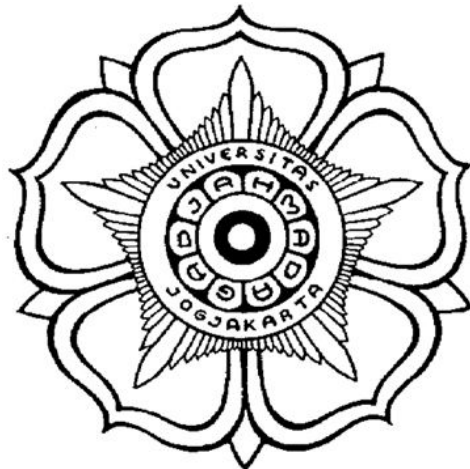


**KLONING GEN SUBUNIT TRANSMEMBRAN *env-tm*  
VIRUS PENYAKIT JEMBRANA  
DALAM VEKTOR EKSPRESI EUKARIOT pcDNA 3.1 (+)  
SEBAGAI CALON VAKSIN DNA**

**TESIS**

**untuk memenuhi sebagian persyaratan  
mencapai derajat sarjana S-2**

**Program Studi Bioteknologi  
Program Antarbidang**



**Diajukan oleh :**

**Basuki Hidayat  
16571/IV - 10/105/01**

**Kepada**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS GADJAH MADA  
YOGYAKARTA  
2003**

**KLONING GEN SUBUNIT TRANSMEMBRAN *env-tm*  
VIRUS PENYAKIT JEMBRANA  
DALAM VEKTOR EKSPRESI EUKARIOT pcDNA 3.1 (+)  
SEBAGAI CALON VAKSIN DNA**

**Basuki Hidayat**

**INTISARI**

Virus Penyakit Jembrana (*Jembrana Disease Virus*) adalah lentivirus dengan genom RNA rantai tunggal (7.732 basa). Virus ini menyerang sapi Bali (*Bos javanicus*) dan dapat menimbulkan kematian hingga 17% sehingga mengancam produktivitas sapi Bali sebagai sapi potong dan pekerja.

Belum ada vaksin yang efektif dan efisien yang mampu mencegah penyakit Jembrana. Perlu dilakukan pembuatan vaksin yang efektif, yaitu vaksin DNA.

Protein TM JDV yang dikode gen *env-tm* sangat immunogenik. Dengan menyisipkan gen *env-tm* dalam plasmid dan mengkloningnya akan diperoleh konstruksi calon vaksin DNA.

Penelitian ini bertujuan menyisipkan gen *env-tm* dalam plasmid ekspresi eukariot pcDNA 3.1 (+) dan mengkloningnya. Proses-proses tersebut merupakan bagian penting dari usaha pembuatan vaksin DNA yang diharapkan mampu menjadi sarana mencegah penyakit Jembrana.

Isolasi RNA JDV dilakukan untuk mendapatkan template amplifikasi cDNA dari gen *env-tm* dengan RT-PCR. Hasil proses itu berupa DNA dengan BM 1,1 kb, yang merupakan ukuran gen *env-tm*. DNA tersebut disisipkan dalam pCR 2.1, ditransformasikan, dan dikloning. Gen *env-tm* diisolasi dari transforman positif (pCR-TM) dengan pemotongan menggunakan *Bam*HI. Setelah dielektroforesis didapat fragment DNA 3,9 kb (pCR 2.1) dan 1,1 kb (*env-tm*).

Gen *env-tm* yang diperoleh kemudian disisipkan dalam pcDNA 3.1 (+), yang merupakan vektor ekspresi dalam jasad eukariot, kemudian plasmid ditransformasikan dan dikloning. Transforman positif dikultur dan diisolasi plasmidnya. Untuk mendapatkan plasmid dengan insert gen *env-tm* berorientasi sens dilakukan pengujian dengan pemotongan menggunakan *Bam*HI, *Eco*RI, dan *Eco*RV. Hasil pemotongan dengan *Bam*HI menunjukkan bahwa 7 dari 8 klon yang diuji mengandung plasmid yang terinsert gen *env-tm*. Pengujian dengan *Eco*RI dan *Eco*RV untuk menentukan klon yang membawa plasmid yang terinsert gen *env-tm* dengan orientasi sens menunjukkan bahwa ada 1 klon positif. Klon itu disebut pcDNA-TM, yang selanjutnya digunakan sebagai calon vaksin DNA untuk penyakit Jembrana.

**Kata kunci:** Virus Penyakit Jembrana, Gen *env-tm*, pCR-TM, pcDNA-TM (calon vaksin DNA)

**CLONING OF *env-tm* SUBUNIT TRANSMEMBRANE GENE  
JEMBRANA DISEASE VIRUS  
IN AN EUKARYOTIC EXPRESSION VECTOR pcDNA 3.1 (+)  
FOR DNA VACCINE CANDIDATE**

**Basuki Hidayat**

**ABSTRACT**

Jembrana disease virus (JDV) is agent of a highly infectious disease in Bali cattle (*Bos javanicus*). It disease discovered for the first time in Jembrana district, Bali, Indonesia. JDV genome composed of a single-stranded RNA of 7,732 nucleotides in length has been entirely sequenced.

Env protein is an interesting antigen of JDV. We described isolation of *env-tm* subunit gene of Env protein from the viral genome by a single step RT-PCR reaction. RT-PCR products were directly cloned in pCR 2.1-TOPO plasmid by topoisomerase based-TOPO TA cloning kit. A high number of positive recombinant bacterial colonies were obtain which were further analysis by *Bam*HI digestion for a definite characterization of positive clones.

We also construct of a pcDNA 3.1 (+)-based vector for DNA vaccine candidate (Env expression in eukaryotic cells). The *env-tm* gene was excised from the previous construct pCR 2.1-TM by a digestion with *Bam*HI and inserted in *Bam*HI site of pcDNA 3.1 (+) plasmid. The inserted gene comprises the entire coding sequence, including the C-terminal hydrophobic domain and an additional ATG for correct expression in eukaryotes.

7 out of 8 clones analyzed were positive. This high cloning efficiency was due to correct *Bam*HI cut of pcDNA 3.1 (+) which was the followed by alkaline phosphatase treatment. Gene orientation was further determined by *Eco*RI and *Eco*RV digestions. 1 out of 7 positive clones was in sens orientation while the other 6 were in anti-sense orientation. Clone in sens orientation will be used for DNA vaccine candidate.

**Keywords :** Jembrana disease virus, *env-tm* gene, topoisomerase cloning, pCR 2.1-TM, pcDNA-TM (DNA vaccine candidate).