

OPTIMISATION OF PRIMER CONCENTRATION AND ANNEALING TEMPERATURE IN PCR TEST METHOD FOR AFRICAN SWINE FEVER VIRUS DETECTION

Optimasi konsentrasi primer dan suhu annealing pada metode uji pcr untuk deteksi virus african swine fever

Luh Dewi Anggreni^{1*}, Ni Made Ritha Krisna Dewi², I Gusti Ngurah Kade Mahardika³, I Gusti Ngurah Narendra Putra⁴

¹PLP Ahli Madya Laboratorium Diagnosa Klinik, Patologi Klinik dan Radiologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Jl. Raya Sesetan, Gg. Makrisa No. 6. Denpasar Selatan, Bali, Indonesia

²Laboran Laboratorium Biomedik dan Biologi Molekuler Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Jl. Raya Sesetan, Gg. Makrisa No. 6. Denpasar Selatan, Bali, Indonesia;

³Laboratorium Virologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman, Denpasar Bali, Indonesia;

⁴Fungsional Medik Veteriner Ahli Muda Dinas Pertanian dan Pangan Kabupaten Badung. Puspem Badung, Sempidi, Badung, Bali Indonesia.

*Corresponding author email: dewi.anggreni@unud.ac.id

Anggreni LD, Dewi NMK, Mahardika IGK, Putra IGNN. 2024. Optimisation Of Primer Concentration and Annealing Temperature in Pcr Test Method for African Swine Fever Virus Detection. *Bul. Vet. Udayana*. 16(1): 218-224. DOI: <https://doi.org/10.24843/bvu.v16i1.88>

Abstract

African Swine Fever disease (ASF) causes high fatality number in domestic pigs. The most sensitive and specific laboratory diagnostic is PCR. The successful of PCR is determined by DNA quality, Annealing temperature, MgCl₂ concentration, polymerase enzymes, primer concentration, and PCR cycles. The Annealing process requires in the right temperature. The difference annealing temperature causes amplification process failure. The specificity and sensitivity of PCR products are determined by the optimal annealing temperature. PCR optimization, variations of time, temperature, and primer concentration can be adjusted. This study was conducted by PCR testing to detect DNA ASF virus using primer concentration and the most optimum Annealing temperature. Identification of primer concentrations and annealing temperature begins to make PCR components volume 10 µl: 5µL PCR Master Mix, a pair of ASF primer 0.5 µl (5µm and 10 µm), 1µL DNA templates, and 3µL ddH₂O. The PCR component is processed in a thermocycler with a temperature condition of 95°C pre-denaturation (5 minutes), and denaturation at 94°C (45 seconds). The gradient annealing temperature starts at 50°C, 52°C, 55°C, 59°C and 65°C for 1 minute. Temperature 72 ° C for synthesis 1 minute. repetition of the cycle is 34 times. Final synthesis for 72°C (5 minutes), the storage temperature is 22°C. The result of optimization at the primer concentration of 10 µm obtained a cleared band according to the target compared to the primary concentration of 5 µm. The best annealing temperature in this research is 55 °C. If the Annealing temperature is given lower, causing primer attachment to the DNA template is not specific so non-specific PCR products are formed/many bands. Conversely, if the annealing temperature is higher, causing primary attachment to the template DNA will be released so that the band that appears is very thin/PCR product is not formed/does not appear.

Keywords: Annealing, ASF, PCR, primer

Abstrak

Penyakit *African Swine Fever* (ASF) menyebabkan kematian tinggi pada babi domestik. Diagnosis laboratorium paling sensitif dan spesifik adalah PCR. Keberhasilan PCR ditentukan oleh kualitas DNA, suhu *annealing*, konsentrasi $MgCl_2$, enzim polimerase, konsentrasi primer dan siklus PCR. Proses *annealing* memerlukan suhu yang tepat. Perbedaan suhu *annealing* menyebabkan kegagalan proses amplifikasi. Spesifitas dan sensitifitas produk PCR ditentukan oleh suhu *annealing* yang optimal. Optimasi PCR, variasi waktu, suhu dan konsentrasi primer dapat disesuaikan. Penelitian ini dilakukan pengujian PCR untuk mendeteksi DNA Virus ASF menggunakan konsentrasi primer dan suhu *annealing* yang paling optimum. Identifikasi konsentrasi primer dan suhu *annealing* diawali membuat komponen PCR volume 10 μ L: 5 μ L PCR Master Mix, sepasang primer ASF 0,5 μ L (5 μ M dan 10 μ M), 1 μ L DNA Template, dan 3 μ L ddH₂O. Komponen PCR diproses pada *Thermocycler* dengan kondisi suhu 95°C pra-denaturasi (5 menit), denaturasi pada 94°C (45 detik), secara *gradient* suhu *annealing* dimulai 50°C, 52°C, 55°C, 59°C dan 65°C selama 1 menit. Suhu 72°C untuk sintesis 1 menit. pengulangan siklus 34 kali. Final Sintesis selama pada 72°C (5 menit), suhu penyimpanannya 22°C. Hasil optimasi pada konsentrasi primer 10 μ M didapatkan *band* lebih jelas dan sesuai target dibandingkan dengan konsentrasi primer 5 μ M. Suhu *annealing* terbaik dalam penelitian ini adalah 55°C dengan *band* paling tebal, terang, jelas, tunggal/single dibandingkan suhu *annealing* 50°C, 52°C, 59°C, 65°C. Apabila suhu *annealing* diberikan lebih rendah, menyebabkan penempelan primer pada DNA template tidak spesifik sehingga terbentuk produk PCR non-spesifik/banyak *band*. Sebaliknya, apabila suhu *annealing* lebih tinggi, menyebabkan penempelan primer pada DNA template akan terlepas sehingga *band* yang muncul sangat tipis/produk PCR tidak terbentuk/tidak munculnya.

Kata kunci: Annealing, ASF, PCR, primer

PENDAHULUAN

Penyakit ASF (*African Swine Fever* /Demam Babi Afrika) menyebabkan kematian yang tinggi pada babi domestik (Oura and Arias, (2021)). Penyakit ASF menyebabkan kerugian ekonomi secara global dan signifikan karena mengancam keamanan pangan dan perdagangan babi (Bram et al., (2002); Mason-D'Croz et al., 2020). Penyakit ini muncul di Indonesia pada awal September 2019, dengan episode kematian dilaporkan pada babi pekarangan di Kabupaten Dairi dan Humbang Hasundutan, Provinsi Sumatera Utara. Sejak itu, 521 wabah ASF telah diberitahukan di 21 dari 33 kabupaten di provinsi itu, dengan menyebabkan kematian hampir 40.000 ekor babi (Dharmayanti et al., (2021); OIE, 2022).

Penyakit ASF sulit dibedakan secara klinis dari Demam Babi Klasik. Berdasarkan OIE, diagnosis laboratorium untuk penyakit ASF adalah isolasi virus dengan inokulasi leukosit babi atau kultur sumsum tulang, sedangkan deteksi DNA genom dapat dilakukan dengan Teknik Polimerase Chain Reaction (PCR) (Oura and Arias, (2021)). PCR terbukti baik, sangat sensitif, spesifik (Maharani et al., 2005) untuk mendeteksi ASFV. Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan uji diagnostik yang sangat sensitive. Tiga tahap siklus PCR terdiri dari yaitu denaturasi, annealing (penempelan) pasangan primer dan pemanjangan (Handoyo dan Rudiretna, 2000). Keberhasilan dalam pengujian Polimerase Chain Reaction ditentukan oleh kualitas DNA, suhu annealing, konsentrasi buffer dan $MgCl_2$, enzim polimerase, konsentrasi primer dan siklus PCR (Gelfand and White, (1990)).

Pada tahap amplifikasi DNA, suhu annealing dapat mempengaruhi keberhasilan pada proses PCR. Proses annealing memerlukan suhu yang tepat. Perbedaan suhu akan menyebabkan kegagalan dalam proses amplifikasi. Untuk mengetahui suhu annealing (T_a) yang optimum pada primer dapat ditentukan dengan menghitung suhu melting (T_m) dari primer tersebut (Handoyo dan Rudiretna, 2000). Spesifitas dan sensitifitas suatu produk PCR ditentukan oleh suhu annealing yang optimal. Sehingga proses annealing sangat penting untuk mendapatkan produk DNA yang maksimum pada daerah yang ditargetkan. Pada tahapan optimasi PCR,

variasi waktu, suhu dan konsentrasi primer dapat disesuaikan. Konsentrasi primer dan suhu annealing sangat menentukan keberhasilan reaksi PCR. Pada penelitian ini akan dilakukan pengujian PCR untuk deteksi DNA Virus ASF menggunakan konsentrasi primer dan suhu annealing yang paling optimum.

METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel darah babi yang diduga menderita penyakit African Swine Fever (ASF), Primer forward OIAASFF: 5'-ATGGATACCGAGGGAATAGC-3' dan primer reverse OIAASFR: 5'-CTTACCGATGAAATGATAC-3', tabung antikoagulan dan venoject,

KIT Purifikasi DNA (GeneJet®) meliputi: digestion solution, lysis Solution, proteinase K Solution, etanol 50%, RNase solution, collum collection buffer, wash buffer solution I, wash buffer solution II, elution buffer. Sedangkan KIT PCR (Go Taq Green PCR®) meliputi: MasterMix reagent (buffer, ddNTP, MgCl₂, Enzim Taq Polimerase), ddH₂O dan sepasang primer oligonukleotida. Untuk elektroforesisnya bahan-bahan yang diperlukan meliputi: etidium bromida, agarose powder, dan TAE Buffer 1x.

Alat yang digunakan berupa mesin penyiklus DNA (Thermocycler), Laminar flow, timbangan digital, lemari pendingin, mesin sentrifuse, mikropastel, mikrotube 1,5 ml, mikropipet, mikrotips, mesin heatblock, mesin vortex, Microwave, UV Transluminator, dan gel doc elektroforesis.

Ekstraksi Darah Babi (Buffy Coat)

Darah babi yang ada di dalam tabung antikoagulan ditambahkan aquadest sampai 7/8 bagian tabung. Darah yang telah ditambahkan dengan aquadest dihomogenkan dan disentrifuse 12 selama 5 menit pada kecepatan 5000rpm. Supernatant dibuang sedangkan endapannya ditambahkan kembali dengan aquadest sampai 7/8 bagian tabung dan dihomogenkan. Larutan yang telah homogen disentrifuse Kembali selama 5 menit pada kecepatan 5000rpm langkah ini diulang 3 sampai 5 kali sampai supernatannya berwarna putih bersih dan buffycoat muncul (seperti lendir dan jika ditambahkan aquadest akan melayang-layang).

Ekstraksi DNA Virus ASF

Ekstraksi DNA sesuai dengan panduan manual Kit DNA Purifikasi GeneJet®. Sepuluh milligram buffycoat dimasukkan ke dalam mikrotube kemudian di gerus dengan mikropastel sampai hancur. Selanjutnya sampel ditambahkan 400µl Lysis Solution dan 20µl Proteinase K Solution kemudian di vortek selama 15-30 detik. Setelah itu campuran diinkubasikan selama 10 menit pada suhu 56°C, kemudian ditambahkan 200µl Ethanol 96% dan vortex. Selanjutnya campuran dimasukkan ke dalam tube collum collection GenJet® dan disentrifuse pada kecepatan 6000rpm selama 1 menit. Tube bagian bawah collum dibuang dan diganti dengan tube baru. Proses pencucian DNA dimulai dengan menambahkan 500µl buffer WB I pada lysate. Catridge disentrifuse selama 1 menit pada kecepatan 8000rpm setelah itu cairan bagian bawah dibuang. Selanjutnya catridge ditambahkan 500µl buffer WB II kemudian disentrifuse selama 3 menit pada kecepatan 12000rpm. Selanjutnya proses Eluting DNA dimulai dengan menambahkan 200µL elution buffer pada catridge yang telah dipindahkan pada mikrotube 1,5ml kemudian kemudian diinkubasikan pada suhu ruangan selama 2 menit setelah itu disentrifuse selama 1 menit pada kecepatan 8000rpm. Setelah itu, catridge bisa dibuang. DNA

hasil ekstraksi dapat disimpan pada suhu minus (-20°C). Untuk menghindari freezing dan thawing sebaiknya DNA hasil ekstraksi di aliquot.

Identifikasi Sampel DNA Virus ASF dengan Uji PCR

Identifikasi suhu annealing yang optimum pada pengujian PCR untuk Virus ASF diawali dengan membuat campuran komponen pada pengujian PCR dengan volume 10µl yang terdiri dari: 5µL Go Taq Green Master Mix 2x, sepasang primer dengan volume masing-masing 0,5µL (5 mM dan 10mM) OIAASFF: 5'-ATGGATACCGAGGGAATAGC-3' dan OIAASFR: 5'-CTTACCGATGAAATGATAC-3' DNA Template sebanyak 1µl dan ddH₂O sebanyak 3µl. Selanjutnya campuran komponen reagent PCR di proses pada mesin penyiklus DNA (Thermocycler) yang telah diprogram dengan kondisi suhu 95°C untuk pra-denaturasi 5 menit, selama 45 detik untuk denaturasi pada 94°C, secara gradient suhu annealing dimulai 50°C, 52°C, 55°C, 59°C dan 65°C dengan waktu 1 menit. Pada 72°C untuk suhu sintesis selama 1 menit. pengulangan siklus dari proses denaturasi sampai sintesis diulang sebanyak 34 kali. Terakhir untuk suhu final Sintesis/Ekstension/Elongasi selama 5 menit pada 72°C dan 6) suhu penyimpanannya 22°C selama tak terhingga.

Elektroforesis

Proses elektroforesis diawali dengan pembuatan gel agarose 1%. Agarose powder sebanyak 1 gram ditambahkan 100ml 1X TAE Buffer dihomogenkan, kemudian dimasukkan ke dalam microwave sampai larutannya mendidih kemudian ditambahkan etidium bromide sebanyak 5µl. Setelah tercampur baik kemudian dicetak kedalam cetakan gel agar yang telah diberikan sisir untuk membentuk lubang/sumuran pada gel agarose. Setelah gel mengeras kemudian diletakkan kedalam mesin elektroforesis yang berisi TAE Buffer 1X. Untuk mengetahui Panjang basa produk DNA, pada sumuran pertama ditambahkan ladder 100bp (Invitrogen®). Sumuran selanjutnya dimasukkan DNA hasil amplifikasi. Empat mikroliter produk PCR diambil kemudian dimasukkan ke dalam sumuran. Setelah semua produk PCR dimasukkan ke dalam gel agarose, kemudian mesin elektroforesis disetting dengan tegangan 100V, 400 mA, selama 30 menit.

Analisis Data

Analisis data hasil pengujian konsentrasi primer dan optimasi suhu annealing untuk PCR dari sampel DNA Virus ASF ditampilkan secara deskriptif. Kontrol negative berfungsi sebagai batasan untuk menentukan tipis tebalnya pita hasil uji PCR. Semakin terang band /pita yang muncul maka semakin tepat/optimum konsentrasi primer dan suhu annealing untuk mendeteksi DNA Virus ASF.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Pada Gambar 1 menunjukkan bahwa kode A merupakan hasil elektroforesis DNA produk PCR dengan konsentrasi primer 5µM dan kode B merupakan hasil elektroforesis DNA produk PCR dengan konsentrasi primer 10µM. Angka 1,2,3,4 dan 5 merupakan hasil elektroforesis DNA produk PCR Virus ASF dengan suhu annealing 50°C, 52°C, 55°C, 59°C dan 65°C. Hasil elektroforesis DNA Virus ASF didapatkan panjang band 300bp. Produk PCR pada konsentrasi 5µM terlihat tipis, sedangkan pada konsentrasi primer 10µM band yang didapatkan terlihat tebal, bersih dan sesuai dengan ukuran target yaitu 300bp, *Ladder* juga terpisah dengan baik. Pada suhu *annealing* 50°C dan 52°C terlihat bahwa hasil produk PCR belum spesifik karena masih terdapat *double band* pada sampel no 1 dan 2. Pada suhu tersebut diperlukan optimasi konsentrasi primer dan suhu *annealing* agar produk yang dihasilkan *single band*, tebal, bersih

dan sesuai dengan target. Suhu annealing terbaik pada penelitian ini adalah 55°C, karena pada suhu *annealing* 55°C terlihat *band* yang muncul sudah spesifik (*single band*) dengan panjang DNA 300bp sesuai dengan target primer ASF yang digunakan. Sedangkan pada suhu annealing 59°C *band* yang dihasilkan sudah spesifik namun lebih tipis dari suhu 55°C. Pada suhu *annealing* 65°C baik pada konsentrasi primer 5µM maupun konsentrasi primer 10µM semua sampel tidak menunjukkan adanya *band*. Oleh karena itu tidak perlu dilakukan optimasi suhu *annealing* lebih tinggi lagi karena pada suhu *annealing* 65°C

Pembahasan

Pada optimasi ini digunakan produk DNA template hasil isolasi/ekstraksi dari darah babi yang terdiagnosa menderita penyakit ASF. Hasil optimasi ini diharapkan mendapatkan hasil yang optimal berupa *band* sesuai dengan ukuran target, tebal dan bersih. Pada penelitian menggunakan optimasi primer dengan konsentrasi 5µM dan 10µM dengan suhu *annealing* yang bervariasi yaitu 50°C, 52°C, 55°C, 59°C, dan 65°C. Pada Gambar 1 menunjukkan bahwa pada konsentrasi primer 10µM didapatkan *band* yang jelas dan tebal dibandingkan dengan konsentrasi primer 5µM. Padmalatha dan Prasad (2006) menyebutkan bahwa konsentrasi primer mempengaruhi proses amplifikasi pada pengujian PCR, dimana konsentrasi primer rendah dan tinggi dapat menyebabkan tidak terjadi amplifikasi dengan sempurna dan juga menyebabkan terbentuknya primer dimer. Primer dimer adalah suatu keadaan dimana *band* yang terbentuk pada saat proses amplifikasi DNA diikuti oleh band lain yang tidak spesifik.

Suhu *annealing* terbaik dalam penelitian ini adalah 55°C. Hasil elektroforesis DNA produk PCR menggunakan suhu *annealing* 55°C menghasilkan *band* paling tebal, lebih terang, jelas dan tunggal/ *single* dibandingkan dengan suhu *annealing* 50°C, 52°C, 59°C dan 65°C. Menurut Irmawati (2003) bahwa konsentrasi DNA total hasil ekstraksi tinggi dan dalam keadaan utuh sedangkan *band* yang terlihat menyebar (*bluur*) menunjukkan adanya ikatan antar molekul DNA yang terputus pada saat proses ekstraksi berlangsung sehingga genom terpotong menjadi bagian-bagian yang lebih kecil. Suhu *annealing* salah satu faktor penting dalam proses amplifikasi DNA. Pada saat suhu *annealing* terjadi proses penempelan primer pada DNA template. Primer dapat menempel pada DNA template apabila suhu yang digunakan merupakan suhu optimum. Setiap primer mempunyai suhu *annealing* berbeda dan ditentukan dari nilai *melting temperature* (Tm). Suhu *annealing* biasanya digunakan lebih rendah 5°C dari nilai Tm nya. Suhu *annealing* yang optimal dapat dijadikan sebagai dasar sensitifitas dan spesifiktas produk PCR. Primer dapat menempel dengan baik pada DNA template pada suhu *annealing* 55°C dan dianggap sebagai suhu optimum untuk primer ASF. Menurut Coyne et al., (1996) menyatakan bahwa pada suhu *annealing* yang optimum akan menghasilkan *band* yang spesifik (*single band*) dan tepat pada posisi target yang diinginkan.

Apabila suhu *annealing* yang diberikan lebih rendah, maka akan terjadi penempelan primer pada DNA template tidak spesifik sehingga terbentuk produk PCR yang non-spesifik atau munculnya banyak *band* (pada suhu *annealing* 50°C dan 52°C). Sebaliknya, apabila suhu *annealing* yang diberikan lebih tinggi, maka penempelan primer pada DNA template akan terlepas sehingga *band* yang muncul sangat tipis dan produk PCR tidak terbentuk atau tidak munculnya *band* (pada suhu *annealing* 59°C dan 65°C). Pertiwi et al., (2015) menyatakan bahwa suhu *annealing* yang terlalu tinggi akan menyebabkan primer tidak menempel dengan baik pada *template*, yang ditandai dengan *band* yang muncul semakin tipis sampai tidak muncul *band*. Rylich (1995) juga menyatakan bahwa suhu *annealing* yang rendah saat proses PCR menghasilkan ampikon nonspesifik (*non-target*) dan mengurangi efisiensi proses amplifikasi karena primer yang telah menempel (*annealing*) terlepas apabila suhu dinaikkan pada saat sintesis (*elongasi*) DNA.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Adapun simpulan yang dapat diambil pada penelitian ini adalah konsentrasi primer yang optimal pada DNA Virus ASF dengan metode pengujian PCR adalah 10 μ M. Suhu *annealing* terbaik dalam penelitian ini adalah 55°C menghasilkan *band* paling tebal, terang, jelas, tunggal/single dibandingkan suhu *annealing* 50°C, 52°C, 59°C, 65°C. Sehingga konsentrasi primer 10 μ M dan suhu *annealing* 55°C dapat direkomendasikan sebagai protokol dalam pengujian sampel DNA Virus ASF.

Saran

Adapun saran yang dapat diberikan pada penelitian ini adalah perlu dilakukan pengujian PCR untuk primer ASF untuk gen yang lain.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih yang sebesar besarnya peneliti sampaikan kepada LPPM UNUD yang telah memberikan hibah Pranata Laboratorium dari dana DIPA PNBP Universitas Udayana TA-2023, sesuai dengan Surat Perjanjian Penugasan Pelaksanaan Penelitian Nomor: B/1.298/UN14.4.A/PT.01.03/2023, tanggal 2 Mei 2023.

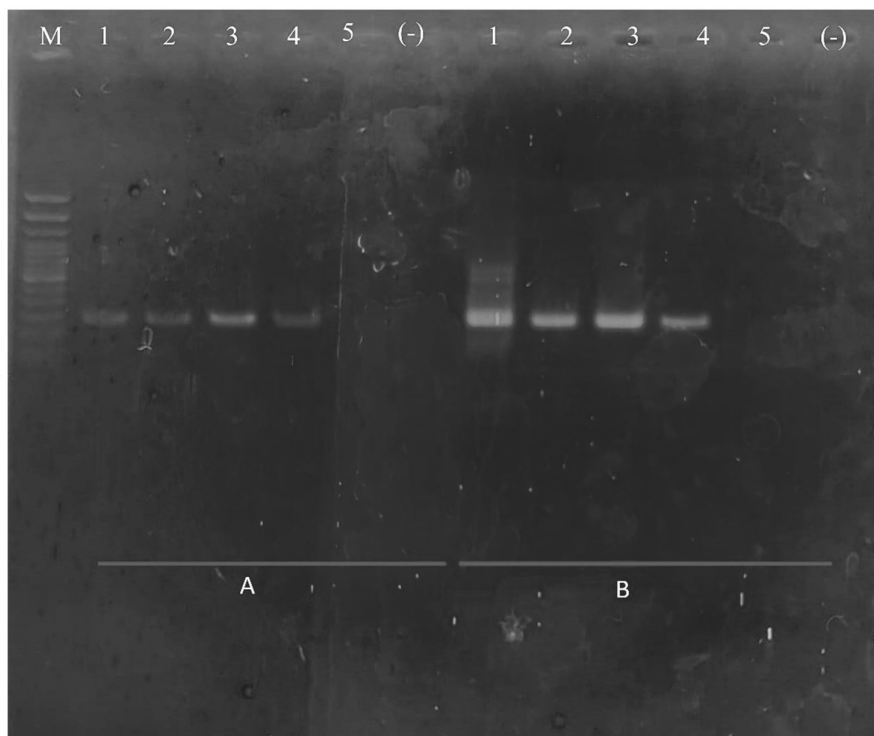
DAFTAR PUSTAKA

- Bram, R.A., George, J.E., Reichar, R.E., Tabaciinic, W.J. (2002). Threat of foreign arthropod-borne pathogens to livestock in the United States. *J Med Entomol* 39, 405-416.
- Coyne, V.E., James, S.J., Reid, Rybicki, E.P. (1996). *Molecular biology techniques manual*. South Africa: Univ. Cape Town.
- Dharmayanti, N.I., Sendow, I., Ratnawati, A., Settypalli, T.B.K, Saepullo M., Dundon W.G., Nuradji H., Naletoski I., Cattoli G., Lamien C.E. (2021). African swine fever in North Sumatra and West Java provinces in 2019 and 2020, Indonesia. *Transbound Emerg Dis* 68, 2890-2896.
- Gelfand, D.H., White, T.J. (1990). *Thermostable DNA polymerase for PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press Inc.
- Handoyono, D., Rudiretna, A. (2000). Prinsip umum dan pelaksanaan polymerase chain reaction (PCR). *Unitas*. 9(1):17-29.
- Irmawati. (2003). Perubahan keragaman genetik ikan kerapu tikus generasi pertama pada stok hatchery. Thesis. Bogor: IPB
- Mason-D'Croz, D., Bogard, J.R., Herrero, M., Robinson, S., Sulser, T.B, Wiebe, K., Willenbockel, D., Godfray, H.C.J. (2020). Modelling the global economic consequences of a major African swine fever outbreak in China. *Nat Food* 1, 221-228.
- OIE. 2022. African swine fever (OIE).
- Padmalatha, K., Prasad, M.N.V. (2006). Optimization of DNA isolation dan PCR protocol for RAPD analisis of selected medicinal and aromatic plant of conservation concern from Peninsular India. *African Journal of Biotechnology*. 5 (3): 230-234.
- Pertiwi, N.P.N., Mahardika, I.G.N.K., Watininiasih, N.L. (2015). Optimasi amplifikasi DNA menggunakan metode PCR (Polymerase chain reaction) pada ikan karang anggota famili pseudochromidae (DOTTYBACK) untuk identifikasi spesies secara molekular. *Jurnal Biologi*. 19(2): 1-5

Oura, C.A.L, Arias M. (2021). African swine fever (infection with African swine fever virus) in: OIE (Ed.) manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (2021). OIE, Geneva, 1-18.

Rylich, W. (1995). Selection of primers for polymerase chain reaction. Molecular Biotechnology, 3, 129-134.

Gambar



Gambar 1. Hasil Elektroforesis Sampel PCR DNA Virus ASF pada konsentrasi primer 5 μ M (A), 10 μ M (B) dan variasi suhu annealing 50°C (1), 52°C (2), 55°C (3), 59°C (4) dan 65°C (5), (-) (Kontrol Negatif), M (Marker)