

JURNAL METAMORFOSA

Journal of Biological Sciences

eISSN: 2655-8122

<http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>

Monitoring DNA Provirus Virus Penyakit Jembrana Pada Sapi Bali Dengan Metode PCR

Monitoring Proviral DNA Of Jembrana Disease Virus In Bali Cattle Using PCR

Ni Putu Eka Krisnayanti¹, Made Pharmawati^{1*}, Inna Narayani¹, Ni Luh Putu Agustini²

¹ Program Studi Biologi, FMIPA, Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran, Badung, Bali

² Balai Besar Veteriner Denpasar, Jl. Raya Sesetan No. 266, Sesetan, Denpasar, Bali

*Email: made_pharmawati@unud.ac.id

INTISARI

Perkembangan bioteknologi dalam bidang molekuler memungkinkan untuk mendeteksi keberadaan suatu penyakit lebih awal, lebih cepat dan akurat. Salah satu teknik dalam bioteknologi yang sudah sangat berkembang serta sering dimanfaatkan dalam penelitian biologi dan medis adalah metode PCR. Teknik molekuler ini memungkinkan untuk identifikasi secara akurat pada tingkat DNA terhadap keberadaan suatu penyakit tertentu. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan monitoring adanya DNA provirus virus penyakit Jembrana pada sapi bali dari beberapa kabupaten/kota di Bali. Sampel berupa darah sapi bali yang diambil pada tahun 2017 dari beberapa kabupaten/kota di Bali sebanyak 170 sampel dan pada tahun 2018 dari Kabupaten Buleleng sebanyak 101 sampel dan Kabupaten Karangasem sebanyak 152 sampel. DNA diekstrak menggunakan *QIAamp DNA blood mini kit* dan sampel tahun 2017 dibuat menjadi 34 *pool* sampel, sedang sampel tahun 2018 dibuat menjadi 20 *pool* sampel (Kabupaten Buleleng) dan 30 *pool* sampel (Kabupaten Karangasem). PCR dilakukan menggunakan primer JDV 1 dan JDV 3 dalam total reaksi 25 μ L dengan 35 siklus. PCR juga dilakukan terhadap kontrol positif dan kontrol negatif. Hasil menunjukkan bahwa ke-34 *pool* sampel sapi bali yang diambil tahun 2017 maupun 20 *pool* sampel dan 30 *pool* sampel dari tahun 2018 tidak menunjukkan adanya DNA provirus virus penyakit Jembrana.

Kata kunci: PCR, DNA Provirus, Virus Penyakit Jembrana

ABSTRACT

The development of biotechnology in molecular field make it possible to detect the presence of a disease earlier, faster and more accurately. One of the technique in biotechnology which has been highly developed and often be used in biological and medical research is PCR method. This molecular technique allows to accurately identify the DNA level in presence of a particular disease. This study aims to do monitoring the presence of proviral DNA Jembrana Disease Virus in bali cattle from several regencies/city in Bali. The blood samples of bali cattle is taken from several regencies/city in Bali in 2017 as many 170 samples and in 2018 from Buleleng Regency there are 101 samples and form Karangasem Regency 152 samples. DNA is extracted by *QIAamp DNA blood mini kit* and samples from 2017 is made to 34 *pool* samples, whereas samples from 2018 is made to 20 *pool* samples (Buleleng Regency) and 30 *pool* samples (Karangasem Regency). PCR is conducted by JDV 1 primer and JDV 3 primer in total reaction 25 μ L with 35 cycles. PCR is also conducted on positive control and negative control. The result indicate that 34 *pool* samples of bali cattle from 2017 or 20 *pool* samples and 30 *pool* samples from 2018 is not indicate the presence of proviral DNA Jembrana Disease Virus.

Keyword: PCR, Proviral DNA, Jembrana Disease Virus

PENDAHULUAN

Perkembangan bioteknologi dalam bidang molekuler telah melahirkan suatu terobosan di bidang medis yang memungkinkan untuk mendeteksi keberadaan suatu penyakit lebih awal, lebih cepat dan akurat. Dengan demikian tindakan pencegahan dapat dilakukan secara cepat untuk menghindari terjadinya penyebaran penyakit serta untuk menghindari kematian (Indriawati dkk., 2013). Salah satu teknik dalam bioteknologi yang sudah sangat berkembang serta sering dimanfaatkan dalam penelitian biologi dan medis adalah metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Metode PCR memungkinkan untuk mengidentifikasi secara akurat pada tingkat DNA terhadap keberadaan suatu penyakit tertentu (Erlich, 1989). Teknologi ini salah satunya telah dimanfaatkan untuk identifikasi penyakit Jembrana pada sapi bali yang dilakukan di Laboratorium Bioteknologi BBVet Denpasar. BBVet Denpasar merupakan instansi yang berperan dalam pengendalian dan penanggulangan penyakit Jembrana pada ternak sapi bali (Mardiatmi dkk., 2015).

Penyakit Jembrana merupakan penyakit berbahaya yang menyerang ternak sapi bali dan pertama kali ditemukan di Bali. Penyakit Jembrana ini (*Jembrana Disease = JD*) disebabkan oleh virus penyakit Jembrana (*Jembrana Disease Virus = JDV*) yang termasuk dalam kelompok retrovirus dari subfamili *Lentivirinae* (virus penyebab turunya daya kekebalan tubuh). Penyakit Jembrana pertama kali dilaporkan pada tahun 1964 di Kabupaten Jembrana, dikenal dengan nama Lentivirus sapi dan menyebabkan kematian pada ternak sapi bali serta aborsi pada sapi betina yang sedang hamil. Kematian ternak akibat virus penyakit Jembrana dapat terjadi pada 1 atau 2 minggu setelah infeksi (Wilcox *et al.*, 1997).

Gejala-gejala klinis yang timbul akibat infeksi virus ini adalah adanya demam tinggi hingga mencapai 42°C yang berlangsung selama 5-12 hari, pembengkakan kelenjar limfe prescapularis, prefemoralis, parotis, serta diikuti dengan diare berdarah. Selain itu gejala akut yang terlihat akibat dari penyakit Jembrana

adalah adanya bercak-bercak darah pada kulit (keringat darah), hipersalivasi, leleran lendir bening, erosi selaput lendir mulut, keputihan selaput lendir mulut, mata dan alat kelamin (Kertayadnya *et al.*, 1993; Hartaningsih, 2005). Penyakit Jembrana dapat menyebabkan kematian pada sapi bali akibat infeksi oportunistik karena sistem kekebalan tubuh yang menurun, sehingga tubuh menjadi sangat rentan dan mudah terserang penyakit (Hilmiazi dan Muzani, 2010; Hartaningsih, 2005).

Virus Jembrana memasuki sel target dengan menempel di permukaan sel melalui reseptor, kemudian melepas pembungkusnya di dalam sitoplasma. Genom virus yang berupa RNA mengalami transkripsi balik menjadi DNA di dalam sitoplasma. Enzim *reverse transcriptase* membuat DNA utas tunggal komplementer terhadap RNA virus. Enzim RNase-H selanjutnya akan mendegradasi RNA virus dan menggantinya dengan mensintesis DNA utas kedua, sehingga terbentuk *double stranded DNA*. DNA virus akan bermigrasi dari sitoplasma ke nukleus, dan enzim integrase akan mengintegrasikan DNA virus ke dalam DNA sel inang membentuk provirus. Proses transkripsi akan berlangsung di dalam tubuh sel inang membentuk mRNA yang selanjutnya bertanggung jawab atas sintesis protein virus dan digunakan untuk perakitan bagian-bagian tubuh virus yang baru. Provirus yang terbentuk akan tetap berada di dalam tubuh sapi, dan sapi tersebut akan menjadi hewan pembawa (*carrier*). Apabila sapi *carrier* ini dalam kondisi tidak sehat serta kekebalan humoral mulai menurun, diduga bahwa cDNA virus dapat berubah menjadi aktif kembali dan dapat menginfeksi hewan di sekitarnya (Mardiatmi dkk., 2015).

Berdasarkan hal tersebut, deteksi awal terhadap penyakit Jembrana pada sapi bali penting dilakukan untuk menghindari terjadinya kematian pada sapi bali dan untuk perbaikan mutu genetik sapi bali (Agustini, 2011; Mardiatmi dkk., 2015). Tujuan penelitian ini adalah untuk memonitor adanya DNA provirus virus penyakit Jembrana pada sapi bali dari beberapa kabupaten/kota di Bali.

BAHAN DAN METODE

Sampel yang digunakan ini merupakan sampel aktif, yaitu sampel yang diambil langsung dari lapangan untuk survailans rutin oleh BBVet Denpasar pada tahun 2017 di beberapa kabupaten/kota yang ada di Bali dan tahun 2018 di Kabupaten Buleleng serta di Kabupaten Karangasem (Tabel 1). Sampel berupa PBMC *Peripheral Blood Mononuclear Cells*). Sampel tahun 2017 (170 sampel), dan dibuat menjadi 34 *pool* sampel dengan no Epi 06171958 (Tabel 1). Sampel tahun 2018 dari Kabupaten Buleleng berjumlah 101 yang dibuat menjadi 20 *pool* dengan no Epi A06180319 dan sampel dari Kabupaten Karangasem berjumlah 152 sampel yang dibuat menjadi 30 *pool* dengan no Epi A06180869 (Tabel 1). *Pool* sampel dibuat dengan penggabungan 5 sampel PBMC (kecuali *pool* 20 untuk Epi A06180319 serta *pool* 29 dan 30 untuk Epi A06180869 terdiri dari 6 sampel) ke dalam 1 *microtube* ukuran 2 mL, masing-masing sampel PBMC diambil sebanyak 0,5 μ L sehingga volume untuk 1 *pool* sampel menjadi 2,5 μ L (untuk *pool* yang terdiri dari 5 sampel) dan 3 μ L (untuk *pool* yang terdiri dari 6 sampel). Apabila salah satu *pool* sampel hasilnya positif, maka akan dilakukan pengujian lebih lanjut terhadap kelima atau keenam sampel yang dimasukkan ke dalam *pool* tersebut. *Pool* sampel ini bertujuan untuk efisiensi pengujian karena mengingat bahan-bahan yang digunakan dalam PCR.

Proses ekstraksi DNA dilakukan sesuai dengan protokol dari *QIAamp DNA blood mini kit* (Qiagen). Sampel PBMC ditambahkan proteinase K sebanyak 20 μ L dan buffer AL sebanyak 200 μ L, selanjutnya dihomogenkan dengan cara divortex. Sampel-sampel selanjutnya diinkubasi dalam penangas air pada suhu 56°C selama 10 menit. Setelah diinkubasi, disentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit, lalu ditambahkan etanol sebanyak 200 μ L, kemudian divortex, dan disentrifuse kembali dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Campuran dipipet sebanyak 800 μ L dan dimasukkan ke dalam *QIAamp spin colum* yang sudah disangga oleh 2 mL *collection tubes*, lalu disentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm selama

1 menit. *Collection tubes* yang berisi filtrat dibuang, dan *QIAamp spin column* diletakkan pada 2 mL *collection tubes* yang baru. Buffer AW1 ditambahkan sebanyak 500 μ L, disentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit, kemudian *collection tubes* yang berisi filtrat dibuang dan diganti dengan yang baru. Selanjutnya ditambahkan buffer AW2 sebanyak 500 μ L, disentrifuse dengan kecepatan 14000 rpm selama 4 menit, *collection tubes* dibuang dan diganti dengan *microtube* ukuran 2 mL yang baru. Terakhir, ditambahkan 200 μ L buffer AE, diinkubasi pada suhu ruangan selama 5 menit dan disentrifuge 8000 rpm selama 1 menit. *QIAamp spin colum* dibuang, dan DNA filtrat yang tertampung dalam *microtube* disimpan pada suhu -20°C.

PCR dilakukan dalam total volume reaksi 25 μ L yang terdiri dari 8,5 μ L *Nuclease Free Water*, 12,5 μ L *green master mix*, 1 μ L *Forward primer* (JDV 1) dengan sekuen 5'GCAGCGGAGGTGGCAATTTTGATAGG A 3', 1 μ L *Reverse primer* (JDV 3) dengan sekuen 5' CGGCGTGGTGGTCCACCCCATG 3' (Chadwick *et al.*, 1995), serta 2 μ L DNA *template* sampel. Selain menggunakan DNA *template* dari sampel yang diuji, dalam uji PCR ini juga digunakan kontrol positif (DNA *template* yang positif virus penyakit Jembrana) dan kontrol negatif (DNA *template* yang negatif virus penyakit Jembrana) sebagai pembanding hasil.

Proses amplifikasi PCR berlangsung dalam mesin *thermal cycler* yang sudah deprogram sebagai berikut: *pradenaturasi* pada suhu 94°C selama 5 menit dan 35 siklus *denaturasi* pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 66°C selama 1 menit, pemanjangan (*ekstensi*) pada suhu 72°C selama 1,5 menit dan pada akhir siklus diprogramkan tambahan 72°C selama 10 menit dan 4°C selama 15 menit.

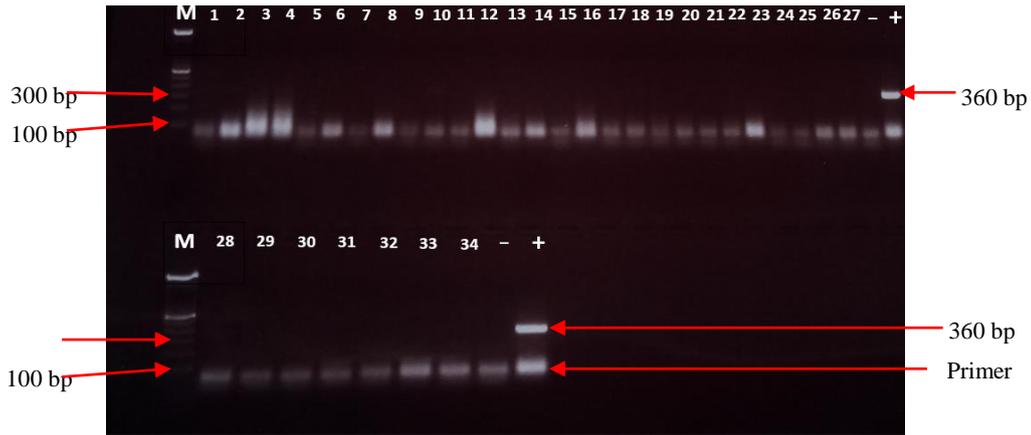
Produk amplifikasi selanjutnya dielektroforesis dalam 2% gel agarosa dalam *buffer* TAE (Tris-asetat-EDTA), dan ditambahkan dengan *ethidium bromide* untuk visualisasi hasil. Proses elektroforesis berlangsung selama 45 menit dengan voltase 100V. Setelah dielektroforesis, gel agarosa

tersebut kemudian divisualisasi dengan sinar UV di dalam mesin GelDoc.

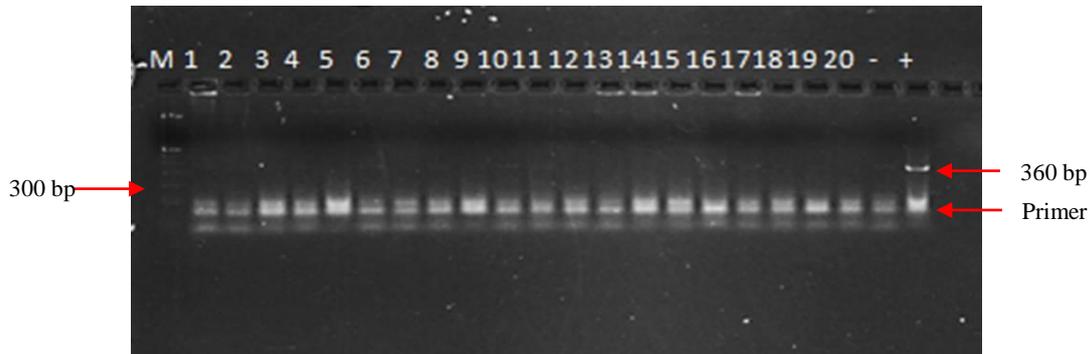
HASIL

Analisis PCR pada 34 *pool* sampel yang diambil pada tahun 2017, setelah dilakukan elektroforesis dan visualisasi dengan penyinaran UV menunjukkan hasil yang negatif. Hasil ini dapat diamati pada Gambar 1. Hasil yang sama

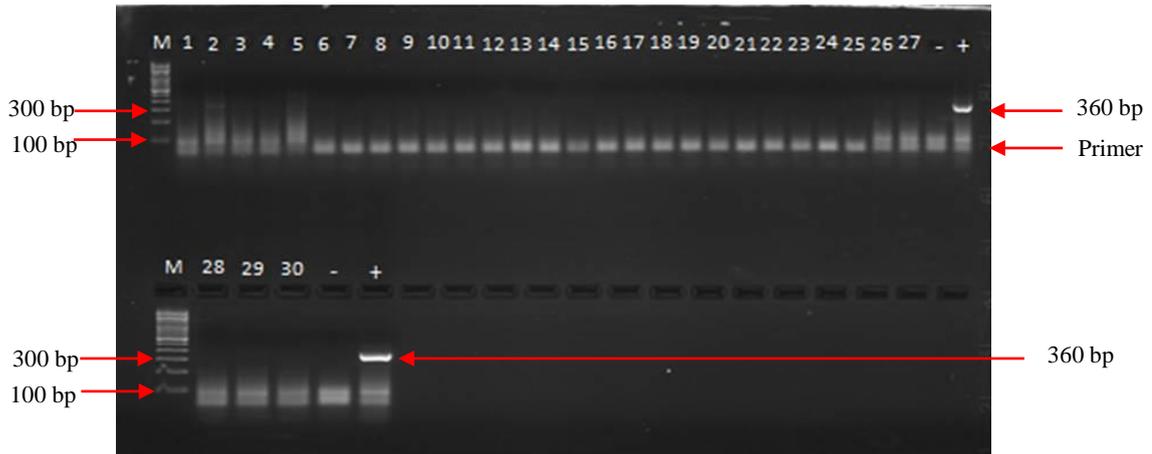
juga diperoleh untuk sampel yang diambil di tahun 2018 yang berasal dari Kabupaten Buleleng (Gambar 2) dan Kabupaten Karangasem (Gambar 3).



Gambar 1. Hasil PCR terhadap 34 *pool* sampel PBMC sapi bali yang diambil di tahun 2017 dari beberapa kabupaten/kota di Bali
Keterangan: M: marker 100 bp; 1-34: *pool* sampel; +: kontrol positif (DNA *template* yang positif virus penyakit Jembrana); -: kontrol negatif (DNA *template* yang negatif virus penyakit Jembrana)



Gambar 2. Hasil PCR terhadap 20 *pool* sampel PBMC sapi bali yang diambil di tahun 2018 dari Kabupaten Buleleng
Keterangan: M: marker 100 bp; 1-20 : *pool* sampel; +: kontrol positif (DNA *template* yang positif virus penyakit Jembrana); -: kontrol negatif (DNA *template* yang negatif virus penyakit Jembrana)



Gambar 3. Hasil PCR terhadap 30 *pool* sampel PBMC sapi bali yang diambil di tahun 2018 dari Kabupaten Karangasem

Keterangan: M: marker 100 bp; 1-30: *pool* sampel; +: kontrol positif (DNA *template* yang positif virus penyakit Jembrana); -: kontrol negatif (DNA *template* yang negatif virus penyakit Jembrana)

Tabel 1. Sampel Darah Sapi Bali yang Diuji dan Jumlah Positif Virus Jembrana

No	Tahun	Kabupaten/Kota	Desa/Kelurahan	Jumlah Sampel	Jumlah Pool	No Epi	Jumlah Positif
1	2017	Buleleng	Bebetin	30	6	06171958	0
2	2017	Tabanan	Batungsel	10	2	06171958	0
3	2017	Badung	Pelaga	20	4	06171958	0
4	2017	Gianyar	Taro	20	4	06171958	0
5	2017	Denpasar	Padangsambian	10	2	06171958	0
6	2017	Klungkung	Gelgel	30	6	06171958	0
7	2017	Karangasem	Seraya Barat	10	2	06171958	0
8	2017	Jembrana	Cupel	40	8	06171958	0
Total				170	34		0
9	2018	Buleleng	Bubunan	101	20	A06180319	0
10	2018	Karangasem	Seraya	152	30	A06180869	0
Total				253	50		0

PEMBAHASAN

DNA yang diekstraksi dalam metode ini berasal dari PBMC sapi bali. PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) adalah komponen sel darah putih yang berinti bulat dan berperan penting dalam melawan infeksi (limfosit, monosit, dan makrofag) (Hartaningsih, 2002). Sel yang menjadi target infeksi dari virus penyakit Jembrana adalah sel limfosit, sehingga untuk mendeteksi keberadaan DNA provirus virus penyakit Jembrana dapat dilakukan dengan mengekstraksi DNA dari PBMC (Tenaya dkk., 2003).

Pengujian terhadap adanya DNA provirus virus penyakit Jembrana pada darah sapi bali dilakukan dengan menggunakan PCR dengan primer spesifik yang mengamplifikasi DNA provirus Virus Penyakit Jembrana. Pada proses PCR, juga disertakan kontrol negatif berupa *template* DNA yang negatif virus penyakit Jembrana dan kontrol positif berupa *template* DNA yang positif virus penyakit Jembrana. Seperti terlihat pada Gambar 1, kontrol negatif tidak memunculkan hasil amplifikasi, demikian pula *pool* sampel 1 sampai *pool* 34. Hal yang sama teramati untuk sampel yang diambil pada

tahun 2018 dari Kabupaten Buleleng (20 *pool* sampel) dan Karangasem (30 *pool* sampel). Semua sampel yang diuji tidak mengandung DNA provirus virus penyakit Jembrana, sehingga tidak ada DNA target yang teramplifikasi. Pada kontrol positif terdapat amplicon dengan panjang fragmen 360 bp.

Penelitian sebelumnya, melaporkan bahwa pasangan primer JDV 1(5' GCAGCGGAGGTGGCAATTTTGATAGGA 3') dan JDV 3 (5' CGGCGTGGTGGTCCACCCCATG 3') mengamplifikasi fragmen DNA berukuran 360 bp pada *gag open reading frame* (Chadwick *et al.*, 1995, Desport *et al.*, 2007, Lewis *et al.*, 2009). Pita DNA dengan panjang yang sama diperoleh pada kontrol positif pada penelitian ini.

Pada Gambar 1, terdapat pita DNA yang berada pada posisi di bawah 100 bp. Pita ini adalah *primer dimer* yang dapat terbentuk karena terjadi hibridisasi antara basa primer yang berkomplemen, kemudian diperpanjang oleh DNA polimerase dengan mengikat bagian yang berkomplemen tersebut. Konsentrasi primer yang tinggi juga dapat menyebabkan *mispripping* (penempelan pada tempat yang tidak spesifik) sehingga terjadi akumulasi produk nonspesifik (Sulistyaningsih, 2007; Yuryev, 2007).

Primer yang digunakan (JDV 1 dan JDV 3) bersifat sangat spesifik, yaitu mampu membedakan antara proviral DNA JDV (*Jembrana Disease Virus*) dan BIV (*Bovine Immunodefisiensi Virus*). PCR juga dapat mendeteksi adanya proviral DNA pada saat hewan klinis, maupun setelah hewan sembuh (*carrier*) (Agustini dkk., 2017).

Monitoring dengan teknik PCR sebelumnya dilakukan pada tahun 2013, dengan sampel dari seluruh kabupaten di Bali dan dari Balai Perbibitan Ternak Unggul Sapi Bali (BPTU) Pulkan. Hasil menunjukkan bahwa dari 4276 sampel, tidak terdeteksi virus penyakit Jembrana (Agustini dkk., 2014). Pada tahun 2015, hasil monitoring dengan teknik yang sama terhadap 4432 sampel dari seluruh kabupaten di Bali, menunjukkan hasil negatif terhadap adanya virus penyakit Jembrana

(Agustini dkk., 2016). Hasil yang sama juga diperoleh pada monitoring tahun 2016, yaitu tidak munculnya pita DNA hasil amplifikasi dari 20721 sampel darah (Agustini dkk., 2017),

Di Provinsi Bali, kasus penyakit Jembrana yang dilaporkan terakhir adalah pada tahun 2005 di Desa Pecatu, Kecamatan Kuta Selatan Kabupaten Badung. Tidak terdapat laporan kasus penyakit Jembrana selama tahun 2006-2013 (Agustini dkk., 2015). Upaya pencegahan penyakit Jembrana salah satunya adalah dengan vaksinasi. Dinas Peternakan Provinsi Bali telah melakukan vaksinasi Jembrana menggunakan vaksin JD Vacc Sp 15, produksi Balai Besar Veteriner Denpasar dari tahun 2001-2004. Vaksinasi penyakit Jembrana dilakukan kembali pada tahun 2012-2014 menggunakan vaksin JD VET produksi Pusat Veteriner Farma (Pusvetma) Surabaya (Agustini dkk., 2015).

Hasil PCR yang negatif virus Jembrana pada penelitian ini, serta hasil monitoring pada tahun 2013 dan 2015 mengindikasikan keberhasilan proses vaksinasi yang dilakukan.

KESIMPULAN

Seluruh sampel yang diuji menunjukkan hasil negatif pada PCR dengan primer spesifik virus Jembrana. Penyakit Jembrana cukup terkendali dengan tidak terdeteksinya virus jembrana pada sampel yang diambil pada tahun 2017 dari beberapa kabupaten/kota di Bali dan sampel yang diambil tahun 2018 dari Kabupaten Buleleng dan Karangasem.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustini, N. L. P. 2011. Survei Serologi dan Molekuler Penyakit Jembrana di Provinsi Bali, Lampung dan Nangro Aceh Darussalam. *Buletin Veteriner, BBVet Denpasar*. 23 (79): 69-76
- Agustini, N. L. P., I N. Dibia, dan D. Mustikawati. 2014. Surveilans Penyakit Jembrana di Provinsi Bali Tahun 2013. *Buletin Veteriner, BBVet Denpasar*. 26 (84)
- Agustini, N. L. P., I W. M. Tenaya, and I K. E. Supartika. 2015. Uji Efikasi Vaksin

- Jembrana. *Buletin Veteriner, BBVet Denpasar*. 27 (86)
- Agustini, N. L. P., D. K. Pradana dan S. E. Melyantono. 2016. Surveilans Penyakit Jembrana di Provinsi Bali Tahun 2015. Laporan Teknis Hasil Surveilans, Monitoring dan Pengembangan Metode Uji Balai Besar Veteriner Denpasar Tahun 2015
- Agustini, N. L. P., D. K. Pradana, E. Puspitasari, I K. Mayun, I N. Mundera, dan I W. Ekaana. 2017. Surveilans dan Monitoring dalam Rangka Upaya Pembebasan Penyakit Jembrana di Provinsi Bali Tahun 2016. Laporan Teknis Hasil Surveilans, Monitoring dan Pengembangan Metode Uji Balai Besar Veteriner Denpasar Tahun 2016
- Chadwick, B. J., R. J. Coelen, G. E. Wilcox, L. M. Sammels dan G. Kertayadnya. 1995. Nucleotide Sequence Analysis of Jembrana Disease Virus: A Bovine Lentivirus Associated with An Acute Disease Syndrome. *Journal of Genetics Virology*. 76: 1637-1650
- Desport, M., M. E. Stewart, A. S. Mikosza, C. A. Sheridan, S. E. Peterson, O. Chavand, N. Hartaningsih, and G. E. Wilcox. 2007. Sequence Analysis of Jembrana Disease Virus Galurs Reveals A Genetically Stable Lentivirus. *Virus Research*. 126: 237-239
- Erlich, H. A. 1989. *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplifications*. Stockton Press, NY
- Hartaningsih, N. 2002. Manual Diagnosa Laboratorik Penyakit Jembrana. Materi Khusus Peningkatan Diagnosis Penyakit Jembrana. Denpasar: ACIAR-BPPV VI
- Hartaningsih, N. 2005. Laporan Hasil Investigasi Penyakit Jembrana di Kalimantan Timur. Laporan Tahunan Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Denpasar
- Hilmiati, Nurul dan A. Muzani. 2010. Jembrana Disease: A Review. Lokakarya Nasional Ketersediaan IPTEK dalam Pengendalian Penyakit Strategis pada Ternak Ruminansia Besar
- Indriawati, E. T. Margawati, dan M. Ridwan. 2013. Identifikasi Virus Penyakit Jembrana pada Sapi Bali Menggunakan Penanda Molekuler Gen *env* SU. *Berita Biologi*. 12 (2): 211-216
- Kertaydnya, G., G. E. Wilcox, S. Soeharsono, N. Hartaningsih, R. J. Coelen, R. D. Cook, and J. Brownlie. 1993. Characteristics of A Retrovirus Associated with Jembrana Disease in Bali Cattle. *Journal of Genetics Virology*. 74: 1765-1773
- Lewis, J., T. McNab, M. Tenaya, N. Hartaningsih, G. Wilcox and M. Desport. 2009. Comparison of Immunoassay and Real-Time PCR Methods for The Detection of Jembrana Disease Virus Infection in Bali Cattle. *Journal of Virological Methods*. 159 (1): 81-86
- Mardiatmi, Yunasri, P. P. Suseno, Y. Yupiana, R. V. Ekowati, W. E. Kurniawan, R. M. B. Butar, Ernawati, Tachori, dan Ermawanto. 2015. Pedoman Pengendalian dan Penanggulangan Penyakit Jembrana. Jakarta: Direktorat Kesehatan Hewan
- Sulistyaningsih, E. 2007. *Polymerase Chain Reaction (PCR): Era Baru Diagnosis dan Manajemen Penyakit Infeksi*. *Biomedis*. 1
- Tenaya, I. W. M., C. K. Ananda, N. Hartaningsih. 2003. Deteksi Proviral DNA Virus Jembrana pada Limposit Sapi Bali dengan Uji *Polymerase Chain Reaction*. *Buletin Veteriner*. 63:44-48
- Wilcox, G. E., S. Soeharsono, D. M. N. Dharma and J. W. Copland. 1997. Jembrana Disease and the Bovine Lentivirus. *ACIAR proceedings*. 75: 10-75
- Yuryev, A. 2007. PCR Primer Design. Santalucia : Humana Press, 21-22