



Pengaruh Enzim Taq Polimerase dan Suhu *Annealing* terhadap Amplifikasi Gen Tropomyosin *Sarcoptes scabiei*

¹Taufik Mulya Perdana, ²Alfin Harjuno Dwiputro, ³Yogik Onky Silvana Wijaya, ⁴Tri Baskoro Tunggul Satoto

^{1,2,4}Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada

³Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada

Jalan Farmako, Sekip Utara, Yogyakarta 55281

Email: taufik.mulya.p@mail.ugm.ac.id, alfin.harjuno.d@mail.ugm.ac.id, yogik.onky.s@mail.ugm.ac.id, tribaskoro@ugm.ac.id

ABSTRAK

Skabies adalah penyakit kulit yang menjadi masalah kesehatan masyarakat, terutama di negara berkembang. Hingga saat ini, belum ada alat bantu diagnostik yang dapat digunakan untuk menunjang diagnosis skabies. Salah satu kandidat alat diagnostik yang gencar dikembangkan adalah uji imunologis yang mendeteksi antibodi anti-protein struktural dari *Sarcoptes scabiei* seperti tropomyosin. Selama ini, pembuatan tropomyosin rekombinan menggunakan sumber berupa *copy* DNA (cDNA) yang cenderung mahal. Untuk menekan beban produksi, digunakanlah *genomic* DNA (gDNA) sebagai sumber materi genetik. Akan tetapi, pembuatan tropomyosin rekombinan dari gDNA belum pernah dikerjakan. Oleh karena itu, dilakukanlah studi optimisasi *polymerase chain reaction* (PCR) ini sebagai langkah awal pengembangan alat bantu diagnostik tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi amplifikasi gen tropomyosin yang optimal dengan mempelajari efek penggunaan MyTaq™ HS Red Mix (MeridianBioscience) and GoTaq® Green Master Mix. (Promega) serta suhu *annealing* yang berbeda pada amplifikasi gen tropomyosin *S. scabiei*. Hasil PCR dengan MyTaq™ HS Red Mix pada suhu *annealing* 57.1°C, 60.9°C, 63.4°C, dan 65°C menghasilkan pita yang terlihat jelas. PCR dengan menggunakan GoTaq® Green Master Mix tidak menghasilkan amplifikasi DNA. Oleh karena itu, amplifikasi gen tropomyosin *S. scabiei* paling baik dilakukan dengan menggunakan MyTaq™ HS Red Mix, dengan suhu *annealing* 65°C.

Kata kunci: *sarcoptes scabiei*, skabies, optimisasi pcr, tropomyosin.

ABSTRACT

Scabies are a public health issue, especially in developing regions. Currently, a reliable diagnostic tool is still needed. Immunoassay that detects antibodies targeting *Sarcoptes scabiei* structural protein such as tropomyosin is among potential candidate. However, construction of recombinant tropomyosin usually uses the expensive *copy* DNA (cDNA). To cut production cost, constructing recombinant tropomyosin from *genomic* DNA (gDNA) is proposed as an alternative. However, this has not been attempted. Thus, as an initial step for this development, we performed a *polymerase chain reaction* (PCR) optimization study. To understand the ideal tropomyosin gene amplification condition, we studied the effect of using MyTaq™ HS Red Mix (MeridianBioscience) and GoTaq® Green Master Mix (Promega) as well as different *annealing* temperature to the amplification of *S. scabiei* tropomyosin gene. We found that PCR using MyTaq™ HS Red Mix at *annealing* temperature of 57.1°C, 60.9°C, 63.4°C, and 65°C produced visible bands. Meanwhile, PCR using GoTaq® Green Master Mix failed to produce any bands. As such, amplification of *S. scabiei* tropomyosin gene is best to be performed using MyTaq™ HS Red Mix, with the *annealing* temperature of 65°C.

Keywords: *sarcoptes scabiei*, skabies, pcr optimization, tropomyosin.

Pendahuluan

Skabies adalah penyakit kulit yang disebabkan oleh infestasi tungau *Sarcoptes scabiei* dengan tingkat penularan yang tinggi di negara tropis dan berkembang. Skabies dicirikan dengan sensasi gatal yang luar biasa, disertai dengan lesi pada kulit berupa kemerahan dan papula. Lesi tersebut diakibatkan oleh tungau yang membuat sarang untuk meletakkan telur di lapisan epidermis kulit. Reaksi gatal disebabkan oleh reaksi alergi terhadap komponen tungau tersebut atau terhadap *scybala* (materi feses tungau)^{1,2}. Sejak tahun 2017, *World Health Organization* (WHO) mengelompokkan skabies sebagai *neglected tropical disease* (NTD)³. Diestimasi sekitar 130 juta penduduk dunia menderita skabies di suatu waktu. Anak-anak sangat terdampak oleh skabies, dengan prevalensi skabies diperkirakan berkisar antara 5-50% dalam populasi anak-anak di daerah miskin⁴.

Gold standard untuk diagnosis skabies adalah visualisasi tungau *S. scabiei* melalui pemeriksaan mikroskopis. Namun, metode ini sering menghasilkan hasil negatif bahkan pada pasien dengan presentasi klinis yang sangat mengarah pada diagnosis tersebut. Walter, *et al.* menemukan bahwa pengamatan mikroskopis pada sample yang diambil dari kerokan kulit atau selotip memiliki tingkat sensitivitas masing-masing sebesar 46% dan 68%⁵. Selain itu, dermoskopi telah diusulkan sebagai metode diagnosis karena dianggap lebih sensitif, dengan beberapa laporan yang menyatakan tingkat sensitivitas yang berkisar pada 83 – 98.3%⁵⁻⁷. Alternatif yang lain adalah dengan

menggunakan *reflectance confocal microscopy*. Metode ini menunjukkan tingkat sensitivitas yang menjanjikan, yaitu 92%⁸. Meskipun demikian, teknik-teknik tersebut mahal sehingga kurang bisa diaplikasikan di fasilitas kesehatan bersumber daya terbatas dimana skabies lebih banyak ditemukan. Oleh karena itu, konsesus saat ini menitikberatkan pada kriteria diagnosis yang bersifat *examiner-dependent* dan sangat bergantung pada kemampuan sumber daya yang tersedia^{2,9}.

Untuk mengatasi ketimpangan ini, beberapa penelitian terdahulu telah mengusulkan pengembangan uji imunologis dengan menggunakan protein rekombinan dari tungau *S. scabiei*. Beberapa kandidat telah diusulkan untuk uji imunologis, di antaranya protein apolipoprotein, tirosin kinase, cofilin, and tropomyosin¹⁰⁻¹³. Protein tropomyosin, adalah target potensial karena banyak diekspresikan pada bagian mulut, otot, dan kaki *S. scabiei*. Zhang *et al*¹² sebelumnya telah melaporkan bahwa protein tropomyosin rekombinan dapat dikenali oleh serum kelinci (*Oryctolagus cuniculus*). Penelitian terdahulu membuat tropomyosin rekombinan dari *copy DNA* (cDNA). Penggunaan cDNA untuk hal ini memiliki beberapa keuntungan, terutama karena hanya terdiri dari ekson sehingga protein rekombinan yang terbentuk memiliki sekuens asam amino yang persis dengan protein aslinya. Meskipun demikian, pembuatan protein rekombinan menggunakan cDNA membutuhkan biaya yang lebih mahal jika dibandingkan *genomic DNA* (gDNA). Saat ini tidak ada protokol amplifikasi yang terpublikasi untuk gen tropomiosin *S. scabiei*. Sehingga,

sebagai langkah awal pembuatan tropomyosin rekombinan tersebut, dilakukanlah studi optimasi PCR untuk menentukan protokol amplifikasi tropomyosin dengan sumber gDNA *S. scabiei*. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan kondisi PCR dan *mix polymerase chain reaction* (PCR) yang sesuai untuk mengamplifikasi gen tropomyosin *S. scabiei*. Selanjutnya, gen tropomyosin yang teramplifikasi tersebut akan dikloning dan dimanfaatkan sebagai sumber pembuatan protein tropomyosin rekombinasi.

Metode

Sampel tungau didapatkan dari sampel kerokan kulit telinga kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) yang dipelihara untuk kultur *S. scabiei in vivo*¹⁴. Sampel tersebut disimpan di Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada di dalam *freezer* -20°C.

DNA diekstraksi dari kerokan kulit telinga kelinci dengan kit QiAmp DNA kit (Qiagen, Germany) sesuai dengan metode yang tercantum pada protokol pabrik. Konsentrasi DNA dihitung menggunakan nanodrop spektrofotometer dengan rasio absorbansi A260/A280. Amplifikasi dari gen ekson 5 tropomyosin dilakukan dengan *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan primer *forward* 5'-GAACGAGCCGAAACTGGAGAATCG -3' dan *reverse* 5'-CTCTCGATTCTCATCAAAGGCTGT -3'. Produk PCR yang diinginkan memiliki panjang 550 bp dari segmen gen tropomyosin *S. scabiei*.

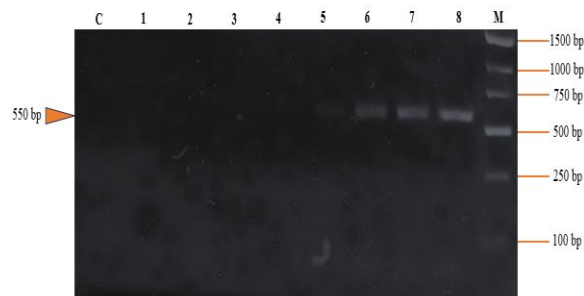
PCR dilaksanakan dengan menggunakan MyTaq™ HS Red Mix (MeridianBioscience) dan GoTaq® Green Master Mix (Promega). Volume total dari campuran PCR adalah 25 µl, berisikan 10 mM of dari tiap primer *forward* dan *reverse*, 37.34 ng/µl dari *template* DNA, 15 µl MyTaq™ HS Red Mix atau GoTaq® Green Master Mix, dan *nuclease-free water* sebanyak yang dibutuhkan untuk mencapai volume total.

Reaksi PCR dilaksanakan dengan menggunakan Biorad T100 Thermal Cycler dengan denaturasi awal 94°C selama 5 menit, dan 35 siklus dengan denaturasi di suhu 94°C selama 1 menit dilanjutkan dengan *annealing* selama 1 menit, dan ekstensi pada 72°C selama 1 menit, dilanjutkan dengan *final extension* pada 72°C selama 10 menit. Langkah *annealing* dilaksanakan dalam delapan suhu gradien: 45°C, 46.4°C, 48.8°C, 52.6°C, 57.1°C, 60.9°C, 63.4°C, dan 65°C. Hasil PCR dianalisis dengan elektroforesis pada 2% gel agarose. Penelitian ini telah mendapatkan *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan, FKMK UGM – RSUP Dr. Sardjito dengan nomor persetujuan KE/FK/0787/EC.

Hasil

Proses ekstraksi menghasilkan DNA dengan konsentrasi 18.67 ng/µl. Pembacaan absorbansi dengan rasio A260/A280 menghasilkan nilai absorbansi sebesar 1.939. Prosedur PCR kemudian dilakukan menggunakan dua *mix* PCR yang berbeda, yaitu MyTaq™ HS Red Mix dan GoTaq® Green Master Mix. Optimasi dilakukan dengan menggunakan gradien delapan suhu *annealing* yang berbeda (45°C, 46.4°C, 48.8°C, 52.6°C,

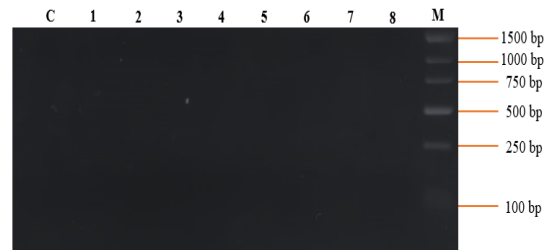
57.1°C, 60.9°C, 63.4°C, dan 65°C) untuk mengamplifikasi segmen gen tropomyosin *S. scabiei* berukuran 550 bp.



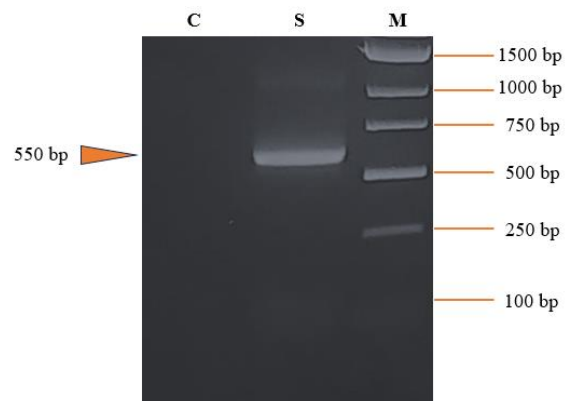
Gambar 1. Hasil PCR dengan menggunakan MyTaq™ HS Red Mix (MeridianBioscience). M: Marker. C: Kontrol Negatif. 1-8: Gradien *annealing*. (1) 45°C. (2) 46.4°C. (3) 48.8°C. (4) 52.6°C. (5) 57.1°C. (6) 60.9°C. (7) 63.4°C. (8) 65°C.

Amplifikasi DNA didapatkan melalui reaksi PCR menggunakan MyTaq™ HS Red Mix. Pita amplifikasi DNA pertama didapatkan pada suhu *annealing* 57.1°C. Seiring dengan meningkatnya suhu *annealing*, pita amplifikasi yang terbentuk menjadi semakin jelas. Pita paling terlihat jelas pada suhu *annealing* 65°C (**Gambar 1**).

Berdasarkan posisi pita terhadap marker DNA *ladder*, dapat divisualisasi bahwa pita yang dihasilkan merupakan pita yang ditargetkan yaitu 550 bp segmen dari gen tropomyosin *S. scabiei*. Sementara itu, PCR menggunakan GoTaq® Green Master Mix tidak menghasilkan pita ampifikasi sama sekali (**Gambar 2**). Untuk mengkonfirmasi hasil optimisasi kami, reaksi PCR lain kami lakukan dengan menggunakan MyTaq™ HS Red Mix pada suhu *annealing* 65°C. Seperti yang kami prediksi, gel elektroforesis memunculkan pita yang terlihat jelas secara konsisten (**Gambar 3**).



Gambar 2. Hasil PCR dengan menggunakan GoTaq® Green Master Mix (Promega). M: Marker. C: Kontrol Negatif. 1-8: Gradien *annealing*. (1) 45°C. (2) 46.4°C. (3) 48.8°C. (4) 52.6°C. (5) 57.1°C. (6) 60.9°C. (7) 63.4°C. (8) 65°C.



Gambar 3. Hasil PCR dengan menggunakan MyTaq™ HS Red Mix (MeridianBioscience) dan suhu *annealing* 65°C. S: Sampel M: Marker. C: Kontrol Negatif.

Pembahasan

Secara keseluruhan, hasil penelitian menunjukkan bahwa gen tropomyosin *S. scabiei* paling baik diamplifikasi dengan menggunakan MyTaq™ HS Red Mix pada suhu *annealing* 65°C. Kandungan GC% dari primer yang digunakan pada studi ini masing-masing adalah 54% dan 46% untuk primer *forward* dan *reverse*. Hal ini mempengaruhi *melting temperature* (T_m) dari primer yang kita gunakan. Berdasarkan perhitungan yang dilakukan, T_m dari primer yang digunakan adalah 65°C dan 62°C untuk primer *forward* dan *reverse*. Suhu *annealing* yang ideal diduga

berada dalam kisaran $\pm 5^{\circ}\text{C}$ dari T_m primer¹⁵. Penggunaan suhu annealing yang rendah dapat menyebabkan terjadinya *false priming* dan berujung pada amplifikasi non-spesifik yang memproduksi pita dengan besar yang berbeda dengan gen target. Di lain pihak, suhu annealing yang terlalu tinggi dapat menurunkan jumlah produk PCR karena primer tidak dapat secara efektif melakukan *annealing* ke sekuen target^{15,16}. Oleh karena itu, pada penelitian ini suhu annealing dimulai dari $\pm 10^{\circ}\text{C}$ di bawah temperature annealing ideal secara teori.

Percobaan PCR dengan menggunakan MyTaq™ HS Red Mix memperlihatkan pita amplifikasi yang jelas pada suhu annealing 60.9°C , 63.4°C , dan 65°C , serta pita samar terproduksi pada suhu *annealing* 57.1°C . Tidak terlihat adanya pita yang ditunjukkan pada elektroforesis gel agarose untuk hasil PCR pada suhu *annealing* yang lebih rendah. Penemuan ini sesuai dengan teori bahwa suhu *annealing* ideal berada dalam $\pm 5^{\circ}\text{C}$ dari T_m primer¹⁵.

Di lain pihak, percobaan menggunakan GoTaq® Green Master Mix tidak memproduksi pita amplifikasi sama sekali. Hal ini dimungkinkan karena adanya perbedaan pada karakteristik MyTaq™ HS Red Mix dan GoTaq® Green Master Mix. MyTaq™ HS Red Mix adalah *mix* PCR *hot-start*, sedangkan GoTaq® Green Master Mix merupakan *mix* Taq polymerase konvensional. *Hot start* PCR memiliki keunggulan dibandingkan dengan *mix* PCR konvensional karena dapat mencegah amplifikasi DNA sampai tercapainya suhu denaturasi. Inhibisi tersebut dapat terjadi karena adanya netralisasi antibodi¹⁷, *Taq polymerase* yang termodifikasi secara kimiawi¹⁸, atau

bahkan penggunaan vektor bakteri yang mengekspresikan *Taq polymerase*¹⁹. Oleh karena itu, *hot start* PCR menurunkan amplifikasi non-spesifik, sehingga meningkatkan produksi amplifikasi sekuen target²⁰.

Kemungkinan lain penyebab kegagalan amplifikasi DNA adalah rendahnya konsentrasi DNA dan keberadaan kontaminan. Keberadaan substansi lain seperti protein atau RNA sebagai kontaminan pada hasil ekstraksi DNA memang dapat menghambat aktivitas polimerase, karena dapat berujung pada hasil amplifikasi PCR yang buruk¹⁹. Tahapan ekstraksi kami memproduksi campuran DNA dengan konsentrasi $18,67\text{ ng}/\mu\text{l}$. Hasil ini masih masuk dalam kisaran campuran PCR ideal yaitu antara 10 hingga $30\text{ ng}/\mu\text{l}$ ²¹. Untuk menilai keberadaan kontaminasi protein, dilakukan spektrofotometri dengan rasio absorbansi A_{260}/A_{280} . Ditemukan bahwa campuran DNA yang digunakan dalam penelitian ini memiliki rasio absorbansi 1.939. Nilai ini dekat dengan nilai absorbansi dari DNA murni, yaitu 1.8²². Oleh karena itu, kecil kemungkinan kegagalan amplifikasi DNA menggunakan GoTaq® Green Master Mix pada eksperimen ini dikarenakan kurangnya konsentrasi DNA atau keberadaan kontaminan.

Meskipun demikian, penelitian ini tidak luput dari kekurangan. Sebagai contoh, dikarenakan kurangnya pendanaan, kami tidak dapat melakukan pengujian menggunakan kit ekstraksi DNA yang berbeda. Kit ekstraksi yang berbeda mungkin menghasilkan hasil PCR yang berbeda²³⁻²⁵. Selain itu, karena tidak adanya publikasi terdahulu yang melaporkan

amplifikasi tropomyosin *S. scabiei* dari gDNA, kontrol positif tidak digunakan dalam penelitian ini. Sebagai gantinya, pada penelitian ini kami menggunakan kontrol negatif sebagai pembanding untuk membuktikan bahwa primer yang telah didesain hanya spesifik mengenali sekuens gen tropomyosin *S. scabiei*. Pada kontrol negatif, digunakan sampel ekstraksi DNA darah manusia. Seperti yang dapat dilihat di **gambar 3**, tidak ditemukan pita amplifikasi pada hasil PCR kontrol negatif menggunakan MyTaq™ HS Red Mix (MeridianBioscience).

Kesimpulan dan Saran

Dengan mempertimbangkan segala temuan tersebut, disimpulkan bahwa amplifikasi dari gen tropomyosin *S. scabiei* paling baik dilakukan dengan MyTaq™ HS Red Mix pada suhu *annealing* 65°C. Kegagalan amplifikasi saat menggunakan GoTaq® Green Master Mix kemungkinan besar disebabkan sifatnya sebagai campuran PCR konvensional, karena konsentasi dan kemurnian campuran DNA relatif cukup baik. Oleh karena itu, ke depannya penelitian maupun pengujian yang melibatkan gen tropomyosin *S. Scabiei* dapat menggunakan MyTaq™ HS Red Mix pada suhu *annealing* 65°C sebagai kondisi amplifikasi gennya.

Ucapan Terima Kasih

Riset ini didanai oleh Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada melalui Hibah Dana Masyarakat dengan nomor 740/UN1/FKKMK/PPKE/PT/2023. Atas

sokongan dana tersebut, penulis mengucapkan terima kasih.

Daftar Pustaka

1. Arlian LG, Morgan MS. A review of *Sarcoptes scabiei*: Past, present and future. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):1–22.
2. Engelman D, Yoshizumi J, Hay RJ, Osti M, Micali G, Norton S, et al. The 2020 International Alliance for the Control of Scabies Consensus Criteria for the Diagnosis of Scabies. *British Journal of Dermatology* [Internet]. 2020 Nov 1;183(5):808–20. Available from: <https://doi.org/10.1111/bjd.18943>
3. World Health Organization. Scabies [Internet]. 2020 [cited 2023 Nov 14]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/scabies>
4. El-Moamly AA. Scabies as a part of the World Health Organization roadmap for neglected tropical diseases 2021–2030: what we know and what we need to do for global control. *Trop Med Health*. 2021;49(1).
5. Walter B, Heukelbach J, Fengler G, Worth C, Hengge U, Feldmeier H. Comparison of Dermoscopy, Skin Scraping, and the Adhesive Tape Test for the Diagnosis of Scabies in a Resource-Poor Setting. *Arch Dermatol* [Internet]. 2011 Apr 11;147(4):468–73. Available from: <https://doi.org/10.1001/archdermatol.2011.51>
6. Dupuy A, Dehen L, Bourrat E, Lacroix C, Banderdouche M, Dubertret L, et al.

- Accuracy of standard dermoscopy for diagnosing scabies. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2007 Jan 1;56(1):53–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2006.07.025>
7. Li FZ, Chen S. Diagnostic Accuracy of Dermoscopy for Scabies. *Korean J Parasitol*. 2020 Dec;58(6):669–74.
 8. Cinotti E, Labeille B, Cambazard F, Biron AC, Chol C, Leclercq A, et al. Videodermoscopy compared to reflectance confocal microscopy for the diagnosis of scabies. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016 Sep;30(9):1573–7.
 9. Osti MH, Sokana O, Gorae C, Whitfield MJ, Steer AC, Engelman D. The diagnosis of scabies by non-expert examiners: A study of diagnostic accuracy. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2019 Aug 19;13(8):e0007635-. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007635>
 10. Walton SF, Pizzutto S, Slender A, Viberg L, Holt D, Hales BJ, et al. Increased allergic immune response to *Sarcoptes scabiei* antigens in crusted versus ordinary scabies. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2010;17(9):1428–38.
 11. Shen N, Chen Y, Wei W, Xiong L, Tao Y, Xiao J, et al. Comparative analysis of the allergenic characteristics and serodiagnostic potential of recombinant chitinase-like protein-5 and -12 from *Sarcoptes scabiei*. *Parasit Vectors* [Internet]. 2021;14(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04654-0>
 12. Zhang R, Jise Q, Zheng W, Ren Y, Nong X, Wu X, et al. Characterization and evaluation of a *Sarcoptes scabiei* allergen as a candidate vaccine. *Parasit Vectors*. 2012;5(1):1–9.
 13. Zheng Y, He R, He M, Gu X, Wang T, Lai W, et al. Characterization of *Sarcoptes scabiei* cofilin gene and assessment of recombinant cofilin protein as an antigen in indirect-ELISA for diagnosis. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2016;16(1):21. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1353-1>
 14. Satoto TBT, Diptyanusa A, Dwiputro AH. In Vivo Culture and Identification of *Sarcoptes scabiei* using Cox-1 Gene. Unpublished Data.
 15. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*. 2012 May 22;(63).
 16. Silalahi D, Wirawan IGP, Sasadara MM V. Optimization of annealing temperature for amplification of *EhoscNola* locus in pranajiwa (*Euchresta horsfieldii*) plant collected from mountains, urban and coastal areas in Bali. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* [Internet]. 2021;913(1):012059. Available from: <https://dx.doi.org/10.1088/1755-1315/913/1/012059>
 17. Kellogg DE, Rybalkin I, Chen S, Mukhamedova N, Vlasik T, Siebert PD, et al. TaqStart Antibody: “hot start” PCR facilitated by a neutralizing monoclonal

- antibody directed against Taq DNA polymerase. *Biotechniques* [Internet]. 1994;16(6):1134–7. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/8074881>
18. Birch DE, Kolmodin L, Wong J, Zangenberg GA, Zoccoli MA, McKinney N, et al. Simplified hot start PCR. *Nature* [Internet]. 1996;381(6581):445–6. Available from: <https://doi.org/10.1038/381445a0>
 19. Lee SJ, Park SY, Lee KH, Lee MW, Yu CY, Maeng J, et al. Development of a Simple Direct and Hot-Start PCR Using *Escherichia coli*-Expressing Taq DNA Polymerase. *Int J Mol Sci*. 2023 Jul 1;24(14).
 20. Mubarak SMH, Al-Koofee DAF, Radhi OA, Ismael JM, Al-Zubaidi ZF. An optimization and common troubleshooting solving in polymerase chain reaction technique. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 2020;11(2):427–36.
 21. Asif S, Khan M, Waqar Arshad M, Shabbir MI. PCR Optimization for Beginners: A Step by Step Guide. *Research in Molecular Medicine* [Internet]. 2021 Apr 30;9(2):81–102. Available from: <https://rmm.mazums.ac.ir/article-1-414-en.html>
 22. Qamar W, Khan MR, Arafah A. Optimization of conditions to extract high quality DNA for PCR analysis from whole blood using SDS-proteinase K method. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. 2017;24(7):1465–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X16301140>
 23. Dawson P, Buyukyavuz A, Ionita C, Northcutt J. Effects of DNA extraction methods on the real time PCR quantification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* in chicken feces and ceca contents. *Poult Sci* [Internet]. 2023;102(2):102369. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579122006630>
 24. Chen M, Wu BL, Chen T, Liu Z, Deng ZL, Peng L. The impact of different DNA extraction methods on the analysis of microbial diversity of oral saliva from healthy youths by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *J Dent Sci* [Internet]. 2016;11(1):54–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1991790215000975>
 25. Kim YS, Yu HK, Lee BZ, Hong KW. Effect of DNA extraction methods on the detection of porcine ingredients in halal cosmetics using real-time PCR. *Appl Biol Chem* [Internet]. 2018;61(5):549–55. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13765-018-0389-x>