Biogenerasi Vol 11 No 2, 2026
Biogenerasi: Jurnal Pendidikan Biologi
Universitas Cokroaminoto Palopo
https://e-journal.my.id/biogenerasi
e-ISSN 2579-7085

Optimasi Primer : Suhu *Annealing* untuk Deteksi Gen *Matrix* Virus Influenza A Menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

[1*]NataliaTurnip, [2]Nova Dilla Yanthi, [1]Dwi Hilda Putri

[1]Universitas Negeri Padang, Indonesia

[2] Badan Riset dan Inovasi Nasional, Indonesia

*Corresponding author E-mail: nataliaturnip326@gmail.com

DOI : https://doi.org/10.30605/e9cf4f40

Accepted : 8 April 2026 Approved : 19 April 2026 Published : 20 April 2026

Abstract

Influenza A virus (IAV) is a pathogen that attacks the respiratory tract in humans and animals, which can be a threat to public health. This virus has a number of genes that are targeted by PCR for diagnostic detection purposes, one of which is the matrix gene. Detection of the matrix gene in the Influenza A virus from DNA/RNA genetic material can be done using the polymerase chain reaction (PCR) technique. One of the stages that determines the success of the PCR process is the annealing stage, for which the optimum temperature and cycle are required for primer attachment in the annealing stage. This research is a descriptive study towards an experiment conducted in June 2025 at the Bacteriology Laboratory of the Research and Innovation Agency (BRIN) KST. Soekarno Cibinong. The results obtained showed that the optimum temperature for matrix gene amplification in the Influenza A virus using the forward primer FluAV M-U44 and reverse primer FluAV M-L287 was 53.5 °C, 54 °C, and 54,5 °C and 35 cycles were evidenced by the formation of a fairly bright band in the electrophoresis results.

Keywords: *Optimization, Polymerase Chain Reaction, Annealing temperature, Primers, Avian Influenza Viruses*

PENDAHULUAN

Virus Influenza A (IAV) adalah patogen yang menyerang saluran pernapasan pada manusia dan satwa, yang dapat menjadi ancaman bagi kesehatan masyarakat (Chen *et al*., 2022). Virus ini terdiri dari delapan segmen genom yang mengkode setidaknya sebelas protein virus (Das K *et al* 2010). Di Indonesia wabah AI pertama kali terjadi tahun 2003 pada ayam petelur di pulau Jawa. (Frisa *et al*., 2017). Penyebaran AI ditularkan antar individu melalui *droplet* atau percikan saluran pernapasan. (Abhishek *et al*., 2025). AI memiliki sejumlah gen yang menjadi target PCR untuk tujuan deteksi diagnostik (Sari *et al*., 2021). Di antara gen-gen tersebut, gen matriks sering dipilih untuk amplifikasi karena sifatnya yang konservasi dan memainkan peran struktural dan fungsional penting dalam siklus hidup virus AI (Shtykova *et al*., 2013;Kusuma *et al*., 2019). Teknik PCR dapat digunakan untuk deteksi gen *matrix* AI secara cepat dan spesifik, namun efektivitasnya sangat bergantung pada suhu *annealing* primer yang digunakan.

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan metode amplifikasi DNA yang paling banyak digunakan dalam diagnostik molekuler karena kecepatan dan akurasi deteksinya (Mackay *et al*., 2017). Amplifikasi DNA dengan metode PCR melibatkan tiga tahap, diawali dengan denaturasi DNA untuk memisahkan untai ganda, dilanjutkan dengan *annealing* primer pada DNA target dan diakhri dengan extension berupa pemanjangan sekuen DNA (Fira Safitri, 2023). Keberhasilan PCR sangat bergantung pada parameter-parameter teknik, salah satunya adalah suhu dan siklus *annealing* yang mempengaruhi ikatan primer dengan template DNA (Pertiwi *et al*., 2015). Suhu *annealing* merupakan salah satu faktor utama yang harus diatur dengan tepat agar primer dapat melekat secara spesifik pada template target tanpa menimbulkan produk non-spesifik (Putri *et al*., 2021). Suhu *annealing* yang tepat dapat memastikan primer menempel dengan baik pada daerah target sehingga menghasilkan amplikon yang spesifik dan intensitas pita yang jelas pada elektroforesis gel agarosa (Sundararajan *et al*., 2021).

Suhu *annealing* yang terlalu rendah dapat menyebabkan ikatan tidak spesifik antara primer dan DNA template, sehingga muncul produk non-target (Gladys *et al*., 2023). Jika suhu *annealing* terlalu tinggi, maka primer gagal menempel dengan cukup kuat, sehingga proses amplifikasi tidak efisien atau bahkan tidak terjadi amplifikasi sama sekali (Gladys *et al*., 2023). Oleh karena itu, penting dilakukan optimasi suhu *annealing* untuk mendapatkan hasil yang bagus dan dapat dipercaya. Penggunaan variasi suhu *annealing* pada PCR memungkinkan identifikasi suhu kerja terbaik untuk primer yang digunakan. Untuk menentukan suhu *annealing* yang optimal, uji gradien suhu *annealing* menjadi langkah utama dalam optimasi kondisi PCR pada berbagai sampel biologis, termasuk virus (Atifa *et al.,* 2023). Selain suhu *annealing,* proses pengulangan atau jumlah siklus juga sangat berpengaruh terhadap efisiensi reaksi PCR. Siklus yang terlalu sedikit tidak mampu menghasilkan produk amplifikasi yang cukup, sedangkan siklus yang berlebihan dapat menimbulkan amplifikasi samping yang mengganggu hasil akhir (Sisca *et al.*, 2022).

Keberhasilan reaksi PCR sangat dipengaruhi oleh primer yang digunakan karena primer berperan dalam menentukan batas daerah target yang akan diamplifikasi secara spesifik (Amanda *et al*., 2019). Primer FluAV merupakan salah satu jenis primer yang digunakan untuk mendeteksi virus Influenza A secara spesifik. Namun suhu *annealing* yang spesifik dalam penggunaan primer ini masih belum diketahui. Optimasi suhu dan siklus *annealing* PCR untuk primer FluAV perlu dilakukan secara sistematis menggunakan berbagai variasi suhu dan siklus agar didapatkan kondisi yang paling optimal dalam hal spesifisitas dan sensitivitas amplifikasi (Anggreni *et al*., 2024).

Penelitian ini akan melakukan optimasi suhu dan siklus *annealing* PCR pada gen *matrix* AI dengan tujuan mendapatkan suhu dan siklus *annealing* yang optimum. Hasil optimasi ini akan menjadi dasar untuk pengembangan metode PCR diagnostik yang lebih akurat dalam deteksi virus AI pada sampel unggas dan lainnya.

METODE

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen untuk menentukan suhu *annealing* dan siklus yang optimal dalam deteksi gen matric pada virus Influenza A. Untuk

mendapatkan suhu *annealing* yang optimal dilakukan variasi suhu (gradient).

1. Isolasi RNA

Sampel yang digunakan adalah hasil isolasi dari virus AI subtipe H9N2, sering digunakan sebagai kontrol positif karena kestabilan dan kejelasan amplifikasinya di berbagai kondisi PCR. Subtipe H9N2 diekstraksi menggunakan *ZymoBIOMICS ™ RNA Miniprep* KIT. Kemudian dihitung asam nukleat hasil ekstraksi RNA menggunakan *Qubit*, setelah itu simpan pada suhu -80°C agar RNA tidak rusak.

2. Optimasi Suhu *Annealing* PCR

Daerah gen *matrix* virus AI diamplifikasi menggunakan primer forward FLUAV-MU44 (GTCTTCTAACCGAGGTCGAAACG) dan primer reverse FLUAV-M-L287 (GCATTTTGGACAAAGCGTCTACG) untuk menghasilkan amplikon sepanjang 243 bp (Anthony, 2012). Reaksi PCR dilakukan pada beberapa suhu *annealing* yang berbeda mulai dari 52.5°C sampai 55°C dengan masing-masing tabung 25 µL reaksi, yang terdiri dari 12,5 µl 2X MyTaq One Step Mix, 0.25µL RT-Enzyme, 0.5 µL RNase inhibitor, 6.75µL DPEC H2O, 1µL masing-masing primer FluAV M-U44 dan FluAV M-L287, dan 3 µl RNA template.

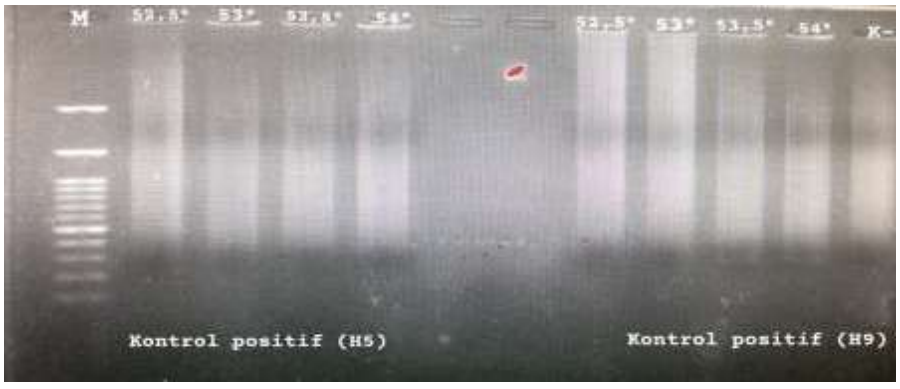
PCR dilakukan sebanyak dua kali dengan variasi suhu dan siklus *annealing* yang berbeda. Tahapan reaksi pertama *reverse transcription* pada suhu 45°C selama 40 menit. Selanjutnya, dilakukan 40 siklus yang meliputi pra-denaturasi pada suhu 94°C selama 2 menit, dilanjutkan dengan denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan primer (*annealing*) pada suhu yang bervariasi yaitu 52,5°C, 53°C, 53,5°C, dan 54°C, serta elongasi pada suhu 72°C selama 30 detik. Siklus reaksi diakhiri dengan elongasi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit, kemudian produk PCR disimpan sementara pada suhu 4°C hingga analisis amplifikasi selesai. PCR kedua dilakukan dengan suhu *annealing* yang sedikit berbeda, yaitu pada suhu 53°C, 53,5°C, 54°C, 54,5°C, dan 55°C, dengan jumlah siklus sebanyak 35 kali

3. Elektoforesis

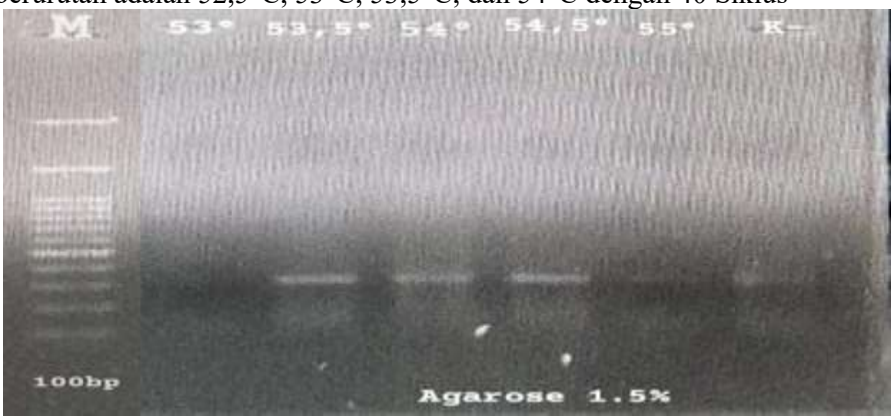
Visualisasi produk PCR menggunakan teknik elektroforesis dengan konsentrasi gel agarose 1.5% (0,6g bubuk agarose dalam 40 ml buffer TAE 1X). Larutan dipanaskan menggunakan *microwave* selama 5 menit hingga larut. Sebanyak 4µl gel red ditambahkan kedalam larutan gel agarose, kemudian tuang larutan ke dalam cetakan dan tunggu sampai agar memadat. Selanjutnya agar yang telah padat dimasukkan ke dalam *chamber* elektroforesis yang telah berisi 500 ml buffer TAE 1X. Sebanyak 3µl produk PCR yang akan dianalisis dicampur dengan 1µl loading dye dan 4µl template produk PCR, selanjutnya dimaut ke dalam masing-masing sumur gel agarose. Selain produk PCR, pada proses elektroforesis juga disertakan DNA ladder 100 bp sebagai penanda ukuran pita DNA hasil PCR. Running elektroforesis pada tegangan listrik 70 volt selama 45 menit. Kemudian visualisasi dan analisis hasil PCR menggunakan UV transiluminator.

HASIL PENELITIAN

Berdasarkan hasil optimasi suhu *annealing* amplifikasi gen Avian Influenza Virus menggunakan primer *forward* FluAV M-U44 dan *reverse* FluAV M-L287 didapatkan hasil yang ditampilkan pada Gambar 1 dan Gambar 2.



Gambar 1. Hasil Elektroforesis PCR pertama Optimasi Suhu *Annealing* Amplifikasi Gen *matrix* Virus AI menggunakan primer *forward* FluAV M-U44 dan *reverse* FluAV M-L287 secara berurutan adalah 52,5°C, 53°C, 53,5°C, dan 54°C dengan 40 Siklus



Gambar 2. Hasil Elektroforesis PCR kedua Optimasi Suhu *Annealing* amplifikasi gen *matrix* Virus AI menggunakan primer *forward* FluAV M-U44 dan *reverse* FluAV M-L287 secara berurutan adalah 53°C, 53,5°C, 54°C, 54,5°C, dan 55°C dengan 35 Siklus.

Dari hasil pengamatan pada Gambar 1. memperlihatkan hasil elektroforesis dari PCR pertama dalam optimasi suhu *annealing* untuk amplifikasi gen *matrix* virus AI. Pada variasi suhu *annealing* 52,5°C, 53°C, 53,5°C, dan 54°C dengan 40 siklus, hasil amplifikasi menunjukkan pita DNA dengan intensitas yang berbeda-beda. Tampak bahwa suhu *annealing* di kisaran 53.5°C hingga 54°C menghasilkan pita, namun pita yang dihasilkan masih sangat tipis dan *smear*. Pada suhu *annealing* 52,5°C hingga 53°C, pita tidak terdeteksi, kemungkinan karena suhu rendah menyebabkan ikatan primer kurang selektif sehingga tidak terjadi amplifikasi.

Gambar 2. menunjukkan hasil PCR kedua dengan variasi suhu 53°C, 53,5°C, 54°C, 54,5°C, dan 55°C dan jumlah siklus dikurangi menjadi 35 siklus. Pada kondisi ini, pita DNA terlihat lebih jelas dan tajam pada suhu 53,5°C, 54°C, dan 54,5°C menunjukkan bahwa penurunan jumlah siklus PCR disertai dengan peningkatan suhu annealing menyebabkan pergeseran suhu annealing optimal ke kisaran yang lebih tinggi, sehingga menghasilkan amplifikasi yang lebih kuat dan spesifik (Sundararajan *et al*., 2021).

Pada suhu *annealing* 55°C, pita yang terbentuk terlihat sangat tipis dan kurang jelas yang menandakan pembentukan ikatan primer yang terlalu lemah akibat suhu yang terlalu tinggi sehingga menghambat proses amplifikasi (Nguyen *et al*., 2021). Hal ini menggarisbawahi pentingnya keseimbangan temperatur *annealing* untuk mencapai hasil PCR yang optimal.

Optimalisasi suhu *annealing* juga berperan penting dalam meminimalisir amplifikasi produk non-spesifik dan dimers primer yang dapat mengganggu interpretasi hasil gel elektroforesis (Hernawan *et al*., 2024).

Suhu *annealing* yang optimal memungkinkan primer berikatan secara spesifik dengan sekuens target, sehingga menghasilkan pita DNA yang tajam dan jelas pada hasil elektroforesis. Ketepatan suhu *annealing* juga berpengaruh langsung terhadap konsistensi hasil PCR. Suhu *annealing* yang tidak optimal dapat menyebabkan variasi hasil yang signifikan antar percobaan, yang pada akhirnya berpotensi memengaruhi akurasi diagnosis (Sari et al., 2021).

Suhu *annealing* yang tepat memastikan kemampuan primer untuk hanya melekat pada lokasi target, meningkatkan ketajaman pita pada elektroforesis. Pentingnya suhu *annealing* juga terlihat pada hasil PCR. Suhu yang tidak optimal menyebabkan *variation result* yang signifikan antar percobaan, yang dapat memengaruhi diagnosis dan penelitian flu burung (Sari *et al*., 2021).

Penurunan jumlah siklus dari 40 ke 35 siklus pada PCR kedua menunjukkan bahwa setelah optimasi suhu *annealing*, jumlah siklus dapat dikurangi tanpa menurunkan kualitas amplifikasi. Ini relevan untuk efisiensi laboratorium dan mengurangi risiko amplifikasi produk non-spesifik yang meningkat pada siklus lanjut (Chen *et al*., 2022).

Dari hasil penelitian ini, suhu *annealing* optimal berada dalam rentang 53.5°C hingga 54,5°C untuk primer FluAV M-U44 dan M-L287. Pengaturan suhu *annealing* dalam kisaran ini dapat menjadi referensi dalam deteksi molekuler virus Influenza A menggunakan primer FluAV. Teknik optimasi suhu *annealing* PCR yang sistematis sangat disarankan dalam pengembangan protokol PCR untuk berbagai aplikasi genetik, khususnya virus RNA yang membutuhkan amplifikasi sensitif dan spesifik seperti FluAV (Wijayanti & Permadi, 2022). Pengembangan metode seperti ini memperkuat kapasitas deteksi virus secara cepat dan akurat, mendukung pengendalian penyakit. Dengan demikian, hasil optimasi ini dapat berkontribusi pada standarisasi protokol PCR diagnostik. Implementasi suhu *annealing* dan jumlah siklus yang tepat akan meningkatkan efektivitas dan efisiensi.

SIMPULAN DAN SARAN

Suhu optimum amplifikasi gen *matrix* virus Influenza A menggunakan primer forward FluAV M-U44 dan reverse FluAV M-L287 berada pada kisaran 53,5°C–54,5°C, dengan jumlah siklus optimal sebanyak 35 siklus. Kondisi ini menghasilkan pita DNA yang jelas dengan tingkat *smear* minimal, sehingga menunjukkan amplifikasi yang spesifik dan efisien. Optimasi kondisi PCR ini berperan penting dalam meningkatkan akurasi deteksi virus Influenza A dan dapat mendukung kegiatan surveilans penyakit. Oleh karena itu, kondisi tersebut direkomendasikan untuk digunakan dalam deteksi molekuler, serta perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan cakupan sampel dan target gen yang lebih luas.

DAFTAR RUJUKAN

Abhishek, V., Gopalareddy, S., & Priya Eswaran, S. (2025). Prevalence of Influenza Viruses A and B in Seasonal Flu : A Tertiary Care Hospital Study. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *14*(3), 170–179. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2025.1403.020

Anggreni, D., Wahyuni, S., & Suwandi, I. (2024). Optimasi suhu *annealing* PCR untuk deteksi gen spesifik pada virus unggas. *Jurnal Bioteknologi Indonesia*, 19(2), 85-92.

Anthony SJ*, et al*. 2012. Emergence of fatal avian influenza in New England harborseals. *MBio*. 3(4)

Atifa, Y., Rahman, M. A., & Dewi, F. R. (2023). Penerapan variasi suhu *annealing* dalam optimasi PCR terhadap spesifisitas hasil amplifikasi. *Jurnal Bioteknologi dan Biomolekuler*, 18(3), 121-130.

Chen, X., *et al*. (2022). PCR optimization strategies for viral RNA detection. *Molecular Biotechnology*, 64(5), 528-540.

Fira Safitri dan Afifatul Achyar. 2023. In Silico Primer Design For Chicken ND5 Gene Amplification By Real Time Polymerase Chain Reaction (rtPCR). *Serambi biologi*. Vol. 8 No. 3

Frisa, A., Elfidasari, D., & Murtini, S. (2017). *Seroprevelensi Virus Avian Influenza SubTipe H5N1*. *4*(2), 74–82.

Gladys, S., Putri, N. A., & Hidayati, R. (2023). Pengaruh suhu *annealing* terhadap amplifikasi PCR: Studi kasus pada gen bakteri patogen. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 17(1), 45-53.

Lee, S. H., *et al*. (2020). Effects of *annealing* temperature on PCR specificity and efficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 531(1), 280-285.

Mackay, I. M., *et al*. (2017). Real-time PCR in virology. *Journal of Clinical Virology*, 104, 87-94.

Pertiwi, E. A., Hasanah, S., & Firdaus, F. (2015). Optimasi suhu *annealing* PCR untuk amplifikasi gen 16S rRNA bakteri. *Jurnal Ilmu Farmasi*, 12(1), 25-31.

Purwanto, B., Nurrahman, H. H., & Wijaya, A. F. (2018). Optimasi metode PCR untuk deteksi patogen tanaman dengan variasi suhu *annealing*. *Jurnal Bioteknologi*, 15(2), 88-94.

Putri, D. H., Rahman, A. A., & Sari, M. N. (2021). Optimasi suhu *annealing* PCR untuk amplifikasi gen target pada virus. *Jurnal Biologi Terapan*, 9(2), 89-96.

Sari, D. K., *et al*. (2021). Detection of avian influenza virus in domestic poultry using optimized PCR protocols. *Veterinary Research Communications*, 45(3), 159-168.

Shtykova, E. V, Baratova, L. A., Fedorova, N.

V, Radyukhin, V. A., Ksenofontov, A. L., Volkov, V. V, Shishkov, A. V, Dolgov, A. A., Shilova, L. A., Batishchev, O. V, Jeffries, C. M., & Svergun, D. I. (2013). *Structural Analysis of Influenza A Virus Matrix Protein M1 and Its Self-Assemblies at Low pH*. *8*(12), 1–10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082431

Sisca, M., Prasetyo, E., & Wulandari, A. (2022). Peran siklus amplifikasi pada efektivitas PCR untuk deteksi patogen. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*, 15(1), 45-52.

Sundararajan, V., Kumar, P. S., & Rajasekaran, K. (2021). Suhu *annealing* dalam PCR dan pengaruhnya terhadap spesifisitas amplifikasi. *Journal of Molecular Diagnostics*, 23(4), 510-517.

Wijayanti, N., & Permadi, D. (2022). Sensitivity increase in avian influenza detection using optimized *annealing* temperature. *Journal of Molecular Diagnostics*, 24(2), 241-250

Zhang, Y., *et al*. (2018). Optimization of PCR *annealing* temperature for sensitive viral detection. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 8639-8648.