

Stabilitas Gen *gag-ca* Virus Jembrana pada Vektor Plasmid Rekombinan pcDNA-ca dalam *Escherichia coli* DH5 α Setelah Penyimpanan Selama Delapan Tahun

Stability of *gag-ca* gene of Jembrana Virus in pcDNA-ca recombinant plasmid vector in *Escherichia coli* DH5 α which has been stored for eight years

Baso Yusuf¹, Adyatma M. Nur², Nur Fiska Yunitasari², Tri Ari Widiastuti², Endah Puspitasari²

¹Kagawa University, Japan

²Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
 Email: basoyusuf_frefor@yahoo.co.id

Abstract

The aim of this study was to determine the stability of *gag-ca* gene in a pcDNA-ca recombinant plasmid vector in *Escherichia coli* DH5 α which has been stored for eight years using Polymerase Chain Reaction method (PCR). *Gag-ca* gene which codes mayor protein has been characterized as immunodominan antigen, and it also has positive reaction to animal antibody which infected by Jembrana virus, so it usually used as vaccine resources and serologic detection for Jembrana disease. The research was done by analyzing *gag-ca* gene of Jembrana virus in pcDNA-ca recombinant plasmid in *Escherichia coli* DH5 α which has been stored for eight years. The pcDNA-ca recombinant plasmid was purified from cultured *Escherichia coli* DH5 α recombinant bacteria using "High Pure Plasmid Isolation Kit", then amplificated with "Pure Taq-Ready To Go PCR Kit" using specific primers. PCR products showed a positive result that pcDNA-ca recombinant plasmid contains *gag-ca* gene. PCR products identification using electrophoresis on agarose gel 1% showed that DNA stand apparently carried *gag-ca* gene at approximate amplicon 210 base pair (bp).

Key words: pcDNA-ca, *gag-ca* gene, *Escherichia coli* DH5 α , Polymerase Chain Reaction.

Abstrak

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui stabilitas gen *gag-ca* pada vektor plasmid rekombinan pcDNA-ca dalam *Escherichia coli* DH5 α yang telah tersimpan selama delapan tahun dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Gen *gag* sub unit *capsid* merupakan gen yang menyandi protein mayor dan antigen yang bersifat imunodominan serta bereaksi positif dengan antibodi hewan yang terinfeksi virus penyakit Jembrana sehingga sering digunakan sebagai sumber vaksin dan untuk deteksi serologik penyakit Jembrana. Penelitian ini dilakukan dengan menganalisis sisipan gen *gag-ca* virus Jembrana pada plasmid pcDNA-ca dalam *Escherichia coli* DH5 α yang telah dibuat dan disimpan dalam jangka waktu delapan tahun. Plasmid rekombinan pcDNA-ca tersebut dipurifikasi dari kultur bakteri rekombinan *Escherichia coli* DH5 α dengan menggunakan "High Pure Plasmid Isolation Kit", selanjutnya diamplifikasi dengan menggunakan *Pure Taq-Ready To Go PCR Kit* menggunakan primer spesifik. Hasil PCR membuktikan bahwa plasmid rekombinan pcDNA-ca masih membawa gen *gag-ca*. Identifikasi produk PCR menggunakan elektroforesis gel agarose 1% menunjukkan pita DNA yang membawa gen *gag-ca* dengan perkiraan amplikon 210 base pair (bp).

Kata kunci: pcDNA-ca, gen *gag-ca*, *Polymerase Chain Reaction*.

Pendahuluan

Kemajuan teknologi rekayasa gen selama beberapa dekade terakhir diharapkan mampu menyelesaikan berbagai permasalahan dalam teknologi DNA rekombinan. Banyak gen yang telah diisolasi, dikarakterisasi, dan ditempatkan ke dalam vektor yang disebut plasmid. Wiley *et al.*, (2008) mendefinisikan plasmid sebagai molekul DNA *double-stranded* berbentuk sirkuler atau linear yang dapat bereplikasi secara independen. Plasmid bioteknologi sering digunakan sebagai alat untuk memasukkan gen asing ke dalam sel bakteri untuk memproduksi protein rekombinan. Sistem ekspresi gen rekombinan menggunakan plasmid bakteri telah digunakan secara luas untuk memproduksi berbagai tipe protein seperti protein terapi dan vaksin DNA. Stabilitas plasmid merupakan hal yang esensial dalam pemeliharaan dan ekspresi dari gen rekombinan. Oleh karena itu, pengujian stabilitas plasmid dibutuhkan dalam proses produksi gen rekombinan (Lee, *et al.*, 2006).

Bakteri yang sering digunakan dalam teknologi produksi DNA rekombinan adalah *Escherichia coli* karena karakteristiknya sudah banyak diketahui. Kusumawati (2003) melakukan pembuatan konstruksi plasmid rekombinan menggunakan gen *gag-ca* yang mengkode protein *ca* (*capsid*) yang ditransformasikan ke dalam bakteri *Escherichia coli* DH5 α . Produksi plasmid dalam *E. coli* dipengaruhi oleh beberapa parameter seperti strain bakteri, sekuens plasmid, dan kondisi bioproses (media, *bioreactor operation*). Strain *E. coli* seperti DH5 α , DH1 atau C600 lebih cenderung digunakan untuk memproduksi DNA plasmid dalam jumlah yang banyak. Tipe dari plasmid yang diproduksi juga penting; struktur dari tempat replikasi dapat

mempengaruhi jumlah kopian plasmid yang diperoleh di dalam sel. *Bioprocess design* memperlihatkan adanya korelasi antara *high plasmid titres* dengan *low growth rate*. Dispekulasikan bahwa dengan tingkat pertumbuhan yang rendah, bakteri memiliki waktu yang cukup agar plasmid melakukan replikasi sebelum terjadi pembelahan sel (Wegrzyn and Wegrzyn, 2002; Chen, *et al.*, 1997).

Penelitian tentang gen struktural dari virus penyakit Jembrana seperti gen *gag* subunit *capsid* (*gag-ca*) yang berfungsi menyandi protein kapsid sering dilakukan untuk dijadikan sebagai target sumber vaksin DNA. Protein kapsid yang disintesis merupakan protein mayor dan antigen yang bersifat imunodominan (Barboni *et al.*, 2001; Kertayadnya *et al.*, 1993). Protein kapsid bereaksi positif dengan antibodi dari hewan yang terinfeksi virus Jembrana dan sering digunakan untuk deteksi serologik pada sapi Bali yang terinfeksi virus Jembrana (Zheng *et al.*, 2001; Burkala *et al.*, 1999, 1998; Hartaningsih *et al.*, 1994). Analisis struktur protein berdasarkan perbedaan berat molekul terhadap virus penyakit Jembrana dengan SDS-PAGE menunjukkan bahwa virus Jembrana disusun oleh beberapa protein mayor dengan perkiraan berat molekul 45 kDa, 42 kDa, 33 kDa, 26 kDa dan 16 kDa yang terdeteksi secara konsisten (Wilcox *et al.*, 1993; Wilcox *et al.*, 1995).

Dua hal penting yang perlu diperhatikan dalam produksi plasmid adalah jumlah molekul kopian plasmid dan stabilitas plasmid di dalam sel. Beberapa plasmid biasanya keluar dari sel pada saat direkultur. Bakteri yang kehilangan plasmid cenderung mengalami perkembangan yang lebih baik disebabkan oleh adanya *growth rate*, *viability* dan *final cell density* yang lebih tinggi. Kehilangan DNA plasmid dari sel kemungkinan disebabkan oleh fakta

yang menyatakan bahwa plasmid bereplikasi secara otonom dan tidak tergantung pada DNA bakteri serta mudah mengalami multimerasi. Faktor ini yang mengakibatkan perbedaan kandungan plasmid dari sel yang telah direkultur (O'Mahony *et al.*, 2007; Ow, *et al.*, 2006; Summers, D.K., 1991).

Stabilitas genetik dari plasmid rekombinan dapat dievaluasi secara kualitatif dan kuantitatif. Secara kualitatif, dapat diukur dengan melihat struktur gen sisipan dalam plasmid rekombinan tetap stabil. Analisis kualitatif secara mudah untuk dilakukan karena plasmid bakteri dapat langsung diperbanyak di dalam sel bakteri. Secara kuantitatif, dinilai dengan mengukur jumlah molekul kopian plasmid rekombinan di dalam sel bakteri (Lee, *et al.*, 2006). Pengujian *plasmid copy number* (PCN) merupakan metode yang secara umum digunakan untuk menganalisis stabilitas genetik secara kuantitatif. Secara tradisional, PCN ditentukan dengan mengukur *band density* yang diproduksi dengan metode *DNA hybridization*. Metode tersebut memiliki beberapa kelemahan seperti masalah keamanan dalam penggunaan *radioactive probe*, memerlukan waktu dan tenaga yang banyak. Penggunaan *radioactive probe* dalam hibridisasi juga dapat menyebabkan penghitungan yang kurang akurat akibat *life span* yang pendek. Oleh karena itu, dibutuhkan metode yang mampu menghitung jumlah kopian plasmid secara akurat (Pushnova, *et al.*, 2000).

Teknologi *real-time quantitative PCR* (QPCR) telah dikembangkan untuk melacak dan menghitung secara akurat dan cepat dari berbagai target sekuens. Teknologi ini lebih mudah untuk diaplikasikan serta lebih cepat, lebih murah dan lebih aman dibandingkan dengan *DNA hybridization* (Klein, 2002). Penelitian ini bertujuan menguji stabilitas gen

gag-ca virus Jembrana pada vektor plasmid rekombinan pcDNA-ca yang telah tersimpan dalam waktu delapan tahun dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan *forward primer* dengan sekuen : 5'AGATTGGATATTCAGCTCATAGAATC3' dan *reverse primer* dengan sekuen : 3'CCTTGTGCTACCTCTAACG5' yang akan mengamplifikasi sekitar 210 base pair (bp). Penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi mengenai stabilitas gen *gag-ca* virus Jembrana pada vektor plasmid pcDNA-ca yang telah tersimpan selama delapan tahun agar dapat dijadikan sebagai landasan masa waktu penyimpanan gen virus Jembrana agar gen tersebut masih mampu digunakan kembali untuk keperluan yang lain.

Materi dan Metode

Dalam penelitian ini digunakan bakteri *Escherichia coli* DH5a yang mengandung plasmid rekombinan yang membawa gen *gag-ca* yang telah dikerjakan oleh Kusumawati dan disimpan di Laboratorium Bioteknologi Pascasarjana UGM selama delapan tahun. Penelitian sebelumnya dilakukan oleh Kusumawati *et al.*, (2003) dengan pembuatan konstruksi plasmid rekombinan menggunakan gen *gag-ca* yang mengkode protein *ca* (capsid) yang ditransformasikan ke dalam bakteri *Escherichia coli* DH5a. Bakteri berisi plasmid rekombinan yang membawa gen *gag-ca* tersebut kemudian dikriopreservasi menggunakan krioprotektan gliserol. Bahan lain yaitu *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche) untuk isolasi plasmid DNA, *Pure Taq-Ready To Go PCR Kit* (Hoffman) untuk PCR gen *gag-ca*, *Etidium Bromida*, *buffer Tris-Borat-EDTA* dan agarose 1 % (Sigma) untuk

elektroforesis DNA, serta *Marker DNA Smart Leader*.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian antara lain: sentrifuge, mikropipet (Eppendorf), vortex, tabung mikrosentrifus 1,5 ml (Eppendorf), tabung PCR, 0,2 ml (Eppendorf), mesin siklus termal (Hoffman LaRoche Corporation), tabung Erlenmeyer dan *incubator shaker* (Kotterman) untuk kultivasi bakteri, seperangkat alat elektroforesis, UV transluminator, kaca UV, dan kamera digital.

Bakteri *E. coli* DH5 α hasil transformasi plasmid pcDNA-ca yang dikriopreservasi pada suhu -70°C menggunakan krioprotektan gliserol diambil kemudian *dithawing* pada suhu 37°C selama 30 detik. *E. coli* DH5 α tersebut kemudian direkultur pada 5 ml Luria Bertani cair baru yang mengandung antibiotik ampisilin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Kultur diinkubasi selama 12 sampai 16 jam pada suhu 37°C menggunakan *incubator shaker* 100 rpm sampai 200 rpm. Isolasi plasmid dilakukan sesuai dengan petunjuk pemakaian yang direkomendasikan oleh Roche Applied Science. Suspensi diambil setelah diinkubasi semalam, kemudian diisolasi plasmid DNA dengan menggunakan *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche). Kultur bakteri *E. coli* DH5 α yang mengandung pcDNA-ca diambil sebanyak 4 ml kemudian disentrifuge dengan kecepatan 6.000 rpm selama 30 detik. Pelet yang diperoleh diresuspensi dengan 250 μl Vial 1 (*Suspension Buffer*: 0,1M RNase, 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 8,0), kemudian ditambahkan 250 μl Vial 2 (*Lysis Buffer*: 0,2M NaOH, 1% SDS), dicampur dengan baik dan diinkubasi pada suhu ruangan selama 5 menit. Suspensi ditambah 350 μl Vial 3 (*Binding Buffer*: 4M guanidine hydrochloride, 0,5M potassium acetate, pH 4,2), kemudian dicampur dan

diinkubasi pada es selama 5 menit, dilanjutkan disentrifuge dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dimasukkan ke dalam kolom *High Pure Filter Tube*, dan disentrifuge dengan kecepatan 13.000 rpm selama 60 detik. Kolom ditambahkan 700 μl Vial 5 (*Wash Buffer I* dan *Wash Buffer II*: 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5) kemudian disentrifuge dengan kecepatan 13.000 rpm selama selama 30 sampai 60 detik, diulangi dua kali. Kolom dimasukkan ke tabung mikrosentrifus 1,5 ml baru dan steril. Sebanyak 100 μl Vial 6 (*Elution Buffer*: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5) dimasukkan ke dalam kolom kemudian disentrifuge dengan kecepatan 13.000 rpm selama 60 detik. Hasil elusi pada tabung mikrosentrifus yang diperoleh merupakan plasmid rekombinan pcDNA-ca yang akan dianalisis ada atau tidaknya sisipan gen *gag-ca*.

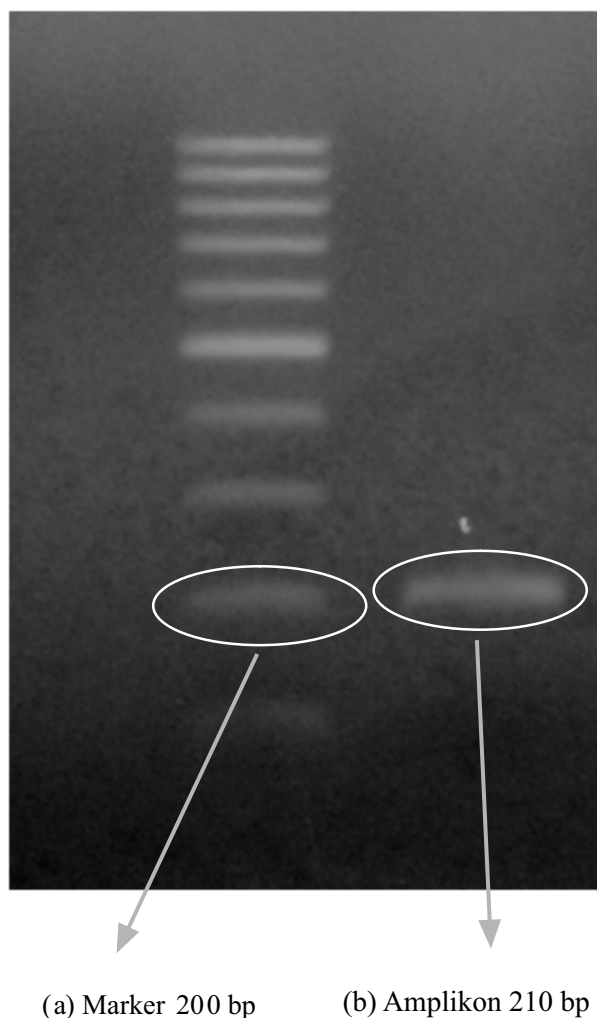
Isolasi dan amplifikasi gen *gag-ca* dilakukan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer spesifik. Primer yang digunakan terdiri dari *forward primer* dengan sekuen: 5'AGATTGGATATTCAGCTCATAGAATC3' dan *reverse primer* dengan sekuen: 3'CCTTGTGCTACCTCTAACG5'. PCR dilakukan sesuai petunjuk perusahaan Hoffman LaRoche Corporation dengan menggunakan *Pure Taq-Ready to Go PCR Kit* dengan volume 25 μl , yang terdiri dari : 2 μl cetakan DNA (konsentrasi 10-20 ng/ μl), masing- masing 1 μl *forward primer* dan *reverse primer* (konsentrasi 20 pmol/ μl) dan 21 μl akuades steril. Reaksi PCR dalam mesin siklus termal dilakukan dengan keadaan: 95°C selama 7 menit, 25 siklus 94°C selama 30 detik, 47°C selama 30 detik, 68°C selama 30 detik, 68°C selama 10 menit. Satu molekul DNA untai ganda dilipatgandakan jumlahnya menjadi dua molekul DNA untai ganda pada akhir siklus pertama. Dua

molekul DNA untai ganda hasil amplifikasi pada siklus pertama menjadi DNA target dan dilipatgandakan menjadi empat molekul DNA, dan seterusnya hingga siklus terakhir akan didapatkan jutaan kopi molekul DNA. DNA hasil PCR dapat dilihat melalui elektroforesis untuk mengetahui ada atau tidaknya sisipan gen *gag-ca* di dalam plasmid rekombinan pcDNA-ca. Elektroforesis digunakan untuk memisahkan molekul-molekul protein atau DNA diatas medan listrik. Elektroforesis menggunakan agarose 1% dan *Ethidium Bromida* sebagai pewarna. DNA hasil PCR dielektroforesis untuk menganalisa ada atau tidaknya sisipan gen *gag-ca* di dalam plasmid pcDNA-ca. Larutan DNA yang bermuatan negatif dimasukkan ke dalam sumur-sumur yang terdapat pada gel agarosa dan diletakkan di kutub negatif, apabila dialiri arus listrik dengan menggunakan larutan buffer yang sesuai maka DNA akan bergerak ke kutub positif. Laju migrasi DNA dalam medan listrik berbanding terbalik dengan massa DNA (Gaffar, 2007). Sebanyak 6µl DNA hasil PCR ditambah 2 µl *buffer loading* kemudian dielektroforesis pada gel agarose 1% dengan arus listrik 90 volt/cm panjang gel selama 60 sampai 90 menit.

Hasil dan Pembahasan

Stabilitas sisipan gen *gag-ca* pada plasmid rekombinan pcDNA-ca diketahui dengan analisis PCR menggunakan primer spesifik dengan *forward primer* AGATTGGATATTCAGCTCATAGAATC dan *reverse primer* CCTTGTGCTACCTCTAACG. Hasil PCR berupa jutaan kopi molekul DNA yang diidentifikasi menggunakan elektroforesis dengan

visualisasi pada Gambar 1 menunjukkan adanya pita-pita (*band*) pada lajur-lajur (*lane*) yang berbeda pada gel yang tampak setelah proses pewarnaan, lajur kiri merupakan arah pergerakan *marker* dan lajur kanan merupakan arah pergerakan amplikon dari sumur gel yang menunjukkan angka sekitar 210 bp. Penanda (*marker*) yang merupakan campuran molekul dengan ukuran berbeda-beda yang dapat menentukan ukuran molekul dalam pita amplikon dengan elektroforesis *marker* tersebut pada lajur di gel yang paralel dengan amplikon (Gaffar, 2007).



Gambar 1. DNA hasil *Polymerase Chain Reaction*; (a) *Marker* DNA, (b) Amplikon.

Gen *gag-ca* pada plasmid rekombinan pcDNA-ca telah disekuen dan terdiri dari 684 nukleotida termasuk tambahan kodon inisiasi (ATG) dan kodon terminasi (TAG) yang ikut disisipkan dalam konstruksi plasmid pcDNA (Kusumawati *et al.*, 2003). Plasmid rekombinan tersebut dapat bereplikasi dengan baik pada bakteri *E. coli* DH5 α , kemudian mampu diisolasi menggunakan *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche) dan dapat diamplifikasi dengan menggunakan *Pure Taq-Ready to Go PCR Kit* menggunakan primer spesifik. Hasil analisis sisipan gen *gag-ca* pada plasmid rekombinan pcDNA yang dilihat melalui elektroforesis pada gel agarose 1% menunjukkan adanya ampikon 210 bp. Primer spesifik yang digunakan memiliki amplifikasi sekitar 210 bp dan hanya akan mendeteksi dan mengamplifikasi sebagian dari gen *gag-ca* yang spesifik. Gen yang berada dalam plasmid rekombinan apabila bukan gen *gag-ca* maka tidak akan terjadi reaksi PCR sehingga dapat dipastikan bahwa gen yang terbawa dalam plasmid rekombinan adalah gen *gag-ca* dan masih stabil setelah penyimpanan selama delapan tahun.

Bakteri *E. coli* DH5 α yang mengandung plasmid yang membawa gen *gag-ca* masih stabil dan memiliki tingkat viabilitas yang tinggi karena bakteri tersebut dikriopreservasi pada suhu -70°C yang memungkinkan seluruh proses biologis bakteri pada kondisi *stand still* atau berlangsung sangat lambat. Koleksi materi kriopreservasi dapat bertahan hingga waktu yang tidak terbatas dan diasumsikan dapat menjaga konsistensi genetik ketika dipanaskan kembali. Krioprotektan digunakan untuk mengurangi pengaruh mematikan selama proses kriopreservasi baik berupa pengaruh larutan maupun adanya pembentukan kristal es

sehingga stabilitas dan viabilitas sel dapat dipertahankan. Krioprotektan yang digunakan oleh Kusumawati adalah gliserol karena mampu mengikat air yang cukup kuat karena adanya tiga gugus hidroksil yang dimilikinya sehingga mampu mencegah pembentukan kristal es yang akan merusak membran sel pada proses kriopreservasi (Park and Graham, 1992).

Dispekulasikan bahwa dengan tingkat pertumbuhan yang rendah, bakteri memiliki waktu yang cukup agar plasmid melakukan replikasi sebelum terjadi pembelahan sel. Meskipun, peningkatan titer terkadang tidak terlihat pada pertumbuhan yang lambat, hal ini sangat tergantung pada metode yang digunakan untuk menurunkan tingkat pertumbuhan, seperti pembatasan nutrisi atau pengaturan pada pH dan/atau temperatur. Beberapa penelitian menunjukkan adanya kemungkinan beberapa komponen media meningkatkan *metabolic pathways* untuk proses replikasi plasmid (Wegrezyn and Wegrezyn, 2002; Chen, *et al.*, 1997; Kim and Shuler, 1990). Replikasi plasmid sangat dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi sebagai persiapan adaptasi bakteri untuk kondisi *starvation*. Penelitian telah dilakukan untuk melihat bagaimana efek terhadap replikasi plasmid apabila terjadi kekurangan asam amino, dan hasilnya terjadi peningkatan amplifikasi plasmid. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan kekurangan asam amino tertentu mampu memberikan perbedaan level dari replikasi plasmid (Wegrzyn, 1999)

Klon *E. coli* yang mengandung plasmid berisi sisipan gen *gag-ca* dapat direkultur pada media Luria Bertani (LB) cair untuk mendapatkan klon *E. coli* yang banyak namun perlu memperhatikan proses *thawing* sebelum melakukan rekultur. *Freeze thawing* harus dihindari supaya bakteri tidak pecah

dan plasmid keluar. *Thawing* pada penelitian kami dilakukan pada suhu 37°C sehingga bakteri tidak lisis dan masih dapat ditumbuhkan kembali pada LB cair. Rekultur dilakukan setiap dua bulan untuk memperbanyak jumlah bakteri yang hidup sehingga *stock* bakteri yang mengandung plasmid yang membawa gen *gag-ca* masih terjaga dan dapat digunakan untuk keperluan yang berbeda.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa stabilitas gen *gag-ca* virus Jembrana pada vektor plasmid rekombinan pcDNA-ca yang telah tersimpan dalam waktu delapan tahun masih stabil dan dapat dideteksi dengan metode *Polymerase Chain Reaction*. Hal ini ditunjukkan dengan adanya ampikon 210 *base pair* (bp) melalui elektroforesis. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mengetahui apakah gen *gag-ca* pada vektor plasmid rekombinan pcDNA-ca yang telah tersimpan selama delapan tahun ini masih dapat dimanfaatkan sebagai vaksin protein rekombinan virus Jembrana.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kami ucapkan kepada Dr. drh. Asmarani Kusumati, M.P. yang telah membantu penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Barboni, P., Thompson, I., Brownlie, J., Hartaningsih, N. and Collins, M.E. (2001) Evidence for the presence of two bovine lentiviruses in the cattle population of Bali. *J. Vet. Microbiol.* 80: 313-327.
- Burkala, E.J., Narayani, I., Hartaningsih, N., Kertayadnya, G., Berryman, D.I. and Wilcox, G.E. (1998) Recombinant Jembrana disease virus proteins as antigens for detection of antibody to bovine lentivirus. *J. Vir. Methods*, 74: 39-46.
- Burkala, E.J., Ellis, T.M., Voight, V. and Wilcox, G.E. (1999) Serological evidence of an Australian bovine lentivirus. *J. Vet. Microbiol.*, 68: 171-177.
- Chen, W., Graham, C. and Ciccarelli, R.B. (1997) Automated fed-batch fermentation with feedback controls based on dissolved oxygen (DO) and pH for production of DNA vaccines. *J. Ind. Microbiol.* 18: 43-49.
- Gaffar, S. (2007) Buku Ajar Bioteknologi Molekuler. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Padjajaran.
- Hartaningsih, N., Wilcox, G.E., Kertayadnya, G. and Astawa, M. (1994) Antibody response to Jembrana disease virus in Bali cattle. *J. Vet. Microbiol.*, 39: 15-23.
- Kertayadnya, G., G.E. Wilcox., S. Soeharsono, N. Hartaningsih, Coelen, R.D., Collins, M.E and J. Brownlie. (1993) Characteristic of a retrovirus associated with Jembrana disease in Bali cattle. *J. Gen. Virol.* 74: 1756-1773.
- Kim, B.G. and Shuler, M.L. (1990) Analysis of pBR 322 replication kinetics and its dependency on growth rate. *Biotechnol. Bioeng.* 36: 233-242.
- Klein, D. (2002) Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol. Med.* 8: 257-260.
- Kusumawati, A., Widada, J.S., Sardjono, B., Mangkoewidjojo, S. (2003) Pembuatan vaksin protein rekombinan dan vaksin DNA penyakit Jembrana. Laporan Penelitian Hibah Bersaing X/2 Perguruan Tinggi. Laporan Penelitian Universitas Gadjah Mada.
- Lee, C., Kim, J., Shin, S.G., Hwang, S. (2006) Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J. Biotech.* 123: 273-280.
- O'Mahony, K., Freitag, R., Hilbrigh, F., Muller, P., Schumacher, I. (2007) Strategies for high titre plasmid DNA production in *Eschrechia coli* DH5a. *Process Biochem.* 42: 1039-1049.
- Ow, D.S.W., Nissom, P.M., Philp, R., Oh, S.K.W. and Yap, M.G.S. (2006) Global transcriptional analysis of metabolic burden due to plasmid

- maintenance in *Escherichia coli* DH5a during batch fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 391-8.
- Parks, J.E. and Graham, J.K. (1992) Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38: 209-222.
- Pushnova, E.A., Geier, M. and Zhu, Y.S. (2000) An easy and accurate agarose gel assay for quantitation of bacterial plasmid copy numbers. *Anal. Biochem.* 284: 70-76.
- Summers, D.K. (1991) The kinetics of plasmid loss. *Trends Biotechnol.* 9: 273-278.
- Wegrzyn, G. (1999) Replication of plasmids during bacterial response to amino acid starvation. *Plasmid* 41: 1-16.
- Wegrzyn, G. and Wegrzyn, A. (2002) Stress responses and replication of plasmids in bacterial cells. *Microb Cell Fact.* 1: 2.
- Wilcox, G.E., Kertayadnya, G., Hartaningsih, N., Dharma, D.M.N., Seharsono, S., Robetson, T. (1993) Evidence for Viral Etiology of Jembrana Disease in Bali Cattle. *J. Vet. Microbiol.*, 33: 367-374.
- Wilcox, G.E., Chadwick, B.J. and Kertayadnya, G. (1995) Jembrana disease virus: a new bovine lentivirus producing an acute severe clinical disease in *Bos javanicus* cattle. Abstract in third International Congress on Veterinary Virology, Interleken, Switzerland 4-7 September 1994.
- Willey, J.M., Sherwood, L.M. and Woolverton, C.J. (2008) Preeceott, Harley, and Klein's Microbiology 7th ed. The McGraw-Hill Companies, Inc. New York. USA: 53.
- Zheng, L., Zhang, S., Wood, C., Kapril, S., Wilcox, G.E., Loughin, T.A. and Minocia, H.C. (2001) Differentiation of two bovine lentivirus by a monoclonal antibody on the basis of epitope specificity. *Clin. and Diag. Lab. Immun.*, 2: 283-287.