

Penggunaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) pada Diagnosis Filariasis

Esther Sri Majawati*

* Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Ukrida
Alamat korespondensi: Jl. Arjuna Utara No. 6 Jakarta Barat
Email: emajawati@yahoo.com

Abstrak

Sampai saat ini filariasis masih merupakan masalah kesehatan di Indonesia. Filariasis adalah penyakit penyebab kecacatan, oleh karena itu *World Health Organization* (WHO) menargetkan untuk mengeliminasi pada tahun 2020. Selama ini diagnosis filariasis yang biasanya dilakukan adalah dengan pemeriksaan darah tebal. Karena umumnya periodisitas mikrofilaria di Indonesia adalah malam hari, maka pengambilan sampel darah untuk teknik tersebut harus dilakukan pada malam hari, dan memerlukan waktu yang cukup lama untuk pengerjaannya. Cara ini dianggap kurang praktis untuk diagnosis filariasis suatu daerah endemis yang memerlukan cukup banyak pasien untuk diperiksa. Dengan adanya kemajuan di bidang bioteknologi, maka diperkenalkan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Kelebihan teknik ini adalah: sampel darah tidak harus diambil pada malam hari, sampel hanya diperlukan dalam jumlah sedikit, dan untuk jumlah sampel pasien yang banyak dapat dilakukan pemeriksaan dalam waktu yang bersamaan, sehingga sangat menghemat waktu.

Kata kunci : diagnosis filariasis, PCR

Abstract

Until now, this is still the problem of lymphatic filariasis in Indonesia. Lymphatic filariasis is a disease cause of disability, therefore the World Health Organization (WHO) target for eliminating it in 2020. During the time of diagnosis of lymphatic filariasis is usually done is by examination of thick blood. Because the general periodicity of microfilariae in Indonesia is the night, hence the blood sampling technique must be done at night, And take a long time for its workmanship, this mode is considered less practical for the diagnosis of filariasis-endemic areas that require a lot of patients to be examined. With the advances in biotechnology, then introduced the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR). The advantage of this technique are: blood samples should not be taken at night, the sample is only needed in small amounts, and for the total sample of patients who can do a lot of checks in the same time, so it saves time.

Key words : diagnosis of filariasis, PCR

Pendahuluan

Sampai saat ini filariasis masih merupakan masalah kesehatan di Indonesia.¹ Filariasis adalah penyakit yang menyebabkan cacat dan berada pada urutan kedua penyebab kecacatan setelah penyakit jiwa. Oleh karena itu filariasis merupakan salah satu penyakit yang ditargetkan oleh *World Health Organization* (WHO) untuk dieliminasi pada tahun 2020.² Diagnosis filariasis umumnya ditegakkan melalui pemeriksaan darah tebal penduduk yang

diduga daerah endemis filariasis, pada malam hari mengingat periodisitas mikrofilaria di Indonesia kebanyakan nokturna.³ Ada beberapa kendala pada pemeriksaan darah tebal, yaitu (1) pengambilan sampel darah harus dilakukan pada malam hari, sehingga bisa mengganggu kenyamanan pasien, (2) walaupun diambil dari darah tepi untuk pengulangan diperlukan sampel darah yang cukup banyak (3) pengerjaan untuk pemeriksaan 1 pasien memerlukan waktu cukup lama.

Dengan kemajuan bioteknologi telah dikembangkan diagnosis serologi melalui deteksi antigen yang hanya tersedia untuk pasien filariasis bancrofti,⁴ sedangkan untuk filaria *Brugia malayi* atau *Brugia timori* harus dengan deteksi DNA,^{5,6} yaitu melalui *Polymerase Chain reaction* (PCR) dan sampel yang digunakan adalah darah pasien. Pada tulisan ini akan diberikan gambaran mengenai teknik PCR untuk mendiagnosis filariasis.

Filariasis di Indonesia

Penyakit kaki gajah (filariasis) ialah penyakit menular yang disebabkan oleh infeksi cacing filaria dan ditularkan oleh berbagai jenis nyamuk. Cacing filaria hidup di kelenjar dan saluran getah bening sehingga menyebabkan kerusakan pada sistem limfatik yang dapat menimbulkan gejala akut berupa peradangan kelenjar dan saluran getah bening terutama di daerah pangkal paha dan ketiak tetapi dapat pula di daerah lain.⁷

Di Indonesia, filariasis disebabkan oleh 3 spesies cacing filarial yaitu: *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Brugia timori*.^{1,3,7}

Siklus Hidup Filaria^{1,3}

Filariasis di Indonesia yang disebabkan oleh 3 spesies filaria secara umum sama yaitu: Filariasis ditularkan dari pasien (orang yang di dalam darahnya mengandung mikrofilaria) baik yang simtomatik maupun asimtomatik kepada orang lain melalui gigitan nyamuk penularnya. Mikrofilaria yang terisap oleh nyamuk, melepaskan sarungnya di dalam lambung nyamuk menembus dinding lambung dan bersarang di antara otot-otot toraks. Mula-mula parasit ini memendek, bentuknya menyerupai sosis dan disebut larva stadium I. Dalam waktu kurang lebih seminggu, larva ini bertukar kulit, tumbuh menjadi lebih gemuk dan panjang dan disebut larva stadium II. Pada hari kesepuluh dan selanjutnya, larva ini bertukar kulit sekali lagi, tumbuh makin panjang dan lebih kurus dan disebut larva stadium III.

Gerak larva stadium III ini sangat aktif. Bentuk ini bermigrasi, mula-mula ke rongga abdomen dan kemudian ke kepala dan alat tusuk nyamuk. Bila nyamuk yang mengandung larva stadium III (bentuk infeksius) ini menggigit manusia, maka larva tersebut secara aktif masuk melalui luka tusuk ke dalam tubuh hospes dan

bersarang di saluran limfe setempat. Di dalam tubuh hospes, larva ini mengalami dua kali pergantian kulit, tumbuh menjadi larva stadium IV, stadium V atau cacing dewasa.

Cacing dewasa jantan dan betina hidup di saluran dan kelenjar limfe, bentuknya halus seperti benang dan berwarna putih susu. Cacing betina mengeluarkan mikrofilaria yang bersarang. Mikrofilaria itu hidup di dalam darah dan terdapat di aliran darah tepi pada waktu-waktu tertentu saja, jadi mempunyai periodisitas. Pada umumnya *W. bancrofti* bersifat periodisitas nokturna, artinya mikrofilaria hanya terdapat di dalam darah tepi pada waktu malam. Pada siang hari, mikrofilaria terdapat di kapiler alat dalam (paru-paru, jantung, ginjal dan sebagainya). Untuk *Brugia malayi* pada manusia dan *Brugia timori* di Indonesia, periodisitasnya juga nokturna.

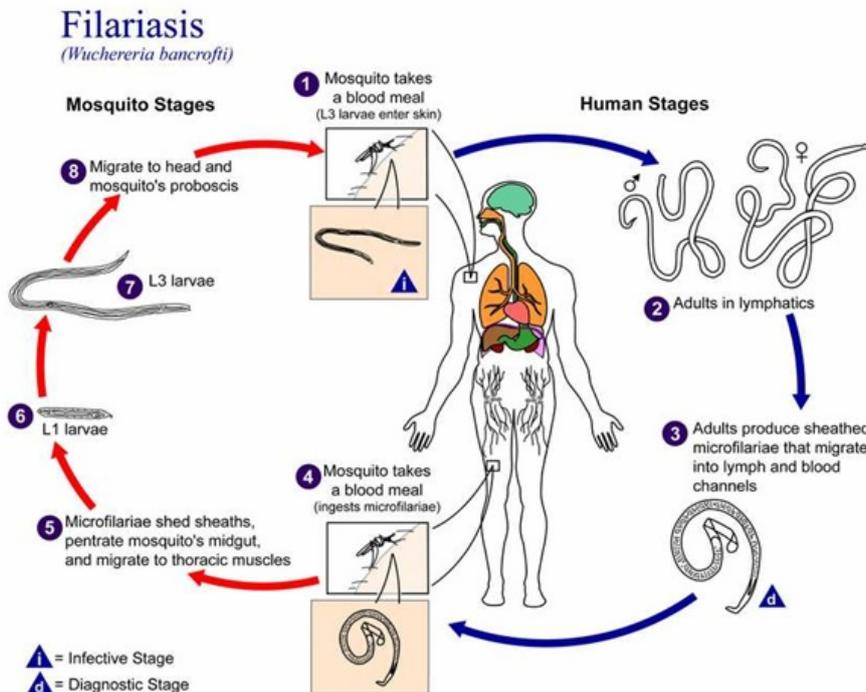
Diagnosis Filariasis

Deteksi parasit filaria yaitu menemukan mikrofilaria di dalam darah.³ Diagnosis filariasis yang biasa digunakan adalah dengan pemeriksaan darah tebal.¹ Pada filariasis nokturna, karena mikrofilaria berada dalam darah tepi pada waktu malam hari, maka sampel darah harus diambil pada malam hari, untuk mempermudah menemukan mikrofilaria.

Metode Baru untuk Diagnosis Filariasis

Oleh karena filariasis masih menjadi masalah kesehatan di beberapa negara berkembang, maka berbagai metode baru untuk diagnosis terus dikembangkan. Metode-metode baru tersebut terutama dititik beratkan untuk mendiferensiasi spesies filaria.

Diferensiasi spesies filaria yang sedang marak dikembangkan yaitu dengan menggunakan pelacak DNA yang spesifik spesies dan antibodi monoklonal untuk mengidentifikasi larva filaria dalam cairan tubuh dan dalam tubuh nyamuk vektor sehingga dapat membedakan antara larva filaria yang menginfeksi manusia dengan yang menginfeksi hewan.³ Dengan semakin pesatnya perkembangan biologi molekuler, maka telah berhasil dirancang dua *primer* spesifik untuk uji *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk *Wuchereria bancrofti* dan *Brugia malayi*, yang kemudian ditemukan bahwa untuk deteksi *Brugia timori* dapat menggunakan *primer Brugia malayi*.⁸



Gambar 1. Siklus penularan filariasis

<http://taradigingdangdong.wordpress.com/category/public-health/page/5/>

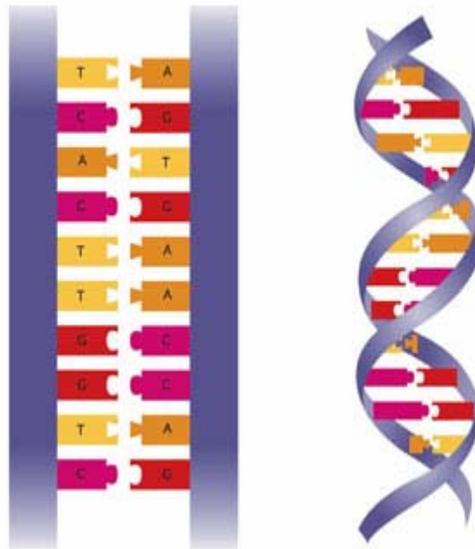
Deoxyribonucleic acid (DNA)

Deoxyribonucleic acid (DNA) adalah materi genetik yang terdapat dalam kromosom yang berperan sebagai pembawa informasi genetik. Watson dan Crick (1953) dalam Emery (1985)⁹ menunjukkan bahwa susunan DNA merupakan suatu struktur rantai ganda berbentuk heliks. DNA tersusun oleh nukleotida dihubungkan satu dengan lainnya melalui ikatan fosfodiester. Nukleotida itu sendiri tersusun atas basa nitrogen purin (guanine G dan adenine A) atau basa pirimidin (sitosin C dan timin T), gula pentosa dan gugus fosfat. DNA rantai ganda (double heliks) dibentuk oleh dua rantai polinukleotida yang berpasangan. Kedua rantai polinukleotida saling berpasangan pada arah yang berlawanan melalui ikatan hydrogen, satu rantai berada pada arah 5' – 3' dan pasangannya

berada pada 3' – 5'. Adenin (A) hanya dapat berpasangan dengan Timin (T) melalui ikatan hydrogen, dan Guanin (G) berpasangan dengan sitosin (C) melalui 3 ikatan hydrogen.

Klasifikasi DNA¹⁰

1. Unique DNA (DNA unik) : berisi gen yang mengkode protein dan hanya terdapat 1 salinan per haploid genom
2. DNA berulang yang dibedakan dalam 2 jenis berdasarkan jumlah salinan DNA berulang dalam genom
3. DNA berulang (moderately repetitive DNA) terdapat dalam jumlah 1.000–100.000 salinan per haploid genom, kadang-kadang ditranskripsikan menjadi RNA
4. DNA berulang (*highly repetitive DNA*) terdapat dalam jumlah 1.000.000 salinan per haploid genom. Fungsi tersebut sampai sekarang belum diketahui.



Gambar 2. *Deoxyribonucleic Acid* (DNA)
<http://leavingbionet.net/Hereditry-Higher Level.htm>

Brugia malayi mempunyai genom sepanjang 80.000.000 *base pairs* (bp), di antara sekuen DNA yang menyusun genom terdapat rangkaian DNA berulang spesifik (*highly repeated*) dengan panjang 322 bp dalam jumlah 30.000 salinan DNA. Jumlah salinan DNA berulang tersebut 12% dari seluruh genom *Brugia malayi*. DNA spesifik 322 bp dapat dipotong oleh enzim restriksi Hha I, yang diisolasi dari bakteri *Haemophilus haemolyticus*, oleh karena itu DNA berulang 322 bp sering dinamakan Hha I *family*.⁵ Dari hasil studi filogenetik menunjukkan bahwa rangkaian DNA berulang antara *Brugia malayi* dan *Brugia timori* dari pulau Flores identik. Rangkaian DNA berulang pada *Wuchereria bancrofti*, panjangnya 195 bp dalam jumlah 300 salinan DNA. DNA berulang ini didesain dari daerah 'Ssp I' yang mempunyai situs pengenalan unik yang dipotong endonuklease pada hampir semua salinan DNA. DNA berulang ini disebut Ssp I *family*.¹¹

Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR atau Reaksi Rantai Polymerase adalah suatu metode *in vitro* untuk memperbanyak DNA spesifik secara enzimatik pada suatu sekuen DNA yang telah diketahui dengan menggunakan enzim DNA polimerase yang stabil pada suhu tinggi dan sepasang *primer* oligonukleotida yang melakukan hibridisasi

pada bagian cetakan dari dua arah yang berlawanan.¹²

Pada satu rekasi PCR dibutuhkan campuran komponen reaksi dengan volum total 50 – 100 μ l. Komponen tersebut adalah cetakan DNA yang akan diperbanyak (*DNA template*), sepasang *primer* oligonukleotida, enzim DNA polimerase, deoksinukleotida trifosfat (dNTP), larutan dapar.¹³ Semua komponen tersebut akan dipaparkan pada tiga tingkatan suhu berulang, sampai DNA cetakan yang menjadi sasaran akan diperbanyak secara spontan. Otomatisasi teknik PCR ini dilakukan pada alat *thermal cycler*.¹⁴

Komponen PCR

1. Cetakan DNA

Pada setiap reaksi PCR diperlukan cetakan DNA hanya dalam jumlah yang sedikit dan tidak terkontaminasi. Pada suatu reaksi PCR diperlukan hanya 1 pg (pikogram) cetakan DNA.¹⁵

2. Primer oligonukleotida

Primer adalah susunan oligonukleotida yang panjangnya antara 20 – 30 basa nukleotida. *Primer* digunakan sebagai pembatas yang akan menempel pada kedua ujung cetakan DNA. Urutan basa pada primer merupakan basa komplemen dari masing-masing ujung fragmen DNA yang akan diperbanyak (cetakan DNA).

Primer yang baik memiliki kandungan basa GC 40 – 60%.¹⁶

Pada setiap reaksi PCR diperlukan sepasang *primer*, yaitu *primer* pertama sebagai *forward primer (upstream primer)* dan primer kedua sebagai *reverse primer (downstream primer)*. Pada proses perbanyakan DNA, primer akan menempel pada ujung cetakan DNA, lalu primer ini akan diperpanjang dengan penambahan basa lain yang komplementer terhadap basa cetakan DNA hingga akhirnya akan diperoleh untaian DNA lengkap baru sebanyak dua salinan. Pada satu reaksi PCR umumnya hanya memerlukan *primer* sebanyak 0,1 μ M sampai 1,0 μ M.¹⁷

Pada filariasis malayi, telah dirancang *primer* PCR untuk mendeteksi sekuen DNA berulang spesifik dengan panjang 322 bp. Primer tersebut adalah *forward primer* dengan panjang 18 mer 5' GCG CAT AAA TTC ATC AGC 3' dan *reverse primer* dengan panjang 23 mer 5' GCG CAA AAC TTA ATT ACA AAA GC 3'. Sekuen DNA berulang *Brugia timori* sama dengan *Brugia malayi*,¹⁸ maka *primer* yang digunakan juga sama dengan *B. malayi*. Untuk *W. bancrofti* primer yang digunakan adalah *forward primer* dengan panjang 21 mer 5' CGT GAT GGC ATC AAA GTA GCG 3' dan *reverse primer* dengan panjang 22 mer 5' CCC TCA CTT ACC ATA AGA CAA C 3'.

3. Enzim DNA *polymerase*

Enzim DNA *polymerase* diperlukan untuk memperpanjang *primer* sehingga terbentuk rangkaian DNA baru. Enzim DNA *polymerase* yang paling sering digunakan adalah *Taq polymerase*. Konsentrasi *Taq polymerase* yang biasa digunakan adalah 2-2,5 unit atau 1-45 unit per 100 μ l reaksi PCR.¹³

4. Deoksi nukleotida trifosfat (dNTP)

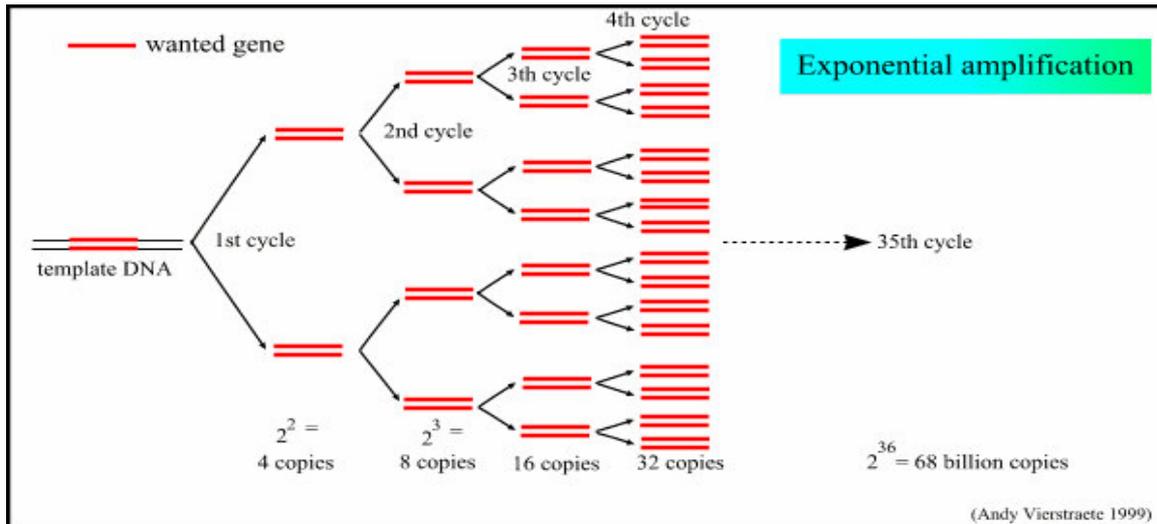
Pada proses PCR diperlukan bahan utama pembuat DNA yang terdiri atas deoksi Adenosin Trifosfat (dATP), deoksi Sistidin Trifosfat (dCTP), deoksi Guanosin Trifosfat (dGTP) serta deoksi Timidin Trifosfat (dTTP). Keempat nukleotida tersebut secara keseluruhan dikenal sebagai deoksinukleosida trifosfat, atau dNTP. Pada tahap pemanjangan *primer*, basa nitrogen tersebut akan diikat pada basa komplementer yang terdapat pada sekuen DNA sasaran (cetakan). Ujung 5' α -fosfat dari deoksinukleotida trifosfat merupakan awal sintesis DNA, dan berakhir pada ujung 3' pada gugus OH (hidroksil) terminal rangkaian DNA.¹⁶

Kebutuhan dNTP untuk suatu reaksi PCR bervariasi, umumnya 20 μ M atau 50 μ M sampai 200 μ M untuk setiap jenisnya. Apabila konsentrasinya kurang atau lebih dari jumlah tersebut, maka produk yang dihasilkan tidak akan optimum.¹³

5. Larutan dapar

Untuk kelangsungan reaksi PCR secara optimal diperlukan larutan dapar. Larutan dapar ini mempunyai beberapa formula, tetapi pada dasarnya mengandung kalium klorida, magnesium klorida, Tris HCl dan beberapa bahan kimia lain. Konsentrasi MgCl dapat bervariasi, tetapi umumnya antara 0,5–5,0 mM.¹³

Satu siklus PCR terdiri dari tiga tahap: tahap pemanasan (denaturasi), tahap penempelan primer (*annealing*), tahap pemanjangan primer (*extension*), dan suhu pada setiap tahap berbeda-beda. Setiap siklus (terdiri dari tiga kali tahap perubahan suhu) akan memperbanyak DNA cetakan dua kali lipat, sehingga banyak DNA yang dihasilkan pada proses PCR adalah 2ⁿ dimana n merupakan jumlah siklus.¹⁵



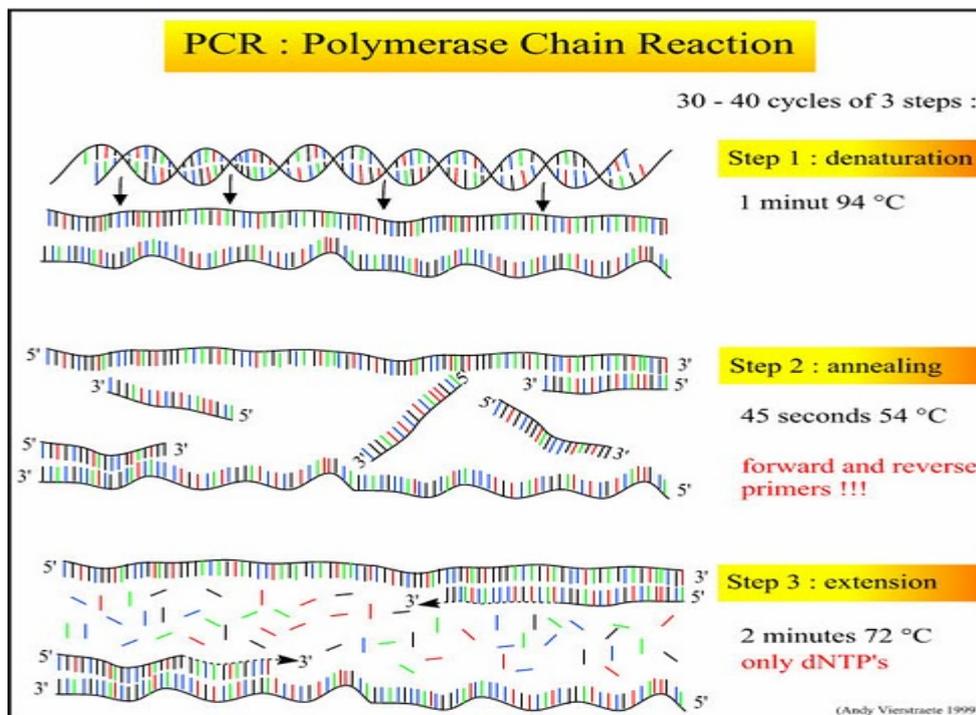
Gambar 3. perbanyak DNA secara eksponen dalam proses PCR
<http://sciencebiotech.net/mengenal-pcr-polymerase-chainreaction>

Tahapan dalam siklus PCR.

1. Tahap Denaturasi

Pada tahap denaturasi ini, terjadi pemisahan untai ganda cetakan DNA menjadi untai tunggal melalui proses inkubasi pada suhu tinggi. Suhu yang digunakan berkisar 90 – 95⁰ C,¹³ atau 94⁰ C selama 1 menit.¹⁹ Suhu yang tinggi ini digunakan tergantung pada banyaknya

kandungan GC sekuen DNA yang diamplifikasi.²⁰ Semakin banyak kandungan GC, semakin tinggi suhu denaturasi yang diperlukan. Proses denaturasi ini bisa gagal apabila suhu pemanasannya kurang tinggi, karena untai DNA yang terdenaturasi akan saling menempel kembali, dan akan mempengaruhi proses PCR



Gambar 4. Tahapan dalam siklus PCR
<http://sciencebiotech.net/mengenal-pcr-polymerase-chainreaction>

2. Tahap Penempelan *Primer (annealing)*

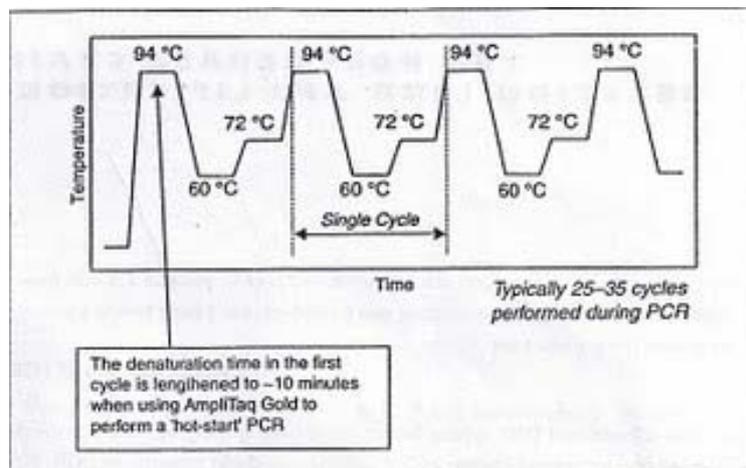
Pada tahap penempelan ini, terjadi penempelan oligonukleotida primer DNA pada ujung 3' dari masing2 untai tunggal cetakan DNA. Pada umumnya suhu penempelan berkisar antara 37 – 65⁰C,²¹ atau 55⁰C selama 30 detik,¹⁹ tergantung titik lebur TM primer oligonukleotida.

T_m dapat dihitung berdasarkan rumus $T_m = (A+T) \times 2^{\circ}C + (G+C) \times 4^{\circ}C$. Biasanya tahap penempelan primer menggunakan suhu 3 – 5⁰C di bawah nilai T_m atau 1-2⁰C di bawah nilai T_m.²²

3. Tahap Pemanjangan *Primer (extention)*

Pada tahap ini terjadi sintesis urutan pasangan cetakan DNA menjadi untai ganda baru. Setelah terjadi penempelan *primer* di atas, *primer* akan diperpanjang membentuk susunan basa yang komplementer dengan DNA cetakan.

Pada tahap pemanjangan *primer* ini, umumnya digunakan suhu yang disamakan dengan suhu 72⁰C yaitu suhu maksimum enzim *Taq polymerase*. Rasio temperatur yang dapat digunakan ialah 70–80⁰C, selama 30 detik sampai 1 menit.¹³



Gambar 5. Gambaran suhu siklus PCR

http://reaksichainpolimerase.blogspot.com/2007_07_01_archive.html

Semua tahapan ini dilakukan dengan menggunakan mesin DNA *thermal cycler*. Dan dalam 1 kali jalan, bisa dilakukan untuk banyak sampel.

Setelah tahap memperbanyak DNA ini, dilakukan pembacaan hasil dengan menggunakan pelacak DNA. Pelacak DNA untuk *Brugia malayi* dan *Brugia timori* adalah: 5'ACG TGA ATT GTA CCA TGG CTG GTC G 3', dan untuk *Wuchereria bancrofti* adalah: 5' GGT TAT ACC AAG CAA AC 3'.

Dengan teknik PCR ini jumlah sampel darah yang digunakan untuk sekali pemeriksaan hanya sebanyak 30 µl. Pada teknik PCR ini, yang dideteksi adalah DNA dari filaria, jadi apabila sampel darah pasien mengandung DNA filaria maka akan terdeteksi, dan pasien tersebut dinyatakan positif menderita filariasis. Dan

sampel darah tidak harus diambil pada waktu malam hari.

Penutup

Dengan adanya kemajuan di bidang bioteknologi, maka faktor-faktor yang dapat menjadi kendala diagnosis filariasis terutama untuk daerah endemis yang menggunakan banyak pasien dapat diatasi, yaitu dengan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction*, yang tidak memerlukan pengambilan sampel darah dalam jumlah banyak, pengambilan sampel tidak perlu dilakukan pada malam hari, yang akan mengganggu kenyamanan pasien, dan dalam sekali pengerjaannya bisa dilakukan untuk banyak sampel.

Daftar Pustaka

1. Depkes RI. Pedoman pemberantasan filariasis di Indonesia. Jakarta: Subdit Filariasis dan Schistosomiasis, Direktorat Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang, Direktorat Jendral Pemberantasan Penyakit Menular dan Penyehatan Lingkungan Pemukiman; 2001
2. Bebehani K. Candidate parasitic diseases. Bull WHO 76 (suppl 2) 1998: 64-7.
3. Partono F. Nematoda jaringan. Dalam: Gandahusada S, Ilahude HHD, Pribadi W, penyunting. Parasitologi Kedokteran . EDisi ketiga. Jakarta: Balai Penerbit FKUI; 1998. p 33-2.
4. Weil GJ, Lammie PJ, Weiss N. The ICT filariasis test: a rapid-format antigen test for diagnosis bancroftian filariasis. Parasitology Today 1997; 13(10): 401-4.
5. McReynold CA, Desimone SM, William SA. Cloning and comparison of repeated DNA sequences from the human filarial parasite *Brugia malayi* and the animal parasite *Brugia pahangi*. Proc Natl Acad Soc, USA 1986; 83: 797-801.
6. Supali T. Penerapan teknologi dalam diagnosis filariasis. Maj Parasitol Ind 1998; 11(1): 11-8.
7. Depkes RI. Pedoman pengobatan masal dalam rangka eliminasi penyakit kaki gajah (filariasis). Buku 4. Jakarta: Direktorat Jendral PPM & PLP, Direktorat P2B2, Subdit Filariasis dan Schistosomiasis; 2002c.
8. Haabrink M, Lymphatic filariasis. (disertasi). Leiden: Leiden University; 2000.
9. Emery AEH. Dasar-dasar genetika kedokteran (terjemahan). Yogyakarta: Yayasan Essentia Medica; 1985.
10. Supali T. Pengembangan pelacak DNA non radiosktif *Brugia malayi* pada tes dot blot dalam rangka pemantauan program pengendalian filariasis di Indonesia. (disertasi). Jakarta: Program Pascasarjana UI; 1992.
11. Zhong M, McCharthy, Bierwert L, Lizottr M, Chanteau S, Nutman TB, et al. A polymerase chain reaction assay for detection of the parasite *Wuchereria bancrofti* in human blood sample. Am J Trop Med Hyg 1996; 54(4): 357-63.
12. Erlich HA. Basic methodology. In: Erlich HA, editor. PCR technology: principles and applications for DNA amplification. New York: Stockton Press: 1989. p.1-5
13. Saiki RK. The design and optimization of the PCR. In: Erlich HA, editor. PCR technology: principles and application for DNA amplification. New York: Stockton Press: 1989.p.7-16.
14. Oste C. PCR automation. In: Erlich HA, editor. PCR technology: principles and application for DNA amplification. New York: Stockton Press; 1989.p.23-30.
15. Oste C. Polymerase chain reaction. Bio Techniques 1988; 6(2): 162-7.
16. Newton CR, Graham A. Basic principles and methods. In: PCR. 2nd ed. Oxon UK: Bios Scientific Publishers; 1997.p.1-46.
17. Sim. PCR technology in research and diagnostic. Jakarta; 1992.
18. Fischer P, Wibowo H, Pischke S, Ruckert P, Liebau E, Ismid I et al. PCR-based detection and identification of the filarial parasite *Brugia timori* from Alor island, Indonesia. Animals of Tropical Medicine & Parasitology 2002; 96(8): 809-21.
19. Gu J. In situ PCR-an overview. In: Gu J, editor. In situ PCR and related technology. Central st: Eaton Publishing; 1995.p.1-17.
20. Wanandi SI. Metode hibridisasi and labeling. Simposium dan pelatihan biologi molekuler untuk klini 1997 23 April.
21. William JF. Optimization strategies for the polymerase chain reaction. Biotechnology 1989; 7: 762-7.
22. Taylor GR. Polymerase chain reaction: basic principles and automation. In: McPherson MJ, Quierke P, Taylor GR, editors. PCR a practical approach. Oxford: Oxford University Press; 1996.p.1-14.