer dengan %GC yang rendah dapat menurunkan efisiensi proses PCR yang disebabkan karena primer tidak mampu berkompetisi untuk menempel secara efektif pada template (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Pasangan GC (*GC clamp*) adalah jumlah basa G dan C yang terdapat pada 5 basa terakhir (3'). *GC clamp* yang dimiliki oleh primer *forward* dan primer *reverse* yang telah didesain masing-masing sebanyak 1 dan 2 basa. Jumlah ini masih dapat diterima untuk digunakan karena rentang yang dapat ditoleransi sebesar 3 basa G/C dan tidak lebih dari 5 basa G/C. Keberadaan G/C di ujung 3' primer sangat membantu terjadinya stabilitas ikatan antara primer dengan DNA template yang diperlukan untuk inisiasi polimerase DNA (proses PCR). Apabila *GC clamp* lebih dari 5 basa G/C akan menurunkan spesifisitas primer karena nukleotida A atau T lebih toleran terhadap *mismatch* dari pada G atau C (Popp and Bauer, 2015). Kriteria lain yang sangat berpengaruh terhadap efektifitas proses PCR adalah adanya *hairpins* dan *dimer*. Terbentuknya struktur *loop/hairpins* dan adanya ikatan dengan primer lainnya yang sejenis (*self dimer*) pada primer sebaiknya dihindari, namun sangat sulit untuk memperoleh primer tanpa memiliki struktur *hairpin*. Suatu parameter juga memiliki batasan maksimum untuk dapat ditoleransi. *Hairpin* pada ujung 3' hanya diperbolehkan memiliki  $\Delta G$  maksimum -2 kcal/mol dan *hairpin* internal dengan  $\Delta G = -3$  kcal/mol masih dapat ditoleransi. *Hairpin* merupakan interaksi intramolekuler dalam primer. *Hairpin* dalam primer dapat mengganggu proses penempelan primer pada template dalam proses PCR (Borah, 2011). *Hairpin* pada primer yang didesain hanya ditemukan pada primer *forward* yakni sebesar -0,92 kcal/mol yang terdapat pada ujung 3'. *Self-dimer* pada ujung 3' yang masih dapat ditoleransi, maksimum -5 kcal/mol dan *self-dimer* pada bagian internal dengan sebesar -6 kcal/mol masih dapat ditoleransi. Hasil desain menunjukkan bahwa

*self-dimer* yang dimiliki sebesar -5,36 ditemukan pada bagian internal primer *reverse*. Primer juga tidak boleh berikatan dengan primer pasangannya (*reverse* dan *forward*) (*cross dimer*). Pada primer yang didesain tidak terdapat *cross dimer*, baik pada bagian internal maupun pada ujung 3'. Dimer pada ujung 3' primer sebaiknya tidak lebih dari 3 basa karena dapat menurunkan spesifisitas primer (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Primer sebaiknya tidak mempunyai 3 atau lebih basa G atau C pada 3' dimer, karena dapat menstabilkan *annealing* primer non spesifik (Sulistyaningsih, 2007). Stabilitas suatu primer mempengaruhi penempelan primer pada *template*. Rentang stabilitas suatu primer adalah 1,2-2 kcal. Jika terlalu stabil maka primer akan menempel kuat pada *template* dan jika tidak stabil primer tidak dapat menempel dengan baik pada *template*. Pada primer ini juga tidak ditemukan adanya *repeats*, sehingga primer yang dihasilkan berada dalam kondisi yang baik (Borah, 2011).

*Repeats* merupakan nukleotida yang berulang dalam primer, adanya *repeats* dapat menyebabkan terjadinya penempelan primer di tempat yang tidak diinginkan (*mispriming*). Primer sebaiknya tidak memiliki urutan basa yang diulang terus menerus (*run*). Pengulangan basa berurutan yang masih dapat ditoleransi hanya sampai 4 kali. *Run* yang ditemukan pada primer yang didesain sebanyak 3 kali pada primer *forward*.

Analisis homologi primer dengan DNA genome dilakukan melalui BLAST-NCBI untuk menghindari terjadinya *cross homologi*. Berdasarkan hasil analisis primer ini cukup baik dapat digunakan dalam proses PCR. Primer yang didesain ini dapat memotong daerah target (dapat membatasi daerah amplifikasi dalam proses PCR) dengan tepat, sesuai rentang daerah yang dirancang (gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa primer yang didesain sudah baik untuk dapat digunakan dalam proses PCR dan dapat menghasilkan produk sesuai dengan rentang daerah yang diinginkan.



Gambar 1. Desain primer yang berhasil digunakan untuk memotong titik 1199 gen MDR1. (Keterangan: M: Marker, 1-22: sampel)

## KESIMPULAN

Primer untuk sekuensing gen MDR-1 variant 1199 berhasil didesain dalam kondisi terbaik adalah primer *Forward* 5'-GAGTGGGCACAAACCAGATAA-3' dan *Reverse* 5'-GGCAATTCACAGACACAGGA-3'. Panjang sekuen primer *forward* sejumlah 21 oligonukleotida dan *reverse* 20 oligonukleotida dengan fragmen sebesar 225 pb.

## DAFTAR PUSTAKA

- Borah, P. 2011. Primer Designing for PCR. *Science Vision*. Vol. 11 (3): P. 134 -136.
- Brinkman, U., and M. Eichelbaum. 2001. Polymorphisms in The ABC Drug Transporter Gene MDR-1. *The Pharmacogenomics Journal*. Vol. 1. P. 59-64.
- Chen, C., D. Clark, K. Ueda, I. Pastan, M. M. Gottesman, I. B. Roninson. 1990. Genomic Organization of the Human Multidrug Resistance (MDR1) Gene and Origin of P-glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 265, No. 1.
- Crouthamel, M. H., Wu D., Yang Z., Ho R. J. 2006. A Novel MDR1 G1199T Variant Alters Drug Resistance and Efflux Transport Activity of P-glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther*. Vol. 95. P. 2767-2777
- Dessilly, G., L. Elens, N. Panin, A. Capron, A. Decottignies, J.B. Demoulin, V. Haufroid. 2014. MDR-1 1199G.A Genetic Polymorphism (Rs2229109) Influences the Intracellular Accumulation of Tacrolimus in HEK293 and K562 Recombinant Cell Lines. *Plos One*. Vol. 9. Issue 3.
- Dipiro, J. T., R. L Talbert, G. C. Yee, B. G. Wells, and L. M. Posey. 2005. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*. Sixth Edition. United States of America: McGraw-Hill Companies Inc.
- Diss, T. 2003. The Polymerase Chain Reaction. In Crocker, J. dan Paul, G.M. editors. *Molecular Biology in Cellular Pathology*. United Kingdom: John Willey and Sons, Ltd. P. 193-210.
- Gregers, J., H. Gréen, I. J. Christensen, K. Dalhoff, H. Schroeder, N. Carlsen, S. Rosthøj, B. Lausen, K. Schmiegelow, and C. Peterson. 2015. Polymorphisms in the MDR-1 Gene and Effect on Outcome and Toxicity in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *The Pharmacogenomics Journal*. Pp:1-8.
- Handoyo, D., dan A. Rudiretna. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polimerase Chain

- Reaction (PCR). *Unitas*. Vol. 9. No. 1. Halaman: 17-29.
- Popp, J. and M. Bauer. 2015. Modern Techniques for Pathogen Detection. Pp. 60-62
- Sari, T. Tjitra, E. Windiastuti, G. R. Cempako, dan Y. Devaera. 2010. Prognosis Leukemia Limfoblastik Akut pada Anak Obes. *Sari Pediatri*. Volume 12. Nomor 1. Halaman: 58-62.
- Simanjorang, Chandrayani, A. C. Adisasmita, dan E. S. Tehuter. 2010. Gambaran Epidemiologi Kasus Leukemia Anak di Rumah Sakit Kanker Dharmais 2004-2008. *Indonesian Journal of Cancer*. Volume 4. Nomor 1. Halaman: 15-22.
- Sulistyaningsih, E. 2007. Polymerase Chain Reaction (PCR): Era Baru Diagnosis dan Manajemen Penyakit Infeksi. *Biomedis*. 1(1): P. 17-25.
- Widiaskara IM, B. Permono, I. D. G. Ugrasena, M. Ratwita. 2010. Luaran Pengobatan Fase Induksi Pasien Leukemia Limfoblastik Akut pada Anak di Rumah Sakit Umum Dr. Soetomo Surabaya. *Sari Pediatri*, Vol. 12, No. 2.
- Woodahl, E. L., Z. Yang, T. Bui, D. D. Shen, and Rodney J. Y. Ho. 2009. Multidrug Resistance Gene G1199A Polymorphism Alters Efflux Transport Activity of P-Glycoprotein. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Vol. 310. No. 3.