

## Konstruksi Plasmid pET-15b dengan Gen tat Virus Penyakit Jembrana

### *Plasmid construction pET-15b with the Jembrana Disease Virus tat gene*

Asmarani Kusumawati<sup>1,2\*</sup>, Lalu Unsunnidhal<sup>1,3</sup>, Agung Budiyanto<sup>1</sup>,  
Erif Maha Nugraha Setyawan<sup>1</sup>, Sri Gustari<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Reproduksi & Obstetrik, Fakultas Kedokteran Hewan, Jl. Fauna No. 2 Karangmalang,  
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281 Indonesia

<sup>2</sup>Pusat Studi Bioteknologi, Jl. Teknik Utara, Kocoran, Caturtunggal, Kec. Depok, Kabupaten Sleman,  
Universitas Gadjah Mada, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281

<sup>3</sup>Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pangan dan Agroindustri,  
Jl. Majapahit No 62, Universitas Mataram, Kota Mataram, Nusa Tenggara Barat, 83361

\*Email : [uma\\_vet@ugm.ac.id](mailto:uma_vet@ugm.ac.id)

Diterima : 17 November 2022, direvisi : 6 Maret 2023, disetujui : 7 Maret 2023

#### Abstract

Jembrana disease virus is the virus that causes Jembrana in Bali cattle. Recombinant protein vaccines are made by inserting DNA or genes encoding immunogenic proteins into prokaryotic expression vectors so that they can express the recombinant proteins that will be used as vaccines. One of the structural genes of the Jembrana disease virus is the tat gene which expresses the tat protein which is used as a recombinant protein vaccine. The aim of this study was to clone pET15b with the tat gene. Confirmation of the pET-15b gene in transformant bacteria was carried out by PCR colonies, then plasmid isolation was performed and confirmation was carried out using the PCR method with primers for the detection of the tat gene and sequencing primers for the pET15b vector. The results showed that the transformant bacteria already contained pET15b-tat recombinant DNA which was confirmed through PCR colonies with a band of 179 bp, then further confirmed by PCR on the results of plasmid isolation from transformant bacteria which obtained a band of 179 bp for primers for tat gene detection and 514 bp for sequencing primers on pET15b, 179 bp and 514 bp vectors matched the amplification targets for detection primers and sequencing primers used.

**Keywords** : Jembrana Disease Virus; pET15b; PCR; Recombinant Protein Vaccine; tat protein;

#### Abstrak

Virus Penyakit Jembrana adalah virus yang menyebabkan jembrana pada sapi bali. Vaksin protein rekombinan dibuat dengan memasukkan DNA atau gen yang mengkode protein imunogenik ke dalam vektor ekspresi prokariotik sehingga dapat mengekspresikan protein rekombinan yang akan dijadikan vaksin. Salah satu gen struktural virus penyakit jembrana adalah gen tat yang mengekspresikan protein tat yang digunakan sebagai vaksin protein rekombinan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkloning pET15b dengan gen tat. Konfirmasi gen pET-15b pada bakteri transforman dilakukan dengan koloni PCR, kemudian dilakukan isolasi plasmid dan dilaksanakan konfirmasi menggunakan metode PCR dengan primer untuk deteksi gen tat dan primer sekuensing untuk vektor pET15b. Hasilnya menunjukkan bahwa bakteri transforman sudah berisikan DNA rekombinan pET15b-tat yang terkonfirmasi melalui koloni PCR dengan band sebesar 179 bp, kemudian dikonfirmasi lanjut melalui PCR pada hasil isolasi plasmid dari bakteri transforman yang didapatkan band sebesar 179

bp untuk primer deteksi gen tat dan 514 bp untuk primer sekuensing pada vektor pET15b, 179 bp dan 514 bp sesuai dengan target amplikasi untuk primer deteksi dan primer sekuensing yang digunakan.

**Kata kunci :** Virus Penyakit Jembrana; Vaksin Protein Rekombinan; Protein tat; pET15b; PCR

## Pendahuluan

Penurunan produksi ternak sapi Bali (*Bos javanicus*) dapat disebabkan oleh serangan Virus Penyakit Jembrana (VPJ). Penyakit akibat virus ini ditemukan pertama kali di Jembrana, Bali, Indonesia pada 1964 sehingga disebut dengan nama penyakit Jembrana. Penyakit tersebut telah menyebar di Bali dan membunuh 60.000 ekor sapi Bali dalam waktu 9 bulan. Penyebarannya tidak hanya menyebar di daerah Bali tetapi sekarang telah diketahui menyebar pada beberapa daerah di Indonesia dan di luar negeri, di antaranya Jawa Timur, Lampung, Kalimantan dan Sumatera Barat (Chadwick *et al.*, 1995; Hartaningsih *et al.*, 2001; Tenaya, 2016). Tidak hanya itu, penyakit Jembrana sekarang telah dilaporkan tidak hanya mampu menyerang sapi Bali, tetapi juga mampu menyerang sapi lainnya, seperti sapi Friesian (*Bos taurus*) dan crossbred Bali (*Bos javanicus* x *Bos indicus*), walaupun dengan gejala yang lebih ringan (Kusumawati *et al.*, 2014; Soeharsono *et al.*, 1995; Tenaya, 2016). Kerugian ekonomi akibat penyakit ini pada outbreak pertama di Indonesia membuat penyakit Jembrana menjadi salah satu perhatian utama dalam industri ternak sapi Bali.

Virus Penyakit Jembrana (VPJ) yang menyebabkan penyakit viral akut ini memiliki masa inkubasi yang pendek, yakni 5-12 hari (Kusumawati *et al.*, 2015). Penyakit ini dapat menyerang sapi Bali baik jantan maupun betina pada semua umur. Hewan bunting memiliki tingkat kepekaan lebih tinggi terhadap serangan penyakit Jembrana sehingga menyebabkan tingkat abortus mencapai 49% (Kusumawati *et al.*, 2014; Tenaya, 2016), tingkat morbiditas dapat mencapai 65%, mortalitas 15% dan tingkat kematian penderita (case fatality rate) dapat mencapai 30% (Agustini *et al.*, 2016; Kusumawati *et al.*, 2014). Lebih dari 90% kematian ternak sapi terjadi pada minggu pertama sejak munculnya gejala klinis (Agustini *et al.*, 2016). Protein imunogenik virus Jembrana masih dapat ditemukan meskipun sapi sudah dinyatakan

sembuh. Sapi dapat dinyatakan bebas dari virus setelah 2 tahun pascainfeksi (Agustini *et al.*, 2016; Kusumawati *et al.*, 2014) sehingga hewan yang telah sembuh dapat menjadi karier dan sumber penyebaran penyakit. Ancaman dari penyakit ini berpotensi menurunkan produksi ternak sapi Bali yang berdampak pula dalam memperlambat tercapainya swasembada sapi di Indonesia.

Bioteknologi mampu membantu mengatasi masalah penyakit Jembrana dengan berkontribusi dalam pengembangan vaksin untuk mempersiapkan sistem imunitas sapi sebelum melawan virus ketika terjadi infeksi. Bioteknologi mampu menyediakan berbagai macam jenis vaksin bergantung pada molekul yang diinjeksikan, tetapi tipe vaksin protein rekombinanlah yang dinilai sangat berpotensi untuk diaplikasi dalam kasus penyakit akibat virus. Penggunaan vaksin protein rekombinan ini mampu menghindari kemungkinan adanya reversal patogen teratenuasi menjadi virulen kembali atau menghindari penggunaan patogen terinaktivasi yang berisiko pada kegagalan proses inaktivasinya (Williams, 2013). Tidak hanya itu, jika dibandingkan dengan jenis vaksin lainnya, vaksin protein rekombinan sangat efektif tanpa menimbulkan risiko fenomena *Antibody Dependent Enhancement* (ADE) yang mungkin disebabkan reaksi antibodi non netralisir terhadap protein struktural virus, selain itu, vaksin protein rekombinan juga dapat menginduksi kekebalan seluler dan humoral jangka panjang (Chaturvedi *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2003). Vaksin protein rekombinan tersebut membutuhkan DNA yang mengkode protein spesifik (antigen) dari pathogen.

Protein Tat adalah salah satu protein aksesoris yang mengaktifkan *long terminal repeat* (LTR) dari VPJ dan menginduksi transkripsi dari gen virus untuk replikasi (Cheng-Mayer *et al.*, 1991). Protein ini dapat berinteraksi dengan elemen dari transactivation response (TAR) dan mengaktifkan positive transcription elongation

factor b (P-TEFb) yang akan menghilangkan blok dari proses transkripsi (Mancebo *et al.*, 1997; Marshall *et al.*, 1996; Unsunidhal *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 1997). VPJ mengkodekan protein Tat yang memiliki keterkaitan erat dengan Bovine Immunodeficiency Virus (BIV) Tat, yang dapat dengan kuat mengaktifkan tidak hanya LTR VPJ tetapi juga LTR virus lentivirus lainnya, termasuk *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) dan *Bovine Immunodeficiency Virus* (BIV) (Chen *et al.*, 2000; Cheng-Mayer *et al.*, 1991). Tat dapat secara khusus mengenali TAR RNA heterolog menggunakan mekanisme yang sangat berbeda (Smith *et al.*, 2000). Selain itu, VPJ Tat secara fungsional dapat digantikan dengan Tat HIV ketika gen tat VPJ dimasukkan ke dalam genom HIV (Chen *et al.*, 2000) sehingga terdapat struktur protein yang sama antara protein VPJ Tat dan HIV Tat (HTat).

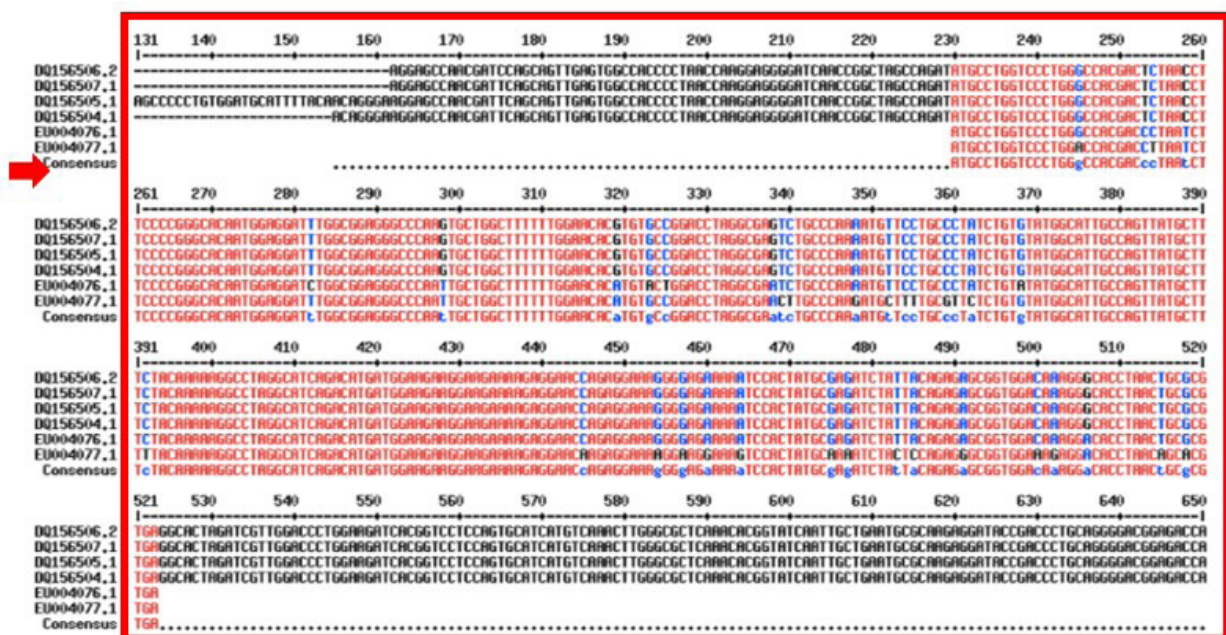
Dalam mewujudkan vaksin protein rekombinan untuk penyakit jembrana maka dibutuhkan suatu konstruksi gen tat yang mengkode asam amino penyusun protein Tat yang disisipkan pada plasmid DNA rekombinan yang terekspresi di prokariot (pET-15b). Berdasarkan uraian latar belakang di atas, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dapatkah gen tat VPJ terisisipkan di pET-15b untuk membentuk DNA rekombinan untuk ekspresi protein Tat sebagai kandidat vaksin protein rekombinan bagi penyakit jembrana.

### Materi dan Metode

Penelitian ini tergolong ke dalam kelompok penelitian eksperimental laboratorik. Secara garis besar, pelaksanaan penelitian ini terbagi menjadi lima tahapan penelitian: 1. Tahap pertama adalah penyusunan konsensus asam amino dari beberapa protein Tat dari berbagai strain Virus Penyakit Jembrana; 2. Tahap kedua adalah mendesain dan mengoptimasi kodon gen *tat* dengan target ekspresi *e.coli*; 3. Tahap ketiga adalah pembuatan gen *tat* sintetik dan penyisipan gen *tat* pada vektor pET15b dengan menggunakan *Multiple Cloning Site* (MCS) pada sisi restriksi *NdeI* dan *XhoI* oleh jasa *Gene Universal*; 3. Tahap Ketiga adalah Transformasi; 4. Tahap Keempat adalah koloni PCR dengan menggunakan primer deteksi (F: 5'GTCCGAATTGTTGGCTGTTT3' dan R: 5'ATGAATTTTGCACCTTTGTC3'); dan 5. Tahap kelima adalah isolasi plasmid dari bakteri transforman positif kemudian dilaksanakan PCR dengan template hasil isolasi DNA dengan primer deteksi dan primer sekuensing pada vektor pET15b (F:5'GCTAGTTATTGCTCAGCGG3' dan R: 5'TAATACGACTCACTATAGGG3').

### Hasil dan Pembahasan

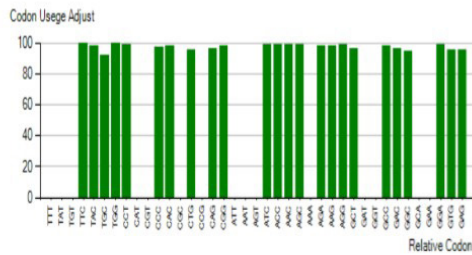
Hasil konstruksi dan kloning gen *tat* pada plasmid pET15b dapat dilihat pada data berikut ini:



Gambar 1. Hasil MultAlin, menunjukkan urutan nukleotida yang digunakan (kotak merah) dibandingkan dengan dan hasil consensus sequence (panah merah), berupa kesamaan nukleotida yang dimiliki. Warna merah menunjukkan urutan yang memiliki kesamaan (*conserved*).

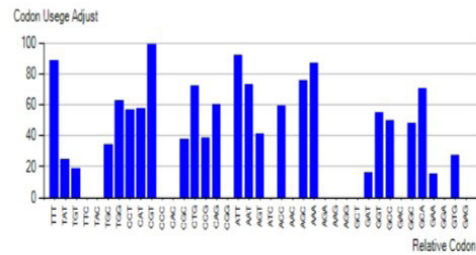


Before Codon Adjustment



CAI: 0.70

After Codon Adjustment



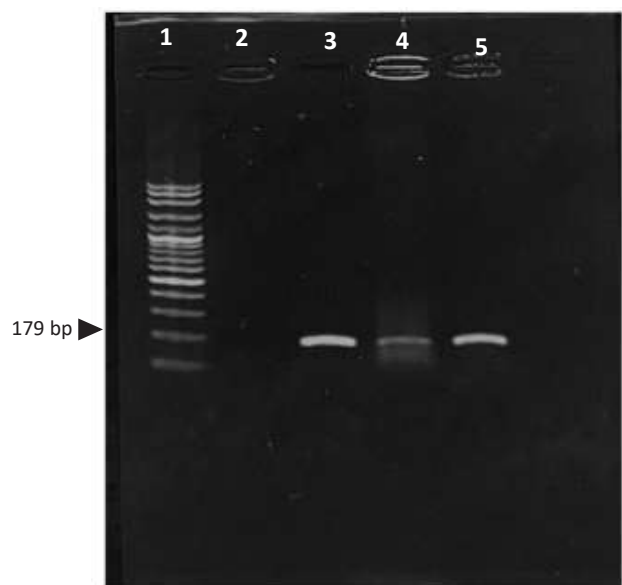
CAI: 0.97

Gambar 2. Gambaran distribusi frekuensi penggunaan kodon sepanjang urutan gen. Nilai CAI (Codon Adaptation Index) 1,0 dianggap sempurna dalam ekspresi organisme yang diinginkan, dan nilai CAI > 0,8 juga baik dalam hal tingkat ekspresi tinggi.

Empat urutan asam amino dari NCBI disejajarkan menggunakan program MultAlign untuk menghasilkan urutan konsensus (Gambar 1). Urutan konsensus asam amino diubah menjadi urutan nukleotida untuk optimasi kodon dengan target optimasi kodon pada inang *Escherichia coli* sehingga meningkat kemampuan ekspresinya tanpa mengubah urutan asam amino (Gambar 2). Transgen disintesis secara kimiawi dengan situs restriksi *NdeI* dan *XhoI* dan diklon ke dalam vektor pET15b (pET15b-tat).

Penelitian ini merancang vaksin baru berdasarkan urutan asam amino consensus dan optimasi kodon, pendekatan yang sebelumnya diterapkan dalam pengembangan vaksin terhadap virus rabies (Starodubova *et al.*, 2016), flu burung (Laddy *et al.*, 2007), TBC (Fihiruddin *et al.*, 2022), Penyakit Jembrana (Ishak *et al.*, 2019; Unsunnidhal *et al.*, 2019, 2021) dan hepatitis B (Obeng-Adjei *et al.*, 2011). Pendekatan konsensus didasarkan pada hipotesis bahwa asam amino konsensus masing-masing lebih stabil daripada asam amino non-konservasi pada posisi tertentu (Unsunidhal *et al.*, 2021). Pendekatan desain konsensus memiliki dampak yang tinggi pada protein fungsional dan non-fungsional (Porebski *et al.*, 2015), kemudian dilaksanakan optimasi kodon untuk memaksimalkan ekspresi (Jannah and Unsunnidhal, 2019; Unsunnidhal *et al.*, 2019, 2021).

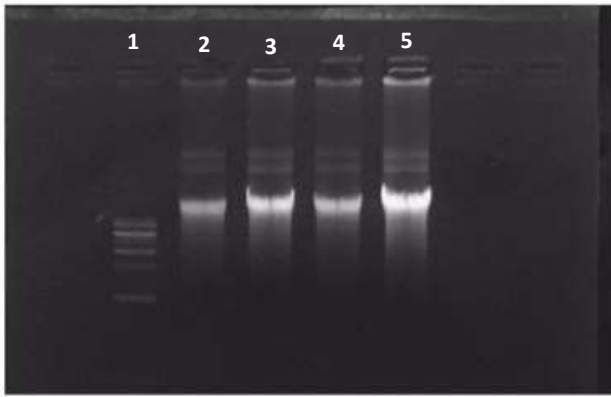
Dua koloni *E.coli* BL21 DE3 pasca transformasi dan dapat hidup pada media yang mengandung ampisilin digunakan untuk koloni PCR dengan menggunakan primer deteksi dan



Gambar 3. Hasil koloni PCR pada bakteri transforman yang dapat tumbuh pada media ampisilin. Kolom 1: marker; kolom 2: kontrol negatif (BL21(DE3)) tidak ditransformasi; kolom 3: kontrol positif (gen tat sintetik); kolom 4: koloni bakteri transforman dari plate yang telah dispread dengan 100 µL bakteri transforman di media yang mengandung ampisilin; kolom 5: koloni bakteri transforman dari plate yang telah dispread dengan 150 µL bakteri transforman di media yang mengandung ampisilin.

menghasilkan produk amplifikasi sebesar 179 bp (Gambar 3). Produk amplifikasi DNA ini diperoleh dengan menggunakan primer dari deteksi gen *tat*. Selanjutnya, koloni positif dikultur semalaman dalam media cair yang mengandung ampisilin untuk mengisolasi plasmid (Ishak *et al.*, 2019; Unsunnidhal *et al.*, 2019, 2021).

Hasil elektroforesis memperlihatkan bahwa ada tiga pita plasmid DNA rekombinan, tiga pita ini menunjukkan supercoil dan nick



Gambar 4. Hasil elektroforesis dari isolasi plasmid dari bakteri transforman. Kolom 1: Marker 1 kb; kolom 2 dan 3: isolasi plasmid dari bakteri transforman yang dispread dengan 100  $\mu$ L bakteri transforman di media yang mengandung ampisilin; kolom 4 dan 5: isolasi plasmid dari bakteri transforman yang dispread dengan 150  $\mu$ L bakteri transforman di media yang mengandung ampisilin.

sirkuler, dimana konformasi DNA mempengaruhi kecepatan DNA bermigrasi meskipun mempunyai berat yang sama. Diketahui DNA mempunyai tiga macam bentuk, *super-helix circular (I)*, *circular-opened (II)* dan *linier (III)* pada Gambar 4. Tiga bentuk DNA tersebut mempunyai kecepatan migrasi yang berbeda, dimana bentuk I lebih cepat bermigrasi dari bentuk II dan III. Faktor lain yang mempengaruhi kecepatan DNA bermigrasi yaitu ukuran molekul DNA, konsentrasi agarose, tegangan listrik, persentase, serta komposisi buffer elektroforesis (Ishak *et al.*, 2019; Jannah and Unsunidhal, 2019; Unsunidhal *et al.*, 2019, 2021).

Hasil isolasi plasmid yang telah terkonfirmasi kemudian dikonfirmasi lagi dengan primer sekuensing. Pelaksanaan amplifikasi ini menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Sampel diamplifikasi menggunakan primer deteksi dan sekuensing pada vektor pET15b, produk amplifikasi sebesar 514 bp karena bertambahnya beberapa *base pair* milik vektor pET15b (Gambar 5).

### Kesimpulan

Berdasarkan pada hasil penelitian yang telah diperoleh, dapat ditarik kesimpulan bahwa konstruksi dan kloning gen tat dari Virus Penyakit Jembrana pada plasmid pET15b berhasil dilaksanakan.



Gambar 5. Hasil PCR dengan menggunakan primer deteksi dan sekuensing untuk vektor pET15b. Kolom 1: marker 1 kb; kolom 2: hasil amplifikasi dengan primer sekuensing dengan tanpa menggunakan template (kontrol negatif); kolom 3: hasil amplifikasi dengan primer sekuensing dengan template menggunakan gen sintetik *tat*; kolom 4: hasil amplifikasi dengan primer sekuensing dengan template menggunakan hasil isolasi plasmid 150  $\mu$ l; kolom 5: hasil amplifikasi dengan primer deteksi dengan template menggunakan hasil isolasi plasmid 150  $\mu$ l; kolom 6: hasil amplifikasi dengan primer deteksi dengan template menggunakan gen sintetik *tat*; kolom 7: hasil amplifikasi dengan primer deteksi dengan tanpa menggunakan template (kontrol negatif); kolom 8: Marker 100 bp.

### Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dapat terlaksana berkat pendanaan yang bersumber dari Hibah Penelitian Pengembangan Departemen Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada Tahun Anggaran 2022.

### Daftar Pustaka

- Agustini, L.P., Pradana, D. K., Puspitasari, E., Mayun, I, K., Nengah, M, I. and Ekaana, I, W. (2016), *Laporan Teknis Surveilans Dan Monitoring Dalam Rangka Upaya Pembebasan Penyakit Jembrana Di Provinsi Bali Tahun 2016*.
- Chadwick, B., Coelen, R., Wilcox, G., Sammels, L. and Kertayadnya, G. (1995), "Nucleotide sequence analysis of Jembrana disease virus: a bovine lentivirus associated with acute disease syndrome", *J. Gen. Virol.*, Vol. 76, pp. 1637–1650.
- Chaturvedi, U.C., Shrivastava, R. and Nagar, R. (2005), "Dengue vaccines: Problems & prospects", *Indian J Med Res*, Vol. 121, pp. 639–652.

- Chen, H., He, J.U.N., Fong, S. and Wilcox, G. (2000), "Jembrana Disease Virus Tat Can Regulate Human Immunodeficiency Virus ( HIV ) Long Terminal Repeat-Directed Gene Expression and Can Substitute for HIV Tat in Viral Replication", *Journal of Virology*, Vol. 74 No. 6, pp. 2703–2713.
- Cheng-Mayer, C., Shioda, T. and Levy, J, A. (1991), "Host Range, Replicative , and Cytopathic Properties of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Are Determined by Very Few Amino Acid Changes in tat and gpl20", *Journal of Virology*, Vol. 65 No. 12, pp. 6931–6941.
- Costa, S.M., Freire, M.S. and Alves, A.M.B. (2006), "DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of Dengue 2 virus.", *Vaccine*, Vol. 24, pp. 4562–4564.
- Fihiruddin, F., Inayati, N., Jannah, R., Unsunnidhal, L. and Kusumawati, A. (2022), "Expression and epitope prediction of MPT64 recombinant proteins from clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis as immunoserodiagnostic candidates", *Veterinary World*, Vol. 15 No. 2, pp. 2376–2383.
- Hartaningsih, N., Dharma, D.M.N., Soeharsono, S. and Wilcox, G.E. (2001), "The induction of a protective immunity against Jembrana disease in cattle by vaccination with inactivated tissue-derived virus antigens", *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Vol. 78 No. 2, pp. 163–176.
- Ishak, J., Unsunnidhal, L., Martien, R. and Kusumawati, A. (2019), "In vitro evaluation of chitosan-DNA plasmid complex encoding Jembrana disease virus Env-TM protein as a vaccine candidate", *Journal of Veterinary Research*, Vol. 63 No. 1, pp. 7–16.
- Jannah, R. and Unsunnidhal, L. (2019), "KONSTRUKSI DAN KLONING PLASMID PCDNA3 . 1 ( + ) DENGAN SUBGENOTIP B3 HEPATITIS B CORE ANTIGEN ( HBcAg ) SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN DNA HEPATITIS B", *Jurnal Penelitian Dan Kajian Ilmiah Kesehatan*, Vol. 5 No. 2, pp. 125–131.
- Kusumawati, A., Wanahari, T.A., Astuti, P., Mappakaya, B.A. and Wasito. (2015), "Gene transfer vector derived from jembrana disease virus: A review", *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 11, pp. 176–181.
- Kusumawati, A., Wanahari, T.A., Putri, R.F., Untari, T., Hartati, S., Mappakaya, B.A. and Putro, P.P. (2014), "Clinical and pathological perspectives of jembrana disease virus infection: A review", *Biosciences Biotechnology Research Asia*, Vol. 11 No. 3, pp. 1221–1225.
- Laddy, D.J., Yan, J., Corbitt, N., Kobinger, G.P. and Weiner, D.B. (2007), "Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against avian influenza", *Vaccine*, NIH Public Access, Vol. 25 No. 16, pp. 2984–2989.
- Mancebo, H.S.Y., Lee, G., Flygare, J., Tomassini, J., Luu, P., Zhu, Y., Peng, J., *et al.* (1997), "P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro", *Genes & Development*, Vol. 11, pp. 2633–2644.
- Marshall, N.F., Peng, J., Xie, Z., Price, D.H. and Chem, J.B. (1996), "Control of RNA Polymerase II Elongation Potential by a Novel Carboxyl-terminal Domain Kinase \* tiation activity of positive transcription elongation fac-", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 271 No. 43, pp. 27176–27183.
- Obeng-Adjei, N., Yan, J., Choo, D. and Weiner, D. (2011), "Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against Hepatitis B core Antigen. (106.1)", *The Journal of Immunology*, Vol. 186 No. 1 Supplement.
- Porebski, B.T., Nickson, A, A., Hoke, D, E., Hunter, M, R., Zhu, L., McGowan, S., Webb, G, I., *et al.* (2015), "Structural and Dynamic Properties that Govern The Stability of An Engineered Fibronectin Type III Domain", *Protein Eng Des Sel*, Vol. 28 No. 3, pp. 67–78.
- Smith, C.A., Calabro, V., Frankel, A.D. and Francisco, S. (2000), "An RNA-Binding

- Chameleon”, *Molecular Cell*, Vol. 6, pp. 1067–1076.
- Soeharsono, S., Wilcox, G., Putra, A., Hartaningsih, N. and Tenaya, M. (1995), “The transmission of jembrana disease, a lentivirus disease of *Bos javanicus* cattle”, *Epidemiol.Infect*, Vol. 115, pp. 367–374.
- Starodubova, E.S., Kuzmenko, Y, V., Latanova, A, A., Preobrazhenskaya, O, V. and Karpov, V, L. (2016), “Creation of DNA vaccine vector based on codon-optimized gene of rabies virus glycoprotein (G protein) with consensus amino acid sequence”, *Molecular Biology*, Pleiades Publishing, Vol. 50 No. 2, pp. 328–331.
- Tenaya, I.W.M. (2016), “BIO-MOLECULAR STUDY OF JEMBRANA VIRUS: AS BASIC DEVELOPMENT OF TISSUE CULTURE VACCINE”, *Buletin Veteriner Udayana*, Vol. 8 No. 2, pp. 187–202.
- Unsunndhal, L., Ishak, J. and Kusumawati, A. (2019), “Expression of gag-CA Gene of Jembrana Disease Virus with Cationic Liposomes and Chitosan Nanoparticle Delivery Systems as DNA Vaccine Candidates”, *Tropical Life Sciences Research*, Vol. 30 No. 3, pp. 15–36.
- Unsunndhal, L., Wasito, R., Nugraha Setyawan, E.M., Warsani, Z. and Kusumawati, A. (2021), “Potential of polylactic-co-glycolic acid (PLGA) for delivery Jembrana disease DNA vaccine Model (pEGFP-C1-tat)”, *Journal of Veterinary Science*, Vol. 22 No. 6, pp. 1–15.
- Williams, J. (2013), “Vector Design for Improved DNA Vaccine Efficacy, Safety and Production”, *Vaccines*, Vol. 1 No. 3, pp. 225–249.
- Wu, S.F., Liao, C.L., Lin, Y.L., Yeh, C.T., Chen, L.K., Huang, Y.F., Chou, H.Y., *et al.* (2003), “Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a nonstructural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice”, *Vaccine*, Vol. 21, pp. 3919–3929.
- Zhu, Y., Pe, T., Peng, J., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., Amendt, B., *et al.* (1997), “Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 Tat transactivation in vitro”, *Genes & Development*, Vol. 11, pp. 2622–2632.