JURNAL RISET KESEHATAN
POLTEKKES DEPKES BANDUNG
Volume 11 No 1

# OPTIMASI SUHU *ANNEALING* DAN KONSENTRASI PRIMER UNTUK DETEKSI *Brugia malayi* MENGGUNAKAN *REAL-TIME* PCR

**Siswanto, Yesicha Putri[1];Merdekawati, Fusvita[1]; Ernawati[1]; Hardiana, Acep T.[1]; Kurniawan, Entuy[1]**

[1]Jurusan Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung
e-mail: yesichasiswanto@gmail.com

**ABSTRAK**

Filariasis disebabkan oleh infeksi cacing filarial dan ditularkan melalui nyamuk. Di Indonesia, 70% Filariasis disebabkan oleh *Brugia malayi*. Dari berbagai metode diagnosis yang ada, Real-time PCR banyak digunakan karena lebih sensitif dan spesifik. Perlu dilakukan optimasi sebelum melakukan pengujian, diantaranya optimasi suhu annealing dan konsentrasi primer. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui suhu annealing dan konsentrasi primer yang optimal untuk deteksi *B. malayi.* Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimen semu (*quasi eksperiment*) dengan menentukan reaski optimal berdasarkan nilai *Cycle threshold* yang diamati melalui kurva amplifikasi. Optimasi suhu annealing dilakukan dengan variasi suhu 53$^o$C, 54$^o$C, 55$^o$C, 56$^o$C, 57$^o$C. Sedangkan primer SLX-F dan SLX-R, yang digunakan dalam penelitian ini, dibuat variasi konsentrasi 10µM; 7,5µM; 5µM Real-time PCR ESCO Swift Spectrum 48. Berdasarkan hasil penelitian diketahui, konsentrasi primer 10µM pada suhu 55$^o$C menghasilkan nilai Ct optimal (14,4) dibandingkan dengan semua variasi reaksi yang diujikan.

**Kata kunci** : *Brugia malayi,* Real-time PCR, Suhu Annealing, dan konsentrasi primer

***ABSTRACT***

*Filariasis is caused by filarial worm infections and is transmitted through mosquitoes. In Indonesia, 70% of Filariasis is caused by Brugia malayi. Of the various diagnostic methods available, Real-time PCR is widely used because it is more sensitive and specific. Optimization needs to be done before testing, including optimization of annealing temperature and primary concentration. This study aims to determine the optimal annealing temperature and primary concentration for the detection of B. malayi. The type of research conducted is a quasi experiment (quasi experiment) by determining the optimal results based on the value of the cycle threshold observed through the amplification curve. Annealing temperature optimization was carried out with variations in temperature of 53oC, 54oC, 55oC, 56oC, 57oC. Whereas SLX-F and SLX-R primers, which were used in this study, were made in variations of the concentration of 10µM; 7.5µM; 5µM Real-time PCR ESCO Swift Spectrum 48. Based on the results of the study, it was found that the primary concentration of 10µM at 55oC resulted in an optimal Ct value (14.4) compared to all the reaction variations tested.*

***Key words*** *: Brugia malayi, Real-time PCR, Annealing temperature, and primer concentration*

**PENDAHULUAN**

Filariasis limfatik adalah salah satu neglected tropical disease. Penyakit ini disebabkan oleh infeksi cacing filarial yang ditularkan melalui nyamuk[1]. Filariasis di Indonesia ini disebabkan oleh cacing *Wuchereria bancrofti, Brugia malayi dan Brugia timori*. Dari tiga spesies tersebut, *Brugia malayi* merupakan spesies yang penyebarannya paling luas di Indonesia, lebih dari 70% kasus filariasis di Indonessia disebabkan oleh *Brugia malayi.* Sebagai upaya menghadapi permasalahan tersebut pemerintah Indonesia sepakat untuk memberantas filariasis melalui dua pilar utama. Pilar utama tersebut yaitu; Pertama, dengan memutus mata rantai penularan filariasis dengan Pemberian Obat Pencegahan Masal (POPM); kemudian kedua, dengan mencegah serta membatasi kecacatan dengan penatalaksanaan kasus filariasis mandiri[2].

Dalam pilar kedua pemberantasan filariasis di dalamnya termasuk diagnosis pasien, memonitor serta memetakan kejadian filariasis termasuk ke dalam pilar kedua[3]. Penegakan diagnosis filariasis tersebut menggunakan teknik mikroskopis sebagai metode standar[4], yang mana dilakukan dengan mendeteksi cacing filarial dalam apusan darah. Akan tetapi metode ini memiliki sensitifitas rendah serta diperlukan personil laboratorium yang sangat berpengalaman untuk melakukannya. Oleh sebab itu dikembangkan metode lain seperti metode berbasis Imunologi dan biologi molekuler[5].

Pengembangan metode diagnosis filariasis salah satunya dengan menggunakan metode berbasis biologi molekuler, yaitu Polimerase Chain Reaction (PCR). Metode PCR digunakan karena alasan sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi[6,7,8.] Metode ini dilakukan berdasarkan kemampuan DNA polimerase untuk mensisntesis DNA komplemen dari template DNA[9.] Metode amplifikasi DNA ini banyak dikembangkan. Salah satunya dengan adanya metode Real-time PCR[10]. Terdapat perbedaan antara PCR konvensional dan Real-time PCR. Pada PCR konvensional, deteksi DNA dilakukan melalui tahap paska PCR, yaitu elektroforesis sedangkan pada Real-time PCR, produk PCR diukur pada setiap siklus melalui deteksi floresen. Perbedaan tersebut membuat pengerjaan Real-time PCR lebih cepat dibandingkan PCR konvensional. Selain itu, metode Real-time PCR mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang sangat tinggi[6,11]. Dalam penggunaan Real-time PCR diperlukan pengembangan tes in-house yang salah satunya adalah dengan melakukan optimasi[12]. Optimasi diperlukan untuk memastikan bahwa pengujian adalah sensitif sebagaimana diperlukan dan spesifik untuk target yang diinginkan.

Terdapat sejumlah faktor yang dapat diubah untuk mendapatkan kinerja pengujian yang optimal sehingga dapat meningkatkan sensitivitas, spesifisitas dan presisi[13]. Komponen pengujian yang penting untuk dioptimalisasi diantaranya adalah konsentrasi primer dan suhu annealing. Hal tersebut karena pada tahap annealing menentukan seberapa optimal primer menempel pada templatee DNA[11]. Jika suhu anealing terlalu rendah, reaksi akan menjadi tidak spesifik. Namun, jika suhu anealing nya terlalu tinggi, dapat mempengaruhi efisiensi reaksi, yang mengakibatkan kurangnya amplifikasi [13,14]. Begitu pula dengan optimasi konsentrasi primer penting dilakukan. Konsentrasi primer yang terlalu tinggi atau terlalu rendah dapat mempengaruhi sensitifitas reaksi PCR, hal ini dapat beresiko terhadap terjadinya hasil negatif palsu[15,16]. Sehingga untuk mendapatkan suhu annealing dan konsentrasi primer yang optimal untuk dteksi *Brugia malayi,* dilakukanlah optimasi. Optimasi tersebut penting dilakukan agar pengujian efektif dan efisien.

## METODE

Penelitian ini menggunakan metode Kuasi Eksperimen untuk menentukan suhu annealing dan konsentrasi primer yang optimum utnuk deteksi *Brugia malayi* menggunakan Real-time PCR. Untuk mendapatkan kondisi yang optimal, suhu annealing divariasikan menjadi 53$^o$C, 54$^o$C, 55$^o$C, 56$^o$C, 57$^o$C. Sedangkan Konsentrasi Primer divariasikan menjadi 5µM; 7,5µM; 10µM.

Sensi fast HRM mix merupakan reagen yang digunakan dalam penelitian ini. Kit komersil ini telah mengandung pewarna EvaGreen, dNTPs, stabiliser dan *enhancer* (2). Template yang digunakan dalam penelitian ini, 97,99% identik dengan gen 5S rRNA SL1 dengan No.Assesion: D87037. Primer yang digunakan adalah primer *SLX* untuk *Brugia malayi.* Primer tersebut didesain dari gen 5S rRNA dan spliced leader sequence SL1 *Brugia malayi* (No.Asesion GenBank: no. D87037). Sedangkan alat yang digunakan adalah ESCO swift 48 Real-time PCR. Protokol PCR yang digunakan dalam pengujian ini adalah 1 siklus denaturasi awal 10 menit. Denaturasi selama 10 detik, annealing selama 8 detik, dan ekstensi selama 15 detik.

Sampel dengan konsentrasi primer berbeda (5µM; 7,5µM; 10µM) pada suhu annealing 53$^o$C. Kemudian tahap selanjutnya, yaitu pengujian yang sama untuk sampel dengan konsentrasi primer 5µM, 7,5µM, 10µM dilakukan pada kondisi suhu annealing yang berbeda, secara berurutan (54$^o$C, 55$^o$C, 56$^o$C, 57$^o$C).

Data yang telah didapatkan dianalisis melalui kurva amplifikasi. Optimalitas reaksi ditentukan dengan mengamati nilai Ct yang dihasilkan dari reaski pada masing-masing sampel.

## HASIL

### Optimasi suhu annealing 53$^o$C

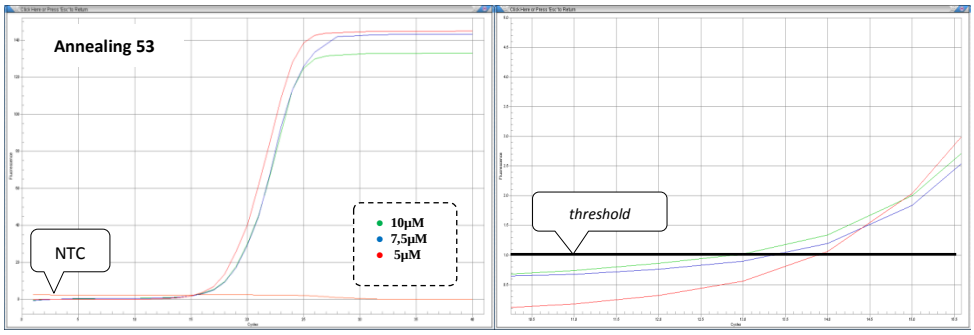
Pada suhu annealing 53$^o$C dihasilkan kurva amplifikasi seperti pada Gambar 1. Nilai Ct yang dihasilkan dari pengujian sampel dengan konsentrasi primer 10µM; 7,5µM; 5µM secara berturut-turut adalah 12,9; 13,3; 13,9. Pada kurva sampel konsentrasi primer 10µM, titik akhirnya tidak sama dengan titik akhir pada kurva lainnya. Kurva tersebut juga pada siklus setelahnya, terlampaui oleh kurva dari sampel dengan konsentrasi primer 5µM dan berhimpitan dengan kurva yang terbentuk dari sampel dengan konsentrasi primer 7,5µM.

### Optimasi suhu annealing 54$^o$C

Pada suhu annealing 54$^o$C dihasilkan kurva amplifikasi seperti pada Gambar 2. Nilai Ct yang dihasilkan dari pengujian sampel dengan konsentrasi primer 10µM; 7,5µM; 5µM secara berturut-turut adalah 13,4; 14,1; 14,2. Dari hasil tersebut terlihat bahwa sampel dengan konsentrasi primer 10µM, pada pengujian suhu annealing 54$^o$C, memiliki nilai Ct yang paling rendah sedangkan sampel dengan konsentrasi 5µM memiliki nilai Ct paling tinggi. Dari Gambar 2 terlihat, kurva yang terbentuk dari sampel dengan konsentrasi primer 7,5µM dan 5µM saling berhimpitan dan menghasilkan nilai Ct yang tidak jauh berbeda.

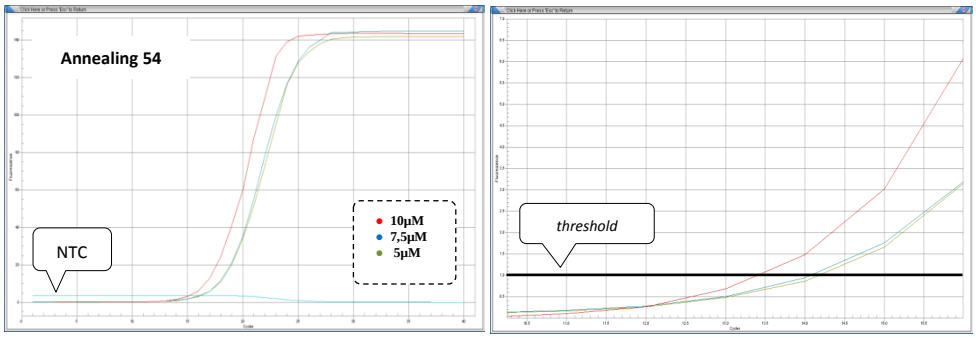
### Optimasi suhu annealing 55$^o$C

Pada suhu annealing 55$^o$C dihasilkan kurva amplifikasi seperti pada Gambar 3. Nilai Ct yang dihasilkan dari pengujian sampel dengan konsentrasi primer 10µM; 7,5µM; 5µM secara berturut-turut adalah 13,4; 14,1; 14,2. Dari hasil tersebut terlihat bahwa sampel dengan konsentrasi primer 10µM, pada pengujian suhu annealing 55$^o$C, memiliki nilai Ct yang paling rendah sedangkan sampel dengan konsentrasi primer 5µM memiliki nilai Ct tertinggi. Dari Gambar 3 terlihat kurva dari sampel dengan konsentrasi primer 10µM dan 7,5µM berhimpitan namun memiliki nilai Ct yang berbeda.



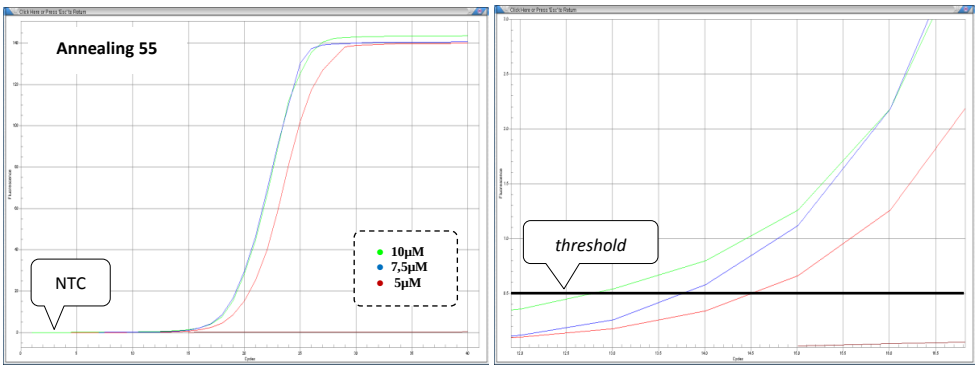

(a) (b)

**Gambar 1: (a) kurva dalam skala penuh (b)kurva dengan tampilan diperbesar.**



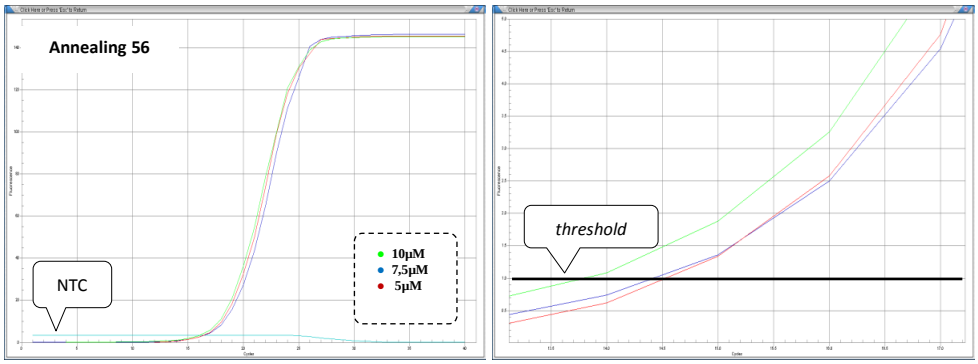

(a) (b)

**Gambar 2: (a) kurva dalam skala penuh (b) kurva dengan tampilan diperbesar.**



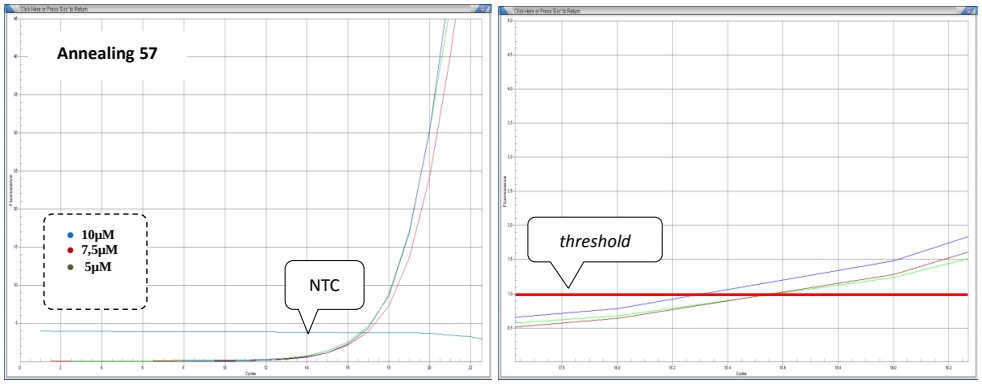

(a) (b)

**Gambar 3: (a) menunjukan kurva dalam skala penuh (b) menujukan kurva dengan tampilan diperbesar**




(a) (b)

**Gambar 4: (a) menunjukan kurva dalam skala penuh (b) menujukan kurva dengan tampilan**




(a) (b)

**Gambar 5:** (a) menunjukan kurva dalam skala penuh (b) menujukan kurva dengan tampilan

**Tabel 1. Nilai Ct Hasil Pengujian**

| Konsentrasi Primer \ Suhu Annealing | 53°C | 54°C | 55°C | 56°C | 57°C |
|---|---|---|---|---|---|
| 10µM | 12,9 | 13,4 | 14,4 | 14,4 | 15,7 |
| 7,5µM | 13,3 | 14,1 | 14,8 | 15,1 | 15,9 |
| 5µM | 13,9 | 14,2 | 15,6 | 15,7 | 15,9 |

**Optimasi suhu annealing 56°C**

Pada suhu annealing 56°C dihasilkan kurva amplifikasi seperti pada Gambar 4. Dari gambar tersebut terlihat kurva. Nilai Ct yang dihasilkan dari pengujian sampel dengan konsentrasi primer 10µM; 7,5µM; 5µM secara berturut-turut adalah 13,4; 14,1; 14,2. Dari hasil tersebut terlihat bahwa sampel dengan konsentrasi primer 10µM, pada pengujian suhu annealing 55°C, memiliki nilai Ct yang paling rendah sedangkan sampel dengan konsentrasi primer 5µM memiliki nilai Ct tertinggi. Dari gambar 4.4 terlihat kurva dari sampel dengan konsentrasi primer 10µM dan 7,5µM berhimpitan namun memiliki nilai Ct yang berbeda.

**Optimasi suhu annealing 57°C**

Pada suhu annealing 57°C dihasilkan kurva amplifikasi seperti pada Gambar 5. Nilai Ct yang dihasilkan dari pengujian sampel dengan konsentrasi primer 10µM; 7,5µM; 5µM secara berturut-adalah 15,7; 15,9; 15,9. Dari hasil tersebut terlihat bahwa sampel dengan konsentrasi primer 10µM, pada pengujian suhu annealing 57°C, memiliki nilai Ct yang paling rendah sedangkan sampel dengan konsentrasi primer 7,5µM dan 5µM memiliki nilai Ct yang sama.

**Nilai Ct hasil pengujian**

Nilai Ct dari setiap sampel yang diuji dengan suhu annealing berbeda ditunjukan pada Tabel 1. Terlihat dari data tersebut adanya peningkatan Ct seiring sengan meningkatnya suhu annealing yang digunakan. Peningkatan tersebut terjadi baik pada sampel dengan konsentrasi primer 10µM,;7,5µM maupun 5µM. Setiap konsentrasi memiliki Ct terendah pada pengujian dengan suhu annealing 53°C. Semakin rendah Ct artinya semakin cepat terjadinya amplifikasi untuk dapat melewati thershold. Bila dibandingkan dengan seluruh data, pada suhu annealing 53°C, sampel

dengan konsentrasi primer 10µM memiliki nilai Ct terendah (12,8).

**PEMBAHASAN**

Penelitan ini melakukan optimasi suhu annealing dan konsentrasi primer untuk mendapatkan kondisi yang optimal dalam penggunaan Real-time PCR. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa suhu optimal untuk deteksi *Brugia malayi* adalah 55$^{o}$C dan konsentrasi primer forward dan reverse yang optimal adalah 10µM. Hal tersebut ditentukan berdasarkan nilai Ct yang dihasilkan. Suhu annealing tersebut dipilih berdasarkan analisis kurva amplifikasi yang terbentuk. Apabila dibandingkan dengan suhu annealing lainnya yang digunakan, pada suhu annealing tersebut kurva yang terbentuk lebih konsisten. Maksudnya adalah pada suhu annealing ini, kurva yang terbentuk tidak saling melampaui setelah melewati *threshold*.

Berdasarkan analisis pada suhu annealing 53$^{o}$C, 54$^{o}$C, 56$^{o}$C, 57$^{o}$C kurva yang berimpitan akan melampaui kurva lainnya pada siklus tertentu. Sehingga apabila nilai *threshold* dinaikan, sampel dengan konentrasi tertentu tidak secara tetap memiliki Ct terendah atau terkecil. Misalnya pada pengujian dengan suhu annealing 53$^{o}$C (gambar 1) terlihat bahwa apabila nilai *threshold* yang ditetapkan adalah 1 maka sampel dengan konsentrasi 10µM memiliki nilai Ct terendah dan sampel dengan konsentrasi 5µM memiliki nilai Ct tertinggi. Akan tetapi bila nilai *threshold* ditingkatkan menjadi 3 misalnya, sampel dengan konsentrasi 5µM yang akan memiliki nilai Ct terendah. Peningkatan niali *threshold* ini mengakibatkan sampel dengan konsentrasi primer 10µM tidak secara tetap memiliki nilai Ct terendah. Hal tersebut terjadi pula pada pengujian dengan suhu annealing Pada pengujian dengan suhu annealing 55$^{o}$C, 56$^{o}$C, 57$^{o}$C. Akan tetapi hal tersebut tidak terjadi pada suhu annealing 55$^{o}$C.

Selisih nilai Ct sampel dengan konsentrasi primer 7,5µM terhadap 10µM, pada pengujian suhu annealing 53$^{o}$C, 54$^{o}$C, 55$^{o}$C, 56$^{o}$C, 57$^{o}$C, secara berturut-turut adalah 0,5; 0,6; 0,4; 0,6; 0,2 (rata-rata = 0,46). Selisih nilai Ct pada sampel dengan konsentrasi primer 5µM terhadap 10µM, dalam suhu annealing 55$^{o}$C, 56$^{o}$C, 57$^{o}$C, secara berturut-turut adalah 1,1; 1,1; 1,2; 1,3; 0,2 (rata-rata = 0,82). Sedangkan selisih nilai pada sampel dengan konsentrasi primer 5µM terhadap 7,5µM pada pengujian suhu annealing 53$^{o}$C, 54$^{o}$C, 55$^{o}$C, 56$^{o}$C, 57$^{o}$C, secara berturut-turut adalah 0,6; 0,1; 0,8; 0,6; 0,8 (rata-rata = 0,58).

Nilai Ct untuk setiap konsentrasi primer pada suhu yang berbeada menunjukan nilai dibawah 20. Nilai Ct dibawah 30 masih dianggap baik, Ct yang hasilnya diragukan adalah bila melebihi 35 14. Sehingga dapat dikatakan bahwa setiap konsentrasi primer yang diuji pada suhu 53$^{o}$C, 54$^{o}$C, 55$^{o}$C, 56$^{o}$C, 57$^{o}$C, merupakan konsentrasi yang masih baik untuk deteksi *Brugia malayi*. Untuk alasan efisiensi, primer dengan konsentrasi 7,5µM atau 5µM, yang lebih rendah dari konsentrasi standar, masih dapat digunakan untuk deteksi *B. malayi* dengan Real-time PCR.

Melalui penelitian ini pula telah diketahui suhu annealing optimal untuk deteksi B. *malayi*, yaitu 55$^{o}$C. Pada suhu ini, sampel dengan konsentrasi primer 10µM menunjukan nilai Ct paling rendah yaitu . Perbedaan nilai Ct yang dihasilkan dari setiap sampel yang diuji pada suhu yang lebih tinggi dari 55$^{o}$C menujukan nilai Ct yang tidak jauh berbeda. Hal tersebut dimungkinkan karena perbedaan antar suhu yang diuji tidak dalam rentang yang lebar karena pengujian hanya dilakukan dengan rentang perbedaan 1oC. Berdasarkan hal tersebut dapat dikatakan bahwa suhu annealing 53$^{o}$C, 54$^{o}$C, 56$^{o}$C, 57$^{o}$C masih dapat digunakan untuk deteksi B.*malayi*, disamping menggunakan suhu 55$^{o}$C.

Namun yang perlu ditekankan adalah penetapan suhu annealing yang tepat menjadi penting karena pada kondisi suhu annealing yang terlalu tinggi menyebabkan gagalnya amplifikasi sedangkan pada kondisi suhu yang terlalu rendah akan menghasilkan produk dari amplifikasi non spesifik karena primer menempel pada sisi lain genom maka produk yang dihasilkan memiliki spesifitas yang rendah. Apabila dibandingkan dengan penelitian yang telah dilakukan Thancommang dkk (2013)[7], yang menggunakan primer yang sama, penelitian tersebut juga menggunakan suhu annealing 55$^{o}$C.

Dalam penelitian yang dilakukan oleh Hecker & Kennetth[16] pada tahun 1996, keduanya melakukan optimasi suhu annealing dengan rentang perbedaan 5$^{o}$C. Hal tersebut dapat menjadi pertimbangan apabila dilakukan penelitian selanjutnya untuk mengetahui dalam rentang suhu berapa yang dapat memunculkan perbedaan yang signifikan. Untuk dapat mendukung penetapan suhu annealing yang tepat, diperlukan pula analisis *melting curve* untuk melihat spesifisitas reaksi. Melalui analisis *melting curve* dapat diketahui apakah kondisi pengujian yang kita tentukan spesifik terhadap target yang diinginkan. Selain itu, karena primer SLX yang digunakan dalam penelitian ini dapat pula dipakai untuk mendeteksi *W. Bancrofti, B. pahangi*, dan *D. Immits*, sehingga untuk diperlukan analisis *Melting curve* untuk melihat perbedaan panjang produk yang dihasilkan. Melalui analisis ini pula dapat terlihat adanya produk non-spesifik yang terbentuk[6,13,17]. Selain itu, dalam penelitian ini, hasil amplifikasi belum dapat dihitung secara kuantitatif. Hal tersebut karena template yang digunakan merupakan produk PCR yang belum diketahui konsentrasinya dan tidak dilakukan pembuatan kurva standar yang dapat menjadi pembanding. Pembuatan kurva standar akan berfungsi untuk menilai efisiensi, reproduktifitas, dan dynamic range pada pengujian real-time PCR..

## KETERBATASAN PENELITIAN

Penelitian ini telah diusahakan dan dilaksanakan sesuai dengan prosedur ilmiah, namun demikian masih memiliki keterbatasan yaitu: pertama, dalam melakukan optimasi pada Real-time PCR sebenarnya memerlukan lebih banyak komponen yang diuji. Optimasi konsentrasi primer dan suhu annealing merupakan sebagian dari komponen tersebut. Diantara komponen yang perlu diuji namun tidak dilakukan dalam penelitian ini adalah validasi reaksi dengan. Kedua, primer yang digunakan dalam penelitian ini, dapat pula digunakan untuk deteksi filaria spesies *W. Bancrofti, B. pahangi,* dan *D. Immits*. Sehingga diperlukan pengujian *melting curve* untuk membedakan produk melalui suhu leleh produk yang dihasilkan

## KESIMPULAN

Optimasi untuk deteksi *Brugia malayi* menggunakan Real-time PCR dengan variasi konsentrasi primer dan suhu annealing menunjukan nilai Ct yang berbeda. Kondisi suhu annealling 55$^{o}$C dianggap optimal berdasarkan analisis kurva amplifikasinya. Sedangkan konsentrasi primer yang optimal untuk digunakan adalah 10µM

Disarankan agar dilakukan optimasi dengan memperbesar jarak antar suhu annealing yang diujikan, sehingga rentang suhu yang diujikan lebih lebar dan akan dapat terlihat perbedaannya dengan jelas. Selain itu, konsentrasi sampel yang digunakan pada pengujian ini terlalu tinggi, sehingga didapatkan nilai Ct yang relatif rendah maka perlu dilakukan uji pendahuluan untuk mendapatkan konsentrasi sampel yang sesuai. Di samping itu, pembuatan kurva standar dan analisis *melting curve* perlu dilakukan untuk dapat menilai sensitifitas dan spesifisitas reaksi.

**DAFTAR RUJUKAN**

1. WHO. Lymphatic Filariasis. Italy : World Health Organization, 2013.
2. Pusdatin Kemenkes RI. InfoDATIN Filariasis. s.l. : Kementrian Kesehatan, 2015.
3. Detection of *Brugia* Parasite DNA in HUman Blood by Real Time PCR. Rao, Remakrishna U, et al., et al. 11, s.l. : Journal of Clinical Microbiology, 2006, Vol. 44.
4. CDC. Parasites - Lymphatic Filariasis. Center of Disease Control and Prevention. [Online] 25 Maret 2015. [Dikutip: 18 September 2018.] https://www.cdc.gov/parasites/lymphaticfilariasis/biology_b_*malayi*.html.
5. WHO. Lymphatic Filariasis. World Health Organization. [Online] 2018. [Dikutip: 18 September 2018.] http://www.who.int/lymphatic_filariasis/epidemiology/epidemiology_diagnosis/en/.
6. Spesies Mikrofilaria Pada Penderita Kronis Filariasis Secara Mikroskopis Dan Polymerase Chain Reaction (Pcr) Di Kabupaten Tanjung Jabung Timur. Santoso and Saryaningtyas, Nungki Hapsari. 2015.
7. Rapid Detection and Identification of Wuchereria bancrofti, *Brugia malayi*, B. pahangi, and Dirofilaria immitis in Mosquito Vectors and Blood Samples by High Resolution *Melting* Real-Time PCR. Thanchomnang, Tongjit, et al., et al. 6, s.l. : Korean J Parasitol , 2013, Vol. 51.
8. Penggunaan Polimerase Chain Reaction (PCR) pada Diagnosis Filariasis. Majawati, Ester Sri. Jakarta : Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Ukrida.
9. NCBI. Polimerase Chain Reaction. NCBI. [Online] Bioteknologi , 9 September 2017. [Dikutip: 28 Februari 2019.] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/.
10. Advanced Techniques for Detection of Filariasis - A Review. Singh, Gurject, Raksha dan Urhekar, A.D. 2013, International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB).
11. Life Technologies Corporate. Termo FIsher Scientific. [Online] 2012. [Dikutip: 02 Oktober 2018.] http://www.thermofisher.com/id/en/home.html.
12. Checklist for Optimization and Validation of Real-Time PCR Assays. Raymaekers, Marijke, et al., et al. 2009, Journal of Clinical Laboratory Analysis, hal. 145-151.
13. Noalan, Tania, et al., et al. A Technical Guide PCR Technologies. s.l. : Sigma Aldrich, 2014.
14. Dorak, M. Tevfik. Real-time PCR. New York : Taylor & Francie Group, 2006.
15. Optimisation of PCR reactions using primer chessboarding. Gunson, Rory dan Gillespie, Greeme. s.l. : Elsevier, 2003, Vol. 26.
16. Hecker, Karl H and Roux, Kenneth H. High and Low Annealing Temperatures Increase Both Specificity and Yield in touchdown and Stepdown PCR. Tallahassee : BIOTECHNIQUES, 1996. Vol. 20.
17. BIO-RAD. Real-time PCR Applications Guide. s.l. : Bio-Rad Laboratories, Inc, 2006.