Jurnal Riset Biologi dan Aplikasinya, Volume xx, Nomor xxxx, xxxxxxxxxx

**

Jurnal Riset Biologi dan Aplikasinya

https://journal.unesa.ac.id/index.php/risetbiologi

**Desain Gen *env-su* Pengkode Protein Surface Unit sebagai Kandidat Vaksin Jembrana Disease Virus secara *In Silico***

Design of The env-su Gene Coding for Surface Unit Protein as a Vaccine Candidate for Jembrana Disease Virus in In Silico

**Nur Asih Setiarini 🖂 1), Indriawati2), R Susanti3), Endang Tri Margawati4)**

1),3)Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang, Indonesia

2),4)Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Indonesia

**Abstrak**

Sapi Bali merupakan penghasil daging unggul, tetapi rentan terhadap penyakit Jembrana. Pemberian *crude vaccine* dinilai tidak efektif sehingga dipilih gen *env-su* untuk mengekspresikan protein Jembrana Surface Unit (JSU) sebagai kandidat vaksin Jembrana. Penelitian ini bertujuan menganalisis potensi protein JSU sebagai kandidat vaksin Jembrana dan menganalisis peningkatan ekspresi gen *env-su* yang telah dioptimasi kodonnya secara *in silico*. Desain vaksin dilakukan melalui *in silico* meliputi pemilihan sekuens protein SU genus *Lentivirus* dan *sequence alignment* dari UniProt. Konstruksi pohon filogeni protein SU menggunakan program MEGA-X, optimasi kodon gen *env-su* dengan kodon preferensi *Esherichia coli str. K-12 substr. MG1655* menggunakan OPTIMIZER. Gen *env-su* yang teroptimasi diinsersikan ke plasmid *pET-21a*(+) menggunakan GenScript. Hasil *sequence alignment* menunjukkan tidak terdapat protein SU yang memiliki nilai *percent identity* lebih dari 30% dengan protein JSU. Protein SU JDV dan BIV termasuk kelompok monofiletik dan memiliki *percent identity* sebesar 20,57%. Optimasi kodon menunjukkan peningkatan CAI sebanyak 1,000 dan GC 54,5%, serta penurunan ENc menjadi 22 dan AT 45,5%. *EcoR1* dan *HindIII* dapat mengenali daerah pemotongan gen target dan MCS pada plasmid sehingga gen *env-su* dapat diinsersikan ke plasmid *pET-21a*(+). Secara *in silico* protein JSU berpotensi sebagai kandidat vaksin Jembrana, namun perlu penelitian lanjut secara *in vitro* dan *in vivo.*

**Kata Kunci:** *Kandidat vaksin, gen env-su, sequence alignment, optimasi kodon, in silico*

***Abstract***

*Bali cattle are superior meat producers, but they are susceptible to Jembrana disease. The injection of the crude vaccine was considered ineffective, so the env-su gene was selected to express the Jembrana Surface Unit (JSU) protein as candidate for the Jembrana vaccine. This study aims to analyze the potential of the JSU protein as a candidate for the Jembrana vaccine and analyze the increase in the env-su gene expression which codon has been optimized in silico. Vaccine design was carried out through in silico including the selection of the SU protein sequences of the genus Lentivirus and sequence alignment of UniProt. The construction phylogeny tree of SU protein using MEGA-X program, optimization of env-su gene codon with preference codon Esherichia coli str. K-12 substr. MG1655 using OPTIMIZER. The optimized env-su gene was inserted into the plasmid pET-21a (+) using GenScript. The result of sequence alignment shows that there is no SU protein which has percent identity value of more than 30% with JSU protein. The SU JDV and BIV proteins are monophyletic groups and have a percent identity of 20.57%. codon optimization showed the increase in CAI by 1,000 and GC 54.5%, and the decrease in ENc to 22 and AT 45.5%. EcoR1 and HindIII can recognize the gene target and MCS cut regions on the plasmid so that the env-su gene can be inserted into the pET-21a (+) plasmid.With in silico, the JSU protein has the potential to be a candidate for the Jembrana vaccine, but it needs further research in vitro and in vivo.*

**Keywords**: *Vaccine candidate, env-su gene, sequence alignment, codon optimization, in silico*

**PENDAHULUAN**

Sapi Bali merupakan salah satu bangsa sapi asli Indonesia yang sangat potensial sebagai penghasil daging karena memiliki banyak keunggulan, antara lain mudah beradaptasi pada lingkungan kritis, tingkat reproduksi dan pertumbuhan yang baik (Astiti, 2018) serta memiliki persentase karkas tinggi sehingga kandungan lemak karkas rendah (Wiyatna, 2007). Kelemahan sapi Bali adalah rentan terhadap penyakit Jembrana (Berata, 2009). Penyakit Jembrana merupakan penyakit endemis pertama kali muncul dan mewabah di Desa Sangkaragung, Kecamatan Jembrana, Kabupaten Jembrana Provinsi Bali tahun 1964 (Mardiatmi, 2015). Upaya pencegahan penyakit Jembrana dilakukan menggunakan *crude vaccine* (Margawati *et al.*, 2006). Tetapi vaksin tersebut memiliki kelemahan karena daya imunogenisitasnya rendah, tidak stabil, mahal, produksinya terbatas, dan hanya mampu menginduksi kekebalan dengan tingkat proteksi 70%, sehingga tidak efektif untuk pencegahan dan penanggulangan penyakit Jembrana (Widiyanti *et al.,* 2009).

Seiring dengan kemajuan teknologi dalam bidang rekayasa genetika, serta telah tersedianya informasi urutan basa (sekuens) genome dari berbagai jenis virus maka teknologi DNA rekombinan dapat diaplikasikan untuk menghasilkan protein fungsional sebagai bahan vaksin (Ali, 2015). Genome Jembrana Disease Virus (JDV) pada *genbank* dapat digunakan sebagai referensi bahan vaksin penyakit Jembrana yang disisipkan dalam plasmid ekspresi dan diproduksi dalam sel inang *E. coli*.

Protein Jembrana Surface Unit (JSU) berperan ketika awal proses replikasi dengan berinteraksi pada proses pengikatan antara partikel Jembrana Disease Virus dengan permukaan sel inang sehingga dapat memicu respons antibodi yang mampu menghalangi pengenalan reseptor serta mencegah proses masuknya virus ke dalam sel target, maka dari itu gen *env-su* dipilih sebagai kandidat vaksin Jembrana untuk mengekspresikan protein rekombinan JSU (Kusumawati *et al*., 2015; Indriawati *et al.,* 2013). Uji potensi protein JSU sebagai kandidat vaksin Jembrana perlu dilakukan *sequence alignment* menggunakan UniProt untuk mengetahui seberapa besar tingkat kesaaman yang ada pada protein JSU dengan protein SU lainnyagenus *Lentivirus,* hasil uji tersebut ditentukan dalam perhitungan *percent identity* (Pearson, 2013). Tahapan ini dilakukan untuk memastikan agar protein yang terpilih sebagai kandidat vaksin tidak memiliki kesamaan yang tinggi dengan protein lain, karena dapat memicu dihasilkannya antibodi atau respons imun berbeda terhadap sel inangnya (Gustiananda, 2011).

Penggunaan *E. coli* sebagai sel inang dalam produksi protein rekombinan karena *E. coli* mudah dimanipulasi dan siklus hidupnya pendek sehingga dapat meminimalkan biaya produksi serta tingkat ekspresi protein target yang dihasilkan tinggi dan cepat. Namun produksi protein rekombinan menggunakan sel inang *E. coli* juga memiliki kekurangan yaitu terjadinya bias kodon yang mempengaruhi hasil ekspresi protein target dengan membentuk agregat protein tidak aktif (badan inklusi) (Maksum *et al.,* 2017; Silaban *et al.*, 2017). Beberapa asam amino dapat dikodekan oleh lebih dari satu kodon, atau bisa disebut dengan kodon sinonim, seperti asam amino Isoleusin dikodekan oleh kodon AUU, AUC, dan AUA. Frekuensi penggunaan kodon sinonim tidak digunakan secara seragam, bervariasi antar spesies dan antar individu pada spesies yang sama. Fenomena tersebut disebut bias kodon (Salim & Cavalcanti, 2008; Quax *et al.*, 2015).

Strategi untuk mengatasi hal tersebut adalah pemanfaatan teknologi gen sintetik dari gen target menjadi cocok dengan kodon preferensi sel inang (Silaban *et al.,* 2017). Metode optimasi kodon merupakan proses yang dapat menyesuaikan kodon gen *env-su* JDV pengkode protein JSU dengan kodon preferensi pada *E. coli* sebagai inang (Rosano & Ceccarelli, 2014; Lanza *et al.*, 2014). Proses pengoptimalan kodon dengan suatu perangkat membutuhkan urutan DNA ataupun protein dari gen target yang akan dioptimalkan dan kumpulan referensi kodon dari sel inang (Puigbo *et al.*, 2008). Penemuan dan pengembangan desain vaksin protein rekombinan JSU dilakukan menggunakan uji *in silico* terlebih dahulu untuk mengurangi risiko kemungkinan kegagalan dan kerugian serta dapat menghemat waktu dan biaya (Ullah *et al.*, 2020).

Oleh karena iu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui protein JSU yang dikodekan gen *env-su* JDV sebagai kandidat vaksin penyakit Jembrana berdasarkan nilai *percent identity* hasil *sequence alignment* dengan protein SU genus *Lentivirus* dan mengetahui hasil optimasi kodon gen env-su JDV secara *in silico* akan meningkatkan ekspresi protein rekombinan JSU.

**METODE**

#### Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus sampai Desember 2020, di laboratorium Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang. Penelitian dilakukan menggunakan *computer* ASUS E202S *series* dengan spesifikasi sistem windows 7 dan prosesor intel celeron N3050 dual-core.

**Pemilihan Sekuens dan Proses *Sequence Alignment* Protein SU**

Berbagai sekuens asam amino protein SU yang tergabung ke dalam genus *Lentivirus*, seperti Feline Immunodeficiency Virus (FIV), Simian Immunodeficiency Virus (SIV-mac), Bovine Immunodeficiency Virus (BIV), Caprine Arthritis Encephalitis Virus(CAEV-63), Jembrana Disease Virus (JDV), Equine Infections Anemia Virus (EIAV), dan Ovine Maedi Visna Related Virus (SA-OMVV) dicari didalam situs web UniProt (<https://www.uniprot.org/>).

Pencarian dilakukan dengan kata kunci “envelope nama spesies virus”, dipilih enti yang memiliki kode akses “ENV” dan dipilih entri yang sudah di reviewed oleh kurator swissprot dengan simbol entri berwara kuning. Pemilihan dengan reviewed kurator swissprot karena entri tersebut sudah tervalidasi berdasarkan dari hasil banyak penelitian yang telah dilakukan dan sudah dipisah antara entri penyandi protein SU dan penyandi protein TM, sehingga memudahkan dalam proses *alignment*. Apabila terdapat berbagai entri pada satu protein dengan spesies yang sama, dipilih entri yang memiliki jumlah sekuens asam amino *env* yang sesuai dengan total sekuens nukleotida *env* di NCBI.

Setiap protein SU dari berbagai spesies ditambakan ke dalam opsi “*add basket”* yang ada pada *tools* UniProt. Proses *sequence alignment* protein JSU dilakukan secara bergantian dengan setiap sekuens protein SU organisme lainnya, seperti *sequence alignment* protein JSU dengan sekuens protein SU dari FIV dan seterusnya. Selanjutnya, dibuat tabel hasil *alignment* protein JSU dengan setiap gen protein SU lainnya meliputi nilai *persen identity*, *identical positions* dan *similar positions*.

**Konstruksi Pohon Filogenetik Protein SU Genus *Lentivirus***

Setiap protein SU dari berbagai spesies ditambakan ke dalam opsi “*add basket”* yang ada pada *tools* UniProt dan di unduh dalam satu file dengan format *fasta.* Pohon filogenetik dapat dibuat menggunakan software MEGA-X. File yang berisi kumpulan gen penyandi *env*-*su* genus *Lentivirus* dibuka didalam software MEGA. Untuk membuat semua sekuens menjadi sejajar, di pilih salah satu asam amino dan di tekan kontrol A pada keyboard, kemudian dipilih opsi “*alignment by the clustalw algorithm”.* Setelah sekuens sejajar, dipilih menu data dan dipilih opsi “*phylogenetic analysis”.* Kemudian, pilih menu “*phylogenetic”* dan dipilih tipe pohon filogenetik “*construk/test neighbor-joining tree”* serta pilih “*bootstrap* *method*” 1000x, setelah itu klik menu “*view”* kemudian pilih opsi “*branch lengths*” untuk melihat jarak evolusioner spesies dan pilih opsi “*starts/frequency*” untuk menampilkan nilai *bootstrap* dalam *node*. terakhir disimpan file dalam bentuk PDF atau PNG.

**Optimasi Gen** ***env-su* JDV**

Optimasi gen *env-su* JDVdilakukan dengan situs web OPTIMIZER (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>). Urutan nukleotida gen *env-su* dicari dalam complete genome JDV pada panjang 5197─7542 dan dipilih nukleotida pada sekuens ke─5197 sampai 6463 yang menyandi gen *env-su* JDV dengan panjang 1266 bp menggunakan situs web NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Nukleotida gen *env-su* tersebut dimasukkan ke dalam kolom, dipilih kodon referensi sel inang dari data HEG-DB dan dipilih sel inang “*Esherichia coli str. K-12 substr. MG1655*”. Kemudian pilih kode genetik sel inang yaitu Eubacteria, lalu dipilih metode yang digunakan “*one AA-one codon*”. Kodon hasil dioptimasi oleh perangkat OPTIMIZER selanjutnya akan dianalisis nilai GC dan ENc serta kandungan GC dan AT.

Untuk dianalisis daerah genome yang dikenali oleh enzime retriksi menggunakan situs web GenScript (<https://www.genscript.com/tools/restriction-enzyme-map-analysis>). Nukleotida gen *env-su* JDV hasil optimasi dimasukkan ke dalam kolom pada perangkat, kemudian dipilih enzim retriksi yang akan digunakan yaitu *EcoRI* dan *HindIII.*

**Insersi Gen *env-su* JDV ke dalam Plasmid *pET-21a(+)***

Kodon *env-su* yang sudah dioptimasi diinsersikan ke dalam plasmid ekspresi *pET-21a(+)* dengan bantuan perangkat (tools) Genscript ([https://www.genscript.com/gensmart-design/#](https://www.genscript.com/gensmart-design/)) yang terlebih dahulu mendaftarkan diri untuk pembuatan akun Genscript. Langkah pertama, dipilih opsi “*create construct*”, kemudian diberi nama plasmid yang akan didesain. Klik opsi “*the commons*”, lalu pilih “*popular commercial vector*” yaitu kumpulan berbagai vector yang umum digunakan dalam penelitian. Kemudian pilih “*bacterium*” dan dicari vektor (plasmid) *pET-21a(+)* yang akan didesain, lalu klik opsi “*create* *construct*” dibawah kolom.

Plasmid *pET-21a(+)* yang sudah dipilih akan muncul pada tampilan kerja GenScript. Gen  *env-su* yang telah dioptimasi, kemudian diinsersikan melalui situs MCS pada plasmid dengan dipilih opsi “*sequence”* lalu “*insert”*, selanjutnya dipilih opsi “*add”* dalam menu “*annotation”* dan diberi nama gen *env-su.*

Desain plasmid yang telah tersisipi gen *env-su* JDV selanjutnya dioptimasi menggunakan opsi “optimasi gen” yang berada di dalam menu “*sequence”* dengan pemilihan sel inang *E. coli* serta enzim retriksi *EcoRI* dan *HindIII* yang ditambahkan pada ujung 5’ dan ujung 3’ pada gen. Langkah terakhir, untuk mengetahui kesalahan desain plasmid yang dibuat dapat dipilih menu “*project”* dan dipilih opsi “*check desain”*. Plasmid *pET-21a*(+) memiliki ukuran panjang nukleotida 5443bp, setelah konstruksi gen *env-su* ke dalam plasmid, ukuran panjang plasmid menjadi 6709bp

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### Sebanyak tujuh sekuens protein SU genus *Lentivirus* yang diambil dari situs web UniProt di tampilkan dalam Tabel 1. Pada tabel tersebut dapat dilihat nomor akses, kode akses, spesies virus dan panjang protein Env yang dipilih sebagai acuan pengambilan protein SU dari tiap spesiesnya. Setiap protein SU yang ditambahkan akan di *alignment* dengan protein JSU dari Jembrana Disease Virus.

 **Tabel 1.** Daftar penelusuran berbagai protein Env genus *Lentivirus* menggunakan situs web uniprot

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Nomor Akses** | **Nama Akses** | **Spesies Virus** | **Panjang AA** |
| [Q82857](https://www.uniprot.org/uniprot/Q82857) | ENV\_JEMBR | [Jembrana Disease Virus (JDV)](https://www.uniprot.org/taxonomy/36370) | 781 |
| P19557 | ENV\_BIV29 | [Bovine Immunodeficiency Virus (Strain R29) (BIV)](https://www.uniprot.org/taxonomy/417296) | 904 |
| P16090 | ENV\_FIVPE | [Feline Immunodeficiency Virus (Isolate Petaluma) (FIV)](https://www.uniprot.org/taxonomy/11674) | 856 |
| P32541 | ENV\_EIAVC | [Equine Infectious Anemia Virus (Isolate CL22) (EIAV)](https://www.uniprot.org/taxonomy/31675) | 859 |
| P31627 | ENV\_CAEVG | [Caprine Arthritis Encephalitis Virus (Strain 63) (CAEV-63)](https://www.uniprot.org/taxonomy/11662) | 942 |
| P16899 | ENV\_OMVVS | [Ovine Maedi Visna Related Virus (Strain South Africa) (SA-OMVV) (Ovine lentivirus)](https://www.uniprot.org/taxonomy/11664) | 990 |

AA = Jumlah asam amino protein Env

Dari *sequence alignment* antar protein tersebut dapat dipelajari garis evolusi berujung pada nenek moyang yang sama (Bu’ulolo *et al.,* 2010). Hasil *sequence alignment* protein JSU dengan protein SU spesies lain yang tergolong genus *Lentivirus* disajikan dalam Tabel 2*.* Berdasarkan penentuan batas nilai *percent identity* yang digunakan untuk membandingkan antar sekuens protein, tidak terdapat protein SU yang dikodekan oleh gen *env-su* lainnya pada genus *Lentivirus* yang memiliki *percent* *identity* lebih dari 30% dengan protein Jembrana Surface Unit JDV. Hasil yang diperoleh pada Tabel 2. diperkuat dengan pernyataan Bu’ulolo *et al.,* (2010), bahwa semakin jauh persamaan sekuens yang disejajarkan berarti bahan (sekuens) yang dibandingkan tersebut semakin spesifik jenisnya, sebaliknya semakin dekat persamaan antar sekuens berarti bahan yang dibandingkan semakin umum jenisnya. Hal ini menunjukkan protein JSU berpotensi dijadikan kandidat vaksin penyakit Jembrana berdasarkan nilai *percent identitiy* hasil *sequence alignment* secara *in silico*. Protein yang spesifik dipilih sebagai bahan baku vaksin karena tidak menginduksi efek samping, menginduksi pembentukan antibodi spesifik dan tidak memicu respons imun terhadap sel inang yang tidak diinginkan (Susmiarsih, 2018; Gustiananda, 2011).

**Tabel 2.** Hasil *sequence alignment* protein JSU dengan protein SU lainnya genus *Lentivirus*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Spesies** | ***Percent Identity* (%)** | ***Similar Positions*****(AA)** | ***Identical Positions*****(AA)** |
| **Spesies ke-1** | **Jumlah AA** | **Spesies ke-2** | **Jumlah****AA** |
| JDV | 422 | FIV | 611 | 12,78 | 135 | 81 |
| JDV | 422 | EIAV | 438 | 14,72 | 127 | 72 |
| JDV | 422 | CAEV-63 | 550 | 10,15 | 113 | 66 |
| JDV | 422 | SA-OMVV | 555 | 11,47 | 105 | 75 |
| JDV | 422 | SIV-mac | 508 | 12,35 | 114 | 73 |
| JDV | 422 | BIV | 555 | 20,57 | 141 | 122 |

AA= Jumlah asam amino protein SU

*Percent identity* pada penjajaran urutan sekues asam amino maupun nukleotida dari dua atau lebih spesies yang berbeda dapat dihitung dengan jumlah *identical position* dibagi dengan jumlah total seluruh karakter kemudian dikali 100% (Ernawati, 2014). Tetapi, perhitungan *percent* *identiy* yang terbentuk pada tiap program mempunyai nilai yang berbeda meskipun objek penelitiannya sama. Hal ini dipengaruhi oleh teknik pemograman pada *tools* yang digunakan (Sunarto, 2015).

Proses *sequence alignment* berbagai protein SU genus *Lentivirus* dengan menggunakan situs web UniProt hanya dapat mengukur similaritas sekuens protein JSU dengan protein SU lainnya tanpa mengetahui kekerabatan antar spesies pada genus *Lentivirus*. Oleh karena itu, perlu dilakukan metode *multiple sequence alignment* dengan clustalW untuk mengkonstruksikan pohon filogeni yang menggambarkan hubungan kekerabatan berdasarkan *similarity* sekuens pada semua spesies (Widayat & Subositi, 2009; Endo *et al.,* 2003).

Protein SU tergolong dalam genus *Lentiviru*s direkontruksikan ke dalam pohon filogenetik yang terbentuk dari analisis *neighbour joining* (NJ) dan diuji evalusi pohon secara statistik menggunakan *bootstrap* sebanyak 1000 kali ulangan. Pohon filogeni berbentuk dendogram disajikan pada Gambar 1 berdasarkan nilai *branch length* dan uji *bootstrap*.



Gambar 1. Dendogram protein SU berdasarkan *branch length* dan uji *bootstap* (angka dalam kolom menyatakan nilai *boostrap*)

Konstruksi pohon filogeni protein SU genus *Lentivirus* yang ditampilkan pada Gambar 1 membentuk dua *clade* dengan nilai jarak evolusi yang tidak jauh berbeda dan nilai *bootstraping* 70%. Anggota *clade* 1 terdiri atas dua *node* internal yang berbeda, *node* internal 1 terdiri dari protein SU EIAV dan SIV-mac sementara *node* internal 2 tersusun atas protein SU CAEV-63 dan SA-OMVV. Sedangkan, pada anggota *clade* 2 juga tersusun atas dua *node* internal, yaitu *node* internal 1 ditempati oleh protein SU FIV dan *node* internal 2 berisi protein SU JDV dan BIV.

Spesies CAEV-63 dengan SA-OMVV dapat dikatakan berkerabat dekat karena memiliki nilai *branch lenght* hampir sama yaitu 0,23 untuk SA-OMVV dan 0,22 untuk CAEV-63 dihitung dari satu titik *node* yang sama yang artinya kedua spesies tersebut diturunkan dari satu unit leluhur. Selain itu, hasil uji *bootstap* menunjukkan kedua spesies bersifat monofiletik. Kelompok monofiletik ditunjukkan pada cabang dengan nilai *bootstrap* 100% yang diasumsikan membawa sifat atau pola genetik dan biokimia yang sama dari satu nenek moyang (Akhsani *et al.,* 2017; Hidayat *et al.,* 2008). Pada penelitian Zein & Sulandari (2009) juga mengungkapkan bahwa suatu cabang bersifat monofiletik apabila seluruh OTU yang dikelompokkan memiliki cabang berdekatan karena kelompok tersebut berbagi leluhur yang sama dibandingkan dengan kelompok lain yang berbeda garis keturunan.

Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV-63) dan Visna Related Virus (SA-OMVV) memiliki banyak kesamaan genetik pada gen struktural *env* karena tergolong dalam genome SRLV (*Small-ruminant lentiviruses*) (Bartak *et al.*, 2018). Dari proses *sequence aligment* menggunakan UniProt, kedua protein tersebut memiliki nilai *persen identity* sebesar 67.864%, sejalan dengan penelitian Valas *et al* (1997), perbedaan protein SU antara SA-OMVV dengan CAEV-63 sebanyak 32,3%.

Pada Gambar 1, terlihat bahwa protein SU JDV dan BIV juga merupakan kelompok monofiletik. Protein SU JDV dan BIV masuk ke dalam *node* yang sama dengan nilai *branch length* antar spesies tersebut cukup dekat yakni 2,47 pada JDV dan 1,19 pada BIV. Nilai *branch length* tersebut menguatkan hasil *sequence alignment* bahwa kedua protein tersebut memiliki kemiripan gen *env-su* penyandi protein Surface Unit yang diduga diwariskan dari satu unit leluhur (Suwiti, 2009).

Protein SU SIV-mac dan EIAV berada dalam satu *node* internal tetapi memiliki nilai *branch length* cukup jauh, yaitu 5,45 pada SIV-mac dan 1,96 pada EIAV. Hal tersebut menjelaskan bahwa kedua spesies memiliki jarak evolusioner berbeda walaupun dibentuk pada *node* yang sama, pernyataan tersebut didukung dengan hasil uji *bootstap* pada cabang protein SU SIV-mac dan EIAV membentuk nilai 54% yang tergolong dalam kategori lemah, sehingga masih terdapat kemungkinan perubahan susunan *clade*. Jarak genetik terjauh terjadi pada protein SU BIV dan SIV-mac, karena kedua protein tersebut dipisahkan oleh *clade* yang berbeda.

Gen *env-su* JDVmemiliki panjang fragment 1266 basa nukleotida menyandi protein JSU dengan berat molekul 47 kDa dan panjang 422 asam amino (Chadwick *et al.,* 1995). Sekuens nukleotida gen *env-su* tersebut kemudian dilakukan optimasi kodon dengan perangkat OPTIMIZER untuk memastikan dan meningkatkan kemungkinan protein tersebut dapat diekspresikan pada sel inang *E. coli* (*strain K12*) (Mauro & Chappell, 2014). Hasil sebelum dan sesudah dioptimasi kodon dapat dilihat pada Tabel 3 yang meliputi perubahan nilai CAI, ENc serta kandungan GC dan AT.

**Tabel 3.** Hasil optimasi kodon gen *env-su* JDV dengan optimizer

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Tipe** | **CAI** | **ENc** | **%GC** | **%AT** |
| Sebelum optimasi | 0,217 | 51 | 45,9 | 54,1 |
| Sesudah optimasi | 1,000 | 22 | 54,5 | 45,5 |

Pada Tabel 3 dapat dilihat bahwa nilai CAI kodon gen *env-su* sebelum dioptimasi adalah 0,217. Nilai ini tergolong rendah karena kisaran nilai CAI yang ideal adalah 0,8─1,0, sehingga perlu dilakukan optimasi kodon (GenScript, 2019). Hasil optimasi kodon gen *env-su* menunjukkan bahwa nilai CAI meningkat menjadi 1, nilai ini dikategorikan tingkat nilai tertinggi. Semakin besar nilai CAI, semakin kuat penggunaan kodon sel inang sehingga dapat meningkatkan ekspresi gen target. Apabila indeks CAI pada hasil optimasi kodon bernilai 1, menunjukkan kodon selalu digunakan untuk sintesis setiap asam amino yang dikodekan (Gun *et al.*, 2018; Salim & Cavalcanti, 2008). Hasil *alignment* menunjukkan bahwa dari 1266 basa nukleotida *env*-s*u*, terdapat 937 basa nukleotida yang cocok dengan genome *E. coli str K-12 substr MG1655,* 155 basa nukleotida diubah dengan sesama jenis basa nitrogennya (*transition*), dan 174 basa nukleotida diubah dengan berbeda jenis basa nitrogennya (*transversion*).

Nilai ENc yang tercantum pada Tabel 3 sebelum dioptimasi 51, setelah dioptimasi turun menjadi 22. Indeks nilai ENc ≤ 35 berarti preferensi kodon inang yang digunakan tinggi sementara nilai ENc ≥ 50 menunjukkan masih terdapat penggunaan kodon acak sehingga ekspresi gen rendah. Serupa dengan hasil penelitian Behura & Severson (2012), apabila nilai ENc mendekati angka 20 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan penggunaan kodon inang dalam suatu kodon gen target. Tingkat relatif penyesuaian penggunaan kodon inang dalam gen target ditentukan dengan melihat nilai ENc. Hal ini sesuai dengan pernyataan Uddin (2017), semakin kecil nilai ENc, semakin tinggi kodon sel inang yang digunakan. Hasil penyesuaian kodon sel inang *E. coli* pada kodon gen *env-su* di tampilkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Penyesuaian penggunaan kodon sel *E. coli* dalam kodon gen *env-su*

Dari Gambar 2 terlihat bahwa setiap asam amino penyusun protein SU dapat dikodekan oleh satu ataupun beberapa kodon berbeda (kodon sinonim). Setelah dilakukan proses optimasi kodon, terlihat beberapa asam amino yang awalnya dikodekan oleh lebih dari 1 kodon menjadi 1 kodon saja. Asam amino Alanin (A) pada gen *env-su* sebelum dioptimasi dikodekan oleh 4 kodon yaitu GCA, GCC, GCG dan GCT, setelah optimasi hanya kodon GCG yang terpilih. Asam amino Cystein (C) awalnya dikodekan oleh dua kodon yaitu TGC dan TGT, setelah optimasi kodon, asam amino Cystein hanya dikodekan oleh kodon TGC.

Modifikasi urutan basa nukleotida gen *env-su* dilakukan dengan cara mengganti basa nukleotida adenin (A) dan timin (T) dengan guanin (G) dan sitosin (C) dalam suatu kodon tanpa mengubah urutan asam amino pengkode protein JSU hasil translasi, serta didapat pemerataan kandungan GC ke seluruh bagian gen (Yulita *et al.,* 2020). Dengan demikian, sekuen baru gen *env-su* yang telah dioptimasi memiliki kandungan GC sesuai dengan gen pada sel inang *E. coli* karena organisme yang berbeda menunjukkan kecenderungan kandungan GC yang berbeda pula (Salim & Cavalcanti, 2008). Kodon *env-su* yang belum teroptimasi memiliki kandungan GC 45,9%, dan setelah dioptimasi kandungan GC naik menjadi 54,5%. Hal ini sesuai dengan penelitian Wang & Reeves (2000), bahwa kandungan GC pada *E. coli* berkisar di atas 51%, sedangkan persentase ideal kandungan GC yaitu 30-70% (Mega *et al.*, 2019).

Kandungan GC yang rendah dapat berpengaruh terhadap stabilitas struktur mRNA pada protein target dengan meningkatkan kondisi heterokromatin pada untai DNA. Heterokromatin merupakan salah satu jenis kromatin penyusun DNA yang berbentuk padat (kompak), karena struktur tersebut RNA polimerase tidak dapat menginisiasi proses transkripsi dan translasi sehingga gen target tidak terekspresi (Barahimipor *et al.*, 2015; Ramadhani & suvifan, 2012), sedangkan kandungan GC yang terlalu tinggi dapat menurunkan tingkat ekspresi, karena diperkirakan dapat menterminasi proses transkripsi (Silaban et al., 2016). Gen pengkode protein dengan kandungan GC ideal pada suatu organisme akan diterjemahkan secara optimal sehingga meningkatkan ekspresi gen target. Kandungan AT sebelum dioptimasi 54,1%, setelah dioptimasi turun menjadi 45,5%. Kodon yang kaya AT akan diterjemahkan secara tidak efisien dan dapat menurunkan ekspresi gen target (Courel *et al*., 2019; Zhou *et al.*, 2014).

Ekspresi gen yang dilakukan optimasi kodon dengan gen yang tidak dioptimasi terdapat perbedaan signifikan pada tingkat ekspresi protein rekombinan yang terbentuk. Gen yang dioptimasi kodon menghasilkan protein rekombinan lebih tinggi daripada gen tidak teroptimasi dan dengan analisis *western blotting,* ekspresi protein pada gen yang tidak dioptimasi kodon hampir tidak dapat dideteksi karena terjadi badan inklusi (Liu *et al*., 2018).

Badan inklusi terbentuk ketika laju ekspresi protein rekombinan tinggi, tetapi tidak diikuti dengan pelipatan protein yang sesuai menjadi protein aktif dan terjadi pengurangan ikatan disulfida antar asam amino (Glick *et al.,* 2010). Protein-protein yang tidak terlipat secara sempurna akan saling berinteraksi sehingga menyebabkan agregrat protein yang tidak larut sehingga tidak dapat dideteksi (Maksum *et al.,* 2019). Pembentukan badan inklusi yang berupa agregat protein target tersebut menunjukkan ketidakmampuan sel inang untuk memproduksi protein rekombinan dalam bentuk aslinya (Thenawidjaja *et al.,* 2017).

Hasil pemotongan enzim restriksi endonukleasemelalui situs web GenScript yang ditampilkan pada Gambar 3 menunjukkan kedua enzim tersebut dapat mengenali daerah pemotongan pada situs MCS (*multiple cloning site)* di dalam plasmid *pET-21a(+)*. Enzim retriksi *EcoRI* akan memotong fragmen DNA dalam urutan 5′-G’AATCC-3’ dan komplemennya 3’-CCTAA’G-5’ dengan panjang 159─164bp pada plasmid, sementara enzim *HindIII* memotong pada urutan DNA 5’-A’AGCTT-3’ dan komplemennya 3’-TTCGA’A-5’ dengan panjang 1431─1436bp pada plasmid. Pemotongan dengan dua jenis enzim retriksi dititik pemotongan terpisah pada DNA yang berbeda dilakukan secara bersamaan akan menghasilkan 2 pita yaitu pita berukuran 5443 pb (ukuran plasmid *pET-21a*(+) dan pita berukuran 1266 pb (ukuran gen *env-su*).



**Gambar 3**. Konstruksi gen *env-su* ke dalam plasmid *pET-21a(+)*

Optimasi pemotongan DNA dilakukan dengan metode enzim retriksi endonuklease *double–digest* yakni *EcoRI* dan *HindIII.* Metode *double–digest* berfungsi untuk memotong DNA pada titik pemotongan terpisah menggunakan dua enzim retriksi endonuklease berbeda jenis. Metode ini sering digunakan dalam kloning terarah yang akan menghasilkan dua fragmen DNA yakni fragmen DNA vektor dan fragmen DNA target, dapat mengurangi biaya serta waktu kloning, dan memudahkan ligasi dari DNA yang berbeda (Shirasawa *et al.,* 2016; Wang *et al.,* 2017). Pemilihan situs pemotongan enzim retriksi didasarkan pada ada tidaknya situs pemotongan enzim yang akan digunakan pada urutan nukleotida gen *env-su* dan plasmid *pET-21a*(+) (Priyatno *et al.,* 2019).

Kedua enzim tersebut digunakan untuk memotong DNA penyandi protein target dan DNA plasmid agar hasil pemotongan kedua molekul bersifat komplementer sehingga DNA protein target dapat dikonstruksikan ke dalam plasmid dengan membentuk ikatan hidrogen yang relatif stabil dan dapat dihubungankan dengan enzim ligase melalui ikatan fosfodiester (Choiriyah *et al.*, 2013; Mega *et al.*, 2019). Proses transkripsi plasmid *pET-21a(+)* dikontrol oleh T7 promoter yang hanya akan memulai transkripsi setelah diinisiasi oleh RNA polimerase T7. T7 promoter biasa digunakan pada vektor ekspresi karena memiliki daya transkripsi gen target yang tinggi serta mampu mengendalikan ekspresi gen sehingga dapat menekan pengaruh toksik protein yang juga diekspresikan sel inang *E. coli* untuk keberlangsungan hidupnya (Kusumaningsih, 2018).

Pada plasmid *pET-21a(+)* telah dilengkapi operon *lac* sebagai pengontrol proses transportasi dan metabolisme laktosa dalam sel *E.coli*. Proses ekspresi gen target dimulai dengan terjadinya ikatan antara *inducer* dengan protein *lac repressor*. Kompleks ikatan tersebut mengakibatkan protein *lac repressor* terinaktivasi dan tidak berikatan dengan operon *lac*, sehingga akan dapat mengaktifkan enzim RNA polimerase pada *E.coli* menjadi protein polimerasi-T7 yang dapat menginisiasi proses transkripsi dan translasi. Setelah protein polimerasi-T7 terbentuk, protein tersebut akan mengikat T7 promoter yang terdapat pada plasmid *pET-21a(+)* sehingga protein JSU yang disandi oleh gen *env-su* akan terekspresi (Yang *et al.*, 2015; Nurjayadi *et al.,* 2018).

Validasi hasil pemotongan enzim retriksi endonuklease dan tahapan selanjutnya dalam memproduksi protein rekombinan JSU dari gen *env-su* secara *in silico* perlu dilakukan penelitian lanjut dengan *in vitro* dan *in vivo* untuk memastikan keamanan dan potensi kandidat vaksin yang diprediksi (Ullah *et al.*, 2020). Meskipun dari penelitian uji *in silico* menghasilkan prediksi yang bagus, tetapi belum tentu ketika dilakukan secara uji *in vitro* dan *in vivo* berbanding lurus dengan hasil *in silico*, karena terdapat berbagai faktor yang dapat mempengaruhi hasil akhir penelitian yang diharapkan.

**SIMPULAN**

Protein JSU yang dikodekan oleh gen *env-su* JDV berpotensi sebagai kandidat vaksin penyakit Jembrana berdasarkan hasil nilai *percent identity* *sequence alignment* dengan protein SU *s*pesies lainnya pada genus *Lentivirus* kurang dari 30%.Hasil optimasi kodon menunjukkan peningkatan nilai CAI dan kandungan GC serta menurunkan nilai ENc dan kandungan AT pada kodon gen *env-su* JDV, sehingga mengurangi bias kodon dan meningkatkan hasil ekspresi protein rekombinan JSU secara *in silico*

**UCAPAN TERIMA KASIH**

Terima kasih kepada Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia yang telah mengizinkan dan membantu terlaksananya penelitian skripsi

**DAFTAR PUSTAKA**

Akhsani, F., Hamidy, A., Farajallah, A., & Smith, E. N. (2017). Hubungan Filogenetik Phrynella pulchra Boulenger, 1887 berdasarkan Gen 16S rRNA. *Zoo Indonesia*, *26*(2), 107–115.

Ali, M. (2015). Upaya Pengembangan Teknologi Cepat Transkripsi dan Translasi In Vitro dalam Sintesis Vaksin di Indonesia. *Wartazoa*, *25*(4), 181–188.

Astiti, N. M. A. G. R. (2018). *Sapi Bali dan Pemasarannya*. Warmadewa University Press.

Barahimipor, R., Strenkert, D., Neupert, J., Schroda, M., Merchant, S. S., & Bock, R. (2015). Dissecting the Contributions of GC Content and Codon Usage to Gene Expression in the Model Alga Chlamydomonas reinhardtii. *Plant Journal*, *84*(4), 704–717.

Bartak, P., Simek, B., Vaclavek, P., Curn, V., Plodkova, H., Tonka, T., Farková, B., Vernerová, K., & Vejčík, A. (2018). Genetic Characterisation of Small Ruminant Lentiviruses in Sheep and Goats from The Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno*, *87*(1), 19–26.

Behura, S. K., & Severson, D. W. (2012). Comparative Analysis of Codon Usage Bias and Codon Context Patterns between Dipteran and Hymenopteran Sequenced Genomes. *Plos One*, *7*(8), 1–11.

Berata, I. K. (2009). Umur Sapi Bali Berpengaruh pada Respon Kekebalan Seluler terhadap Virus Penyakit Jembrana Pasca Vaksinasi. *Majalah Ilmiah Peternakan*, *12*(3), 1–13.

Bu’ulolo, I. C., Simamora, N., Tampubolon, S., & Pinem, A. (2010). Sequence Alignment Menggunakan Algoritma Smith Waterman. *Seminar Nasional Politeknik Batam*, *2*(2), 2–7.

Chadwick, B. J., Coelen, R. J., Wilcox, G. E., Sammels, L. M., & Kertayadnya, G. (1995). Nucleotide Sequence Analysis of Jembrana Disease Virus: a Bovine Lentivirus Associated with an Acute Disease Syndrome. *Journal of General Virology*, *76*, 1637–1650.

Choiriyah, U., Nurjayadi, M., & Dewi, F. K. (2013). Subkloning dan Ekspresi Gen Fim-C S. Typhimurium. *Jurnal Riset Sains Dan Kimia Terapan*, *3*(2), 280–291.

Courel, M., Clément, Y., Bossevain, C., Foretek, D., Cruchez, O. V., Yi, Z., Bénard, M., Benassy, M. N., Kress, M., Vindry, C., Ernoult-Lange, M., Antoniewski, C., Morillon, A., Brest, P., Hubstenberger, A., Crollius, H. R., Standart, N., & Weil, D. (2019). Gc Content Shapes mRNA Storage and Decay in Human Cells. *ELife*, *8*, 1–32.

Endo, T., Ogishima, S., & Tanaka, H. (2003). Standardized Phylogenetic Tree: A Reference to Discover Functional Evolution. *Journal of Molecular Evolution*, *57*(1), S174–S181.

GenScript. (2019). *Gene Synthesis Handbook (4th ed)*. GenScript USA Inc.

Glick, B. R., Pasternak, J. ., & Patten, C. (2010). *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA (4th ed)*. ASM Press.

Gun, L., Yumiao, R., Haixian, P., & Liang, Z. (2018). Comprehensive Analysis and Comparison on The Codon Usage Pattern of Whole Mycobacterium tuberculosis Coding Genome from Different Area. *Biomed Research International*, *2018*(2), 1–8.

Gustiananda, M. (2011). Immunoinformatics Analysis of H5N1 Proteome for Designing an Epitope-derived Vaccine and Predicting the Prevalence of Pre-existing Cellular-mediated Immunity Toward Bird Flu Virus in Indonesian Population. *Immunome Research*, *7*(3), 1–11.

Hidayat, T., Hidayat, O. T., & Pancoro, A. (2008). Kajian Filogenetika Molekuler dan Peranannya dalam Menyediakan Informasi Dasar untuk Meningkatkan Kualitas Sumber Genetik Anggrek. *Jurnal AgroBiogen*, *4*(1), 35–40.

Indriawati, I., Margawati, E. T., & Ridwan, M. (2013). Identifikasi Virus Penyakit Jembrana pada Sapi Bali Menggunakan Penanda Molekuler Gen env SU. *Berita Biologi*, *12*(2), 211–216.

Kusumaningsih, P. (2018). *Evaluasi Konstruksi DNA Da+Lam Vektor Plasmid Berkaitan dengan Ekspresi Protein Rekombinan Rophtry-1 (ROP1) Toxoplasma Gondii pada Eschericia coli*. Universitas Dhyana Pura Bali.

Kusumawati, A., Tampubolon, I. D., Hendarta, N. Y., Salasia, S. I. O., Wanahari, T. A., Mappakaya, B. A., & Hartati, S. (2015). Use of Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification Combined with Lateral Flow Dipstick for an easy and Rapid Detection of Jembrana Disease Virus. *Virus Disease*, *26*(3), 189–195.

Lanza, A. M., Curran, K. A., Rey, L. G., & Alper, H. S. (2014). A Condition-Specific Codon Optimization Approach for Improved Heterologous Gene Expression in Saccharomyces cerevisiae. *BMC Systems Biology*, *8*(1), 1–10.

Liu, B., Kong, Q., Zhang, D., & Yan, L. (2018). Codon Optimization Significantly Enhanced the Expression of Human 37-kDa iLRP in Escherichia coli. *3 Biotech*, *8*(4), 1–7.

Maksum, I. P., Utama, E., & Subroto, T. (2017). Extracellular Secretion of Recombinant Human Epidermal Growth Factor by Using Trimethylamine N-Oxide Reductase A (TORA) Signal Peptide in Escherichia Coli BL21 (DE3). *Jouranl of Pharmaceutical Sciences and Research*, *9*(6), 1007–1016.

Maksum, I., Sriwidodo, & Yosua. (2019). *Strategi Peningkatan Ekspresi Protein Rekombinan Secara Intraselular pada Inang Escherichia coli*. Universitas Padjajaran.

Mardiatmi, M. (2015). *Pedoman Pengendalian dan Penanggulangan Penyakit Jembrana*. Direktorat Kesehatan Hewan.

Margawati, E. T., Utama, A., & Indriawati. (2006). *Re-konstruksi Jembrana Tat (J-Tat) ke dalam plasmid pET-21b mengandung 6 his-tag*. Prosiding Seminar Nasional Bioteknologi 2006.

Mauro, V. P., & Chappell, S. A. (2014). NIH Public Access. *Trends in Molecular Medicine*, *20*(11), 604–613.

Mega, O., Sumantri, C., Arief, I. I., & Budiman, C. (2019). Ekspresi Gen Lon-like Protease dari Lactobacillus plantarum IIA-1A5 pada Escherichia coli BL21(DE3). *Jurnal Agripet*, *19*(2), 149–158.

Nurjayadi, M., Chairinnisa, I. I., Mentari, G. P., Hardianto, D., Sulfianti, A., & Agustini, K. (2018). Pengaruh Jumlah Inokulum Sel Inang Bakteri E.coli BL21 (DE3) pLysS dan Waktu Overekspresi pada Produksi Protein Rekombinan Fim-C Salmonella typhi. *Jurnal Kimia VALENSI: Jurnal Penelitian Dan Pengembangan Ilmu Kimia*, *4*(2), 98–106.

Pearson, W. R. (2014). An Introduction to Sequence Similarity (“Homology”) Searching. *Current Protocols Bioinformatics*, *42*(1), 1–9.

Priyatno, T. P., Winangsih, F., Manzila, I., & Bintang, M. (2019). Ekspresi dan Karakterisasi β-1,3-Glukanase Rekombinan dari Burkholderia cepacia (BiogenCC E76) yang Diekspresikan dalam Sistem Ekspresi Escherichia coli. *Jurnal AgroBiogen*, *15*(1), 35–44.

Puigbo, P., Bravo, I. G., & Garcia-Vallve, S. (2008). CAIcal: A Combined Set of Tools to Assess Codon Usage Adaptation. *Biology Direct*, *3*(38), 1–8.

Quax, T. E. F., Claassens, N. J., Soll, D., & Oost, J. Van Der. (2015). Codon Bias as a Means to Fine-Tune Gene Expression Tessa. *Mol Cell*, *59*(2), 149–161.

Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant Protein Expression in Escherichia coli: Advances and Challenges. *Frontiers in Microbiology*, *5*(172), 1–17.

Salim, H. M. W., & Cavalcanti, A. R. O. (2008). Factors Influencing Codon Usage Bias in Genomes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *19*(2), 257–262.

Shirasawa, K., Hirakawa, H., & Isobe, S. (2016). Analytical Workflow of Double-Digest Restriction Site-Associated DNA Sequencing based on Empirical and In Silico Optimization in Tomato. *DNA Research*, *23*(2), 145–153.

Silaban, S., Maksum, I. ., Hasan, K., Enus, S., Subroto, T., & Soemitro, S. (2017). Pemurnian Pretrombin-2 Manusia Rekombinan di Escherichia coli untuk Produksi Trombin sebagai Komponen Lem Fibrin. *Jurnal Pendidikan Kimia*, *9*(1), 267–272.

Silaban, S., Maksum, I. P., Enus, S., Hasan, K., Subroto, T., & Soemitro, S. (2016). Kajian Ekspresi Gen Pretrombin-2 Manusia Sintetik pada Escherichia coli Secara In Silico Untuk Produksi Trombin sebagai Komponen Lem Fibrin. *Jurnal Pendidikan Kimia*, *8*(1), 58–64.

Silaban, S., Maksum, I. P., Gaffar, S., Enus, S., Hasan, K., Subroto, T., & Soemitro, S. (2017). Desain, Optimasi, dan Kloning Gen Pretrombin-2 sintetik untuk Produksi Trombin sebagai Komponen Lem Fibrin. *Jurnal Ilmiah Ilmu Dan Teknologi Kimia*, *1*(1), 69–81.

Sunarto, A. A. (2015). Perbandingan Program Sequence Alignment. *Jurnal Rekayasa Nusaputra*, *1*(1), 1–5.

Susmiarsih, T. P. (2018). Kajian DNA Rekombinan pada Vaksin DNA dan Vaksin Subunit Protein. *Majalah Kesehatan PharmaMedika*, *10*(2), 108–128.

Suwiti, N. K. (2009). Fenomena Jembrana Disease dan Bovine Immunodeficiency Virus pada Sapi Bali. *Buletin Veteriner Udayana*, *1*(1), 21–25.

Thenawidjaja, M., Ismaya, W. T., & Retnoningrum, D. S. (2017). *Protein; Serial Biokimia Mudah dan Menggugah*. Grasindo.

Uddin, A. (2017). Indices of Codon Usage Bias. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, *10*(6), 4172.

Ullah, M. A., Sarkar, B., & Islam, S. S. (2020). Exploiting the Reverse Vaccinology Approach to Design Novel Subunit Vaccines Against Ebola Virus. *Immunobiology*, *225*(3), 1–80.

Valas, S., Benoit, C., Guionaud, C., Perrin, G., & Mamoun, R. Z. (1997). North American and French Caprine Arthritis-Encephalitis Viruses Emerge from Ovine Maedi-Visna Viruses. *Virology*, *318*(237), 307–318.

Wang, L., & Reeves, P. R. (2000). The Escherichia coli O111 and Salmonella enterica O35 Gene Clusters : Gene Clusters Encoding the Same Colitose-Containing O Antigen Are Highly Conserved. *Journal of Bacteriology*, *182*(18), 5256–5261.

Wang, Y., Cao, X., Zhao, Y., Fei, J., Hu, X., & Li, N. (2017). Optimized Double-Digest Genotyping by Sequencing (ddGBS) Method with Highdensity SNP Markers and High Genotyping Accuracy for Chickens. *PLoS ONE*, *12*(6), 1–19.

Widayat, T., & Subositi, D. (2009). Kekerabatan Filogenetik Buah Makassar (Brucea javanica) berdasarkan Gen Ribulosa-1,5-BifosfaT Karboksilase/ Oksigenase. *Journal Penelitian*, *2*(2), 1–8.

Widiyanti, N. L. P. ., Suata, K., Astawa, N. ., & Hartaningsih. (2009). Respon Antibodi Antikapsid pada Mencit yang Divaksin Vaksin Limpa dan Vaksin Kultur Virus Penyakit Jembrana. *Jurnal Veteriner*, *10*(2), 57–62.

Wiyatna, M. F. (2007). Perbandingan Indek Perdagingan Sapi-sapi Indonesia (Sapi Bali, Madura, PO) dengan Sapi Australian Commercial Cross (ACC). *Jurnal Ilmu Ternak*, *7*(1), 22–25.

Yang, X., Chen, B., Cai, Y., & Tseng, C. (2015). Understanding The Lac Operon with GeneAct. *International Journal of Computational Biology and Drug Design*, *8*(2), 168–188.

Yulita, D. S., Polosoro, A., Sisharmini, A., Apriana, A., Nurilmala, F., & Trijatmiko, R. (2020). Konstruksi Vektor Biner dan Transformasi Gen LcCsp Sintetis ke dalam Genom Padi Nipponbare dengan Bantuan Agrobacterium tumefaciens. *Jurnal AgroBiogen*, *16*(1), 25–34.

Zein, M. S. A., & Sulandari, S. (2009). Investigasi Asal Usul Ayam Indonesia menggunakan Sekuens Hypervariable-1 D-loop DNA Mitokondria. *Jurnal Veteriner*, *10*(1), 41–49.

Zhou, H., Ning, L., Zhang, H., & Guo, F. (2014). Analysis of the Relationship between Genomic GC Content and Patterns of Base Usage , Codon Usage and Amino Acid Usage in Prokaryotes : Similar GC Content Adopts Similar Compositional Frequencies Regardless of the Phylogenetic Lineages. *Plos One*, *9*(9), 1–7.