

TINJAUAN PUSTAKA HASIL PENELITIAN MOLEKULER PENYAKIT JEMBRANA SEBAGAI DASAR PENGENDALIAN DAN PEMBERANTASAN

*(Literature Review on Molecular Based Results of Jembrana Disease
as a Consideration For Controlling and Eradication)*

I Wayan Masa Tenaya dan NLP Agustini

Balai Besar Veteriner Denpasar
Jalan Raya Sesetan Nomor 266 Kotak Pos 3322 Denpasar 80223
Email: bbvdps@gmail.com.

ABSTRAK

Berdasarkan Peraturan Menteri Pertanian No.: 4026/Kpts/OT.140/3/2013, penyakit Jembrana (PJ) merupakan salah satu dari 25 penyakit hewan menular strategis yang ada di Indonesia. Sejak munculnya penyakit ini pertama kali di Pulau (P) Bali, sampai saat PJ sudah menyebar ke P. Sumatra dan P. Kalimantan. Secara epidemiologi, sumber penularan PJ adalah hewan terinfeksi pada phase akut maupun phase kronis. Tujuan tinjauan pustaka ini adalah untuk memanfaatkan hasil penelitian berbasis molekuler dalam pengendalian dan pemberantasan penyakit Jembrana di suatu wilayah. Pathogenesis VPJ sangat berbeda dengan virus lenti lainnya, sehingga diperlukan penanganan yang khusus. Pada phase akut, VPJ memproduksi banyak RNA yang berada di luar sel target sehingga mudah ditularkan ke sapi lainnya, namun sebagian disimpan sebagai *proviral-DNA* di dalam inti sel target. Pada phase akut, keberadaan RNA tersebut dapat dideteksi dengan *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) sedangkan *proviral-DNA* dengan *Conventional Polymerase Chain Reaction* (C-PCR). Sebaliknya hewan yang sembuh menjadi hewan *carrier* dan hanya memiliki *proviral-DNA* yang terintegrasi permanen dengan *gen* sapi Bali dan hanya dapat dideteksi dengan C-PCR. Hasil *sequencing* menunjukkan bahwa VPJ di pulau Bali, Sumatra dan Kalimantan mempunyai tingkat kesamaan genetik berturut-turut 100%, 97% dan 95%. Hal ini memperkuat dugaan bahwa VPJ yang ada di luar P. Bali tersebut, berasal dari P. Bali yang dibawa oleh sapi *carrier*. Data ini juga membuktikan bahwa secara genetika VPJ cukup stabil, sehingga sangat menguntungkan upaya vaksinasi karena memiliki homologi proteksi yang tinggi. Dari hasil kajian ini dapat disimpulkan bahwa hewan *carrier* sangat penting diketahui terkait pengendalian/pemberantasan PJ. Di suatu wilayah dengan prosentase hewan *carrier* yang masih tinggi, maka pengendalian dianjurkan dengan vaksinasi. Sebaliknya, di suatu wilayah dengan prosentase *carrier* yang sangat rendah maka dapat dilakukan upaya pembebasan dengan metoda *test and slaughter* terhadap hewan *carrier* tersebut.

Kata Kunci: Penyakit Jembrana, *carrier*, RT-PCR, C-PCR.

ABSTRACT

Based on the regulation later released by the Minister of Agriculture the Republic of Indonesian No.: 4026/Kpts/OT.140/3/2013, Jembrana Disease (JD) was considered as one of the 25 strategic animal diseases. Since it was firstly reported in Bali, JD has spread to the island of Sumatra and Kalimantan. Epidemiologically, carrier animals are considered as source of infection to spread JD during acute and cronic phases. The purpose of the literature review reported here was to implemented molekuler based

reach to control and eradicate JD in certain area. Pathogenesis Jembrana disease Virus (JDV) was significantly different to many other lentivirus infections, therefore special handling strategy is required to manage the disease. During the acute phase, JDV produces extracellular RNA that is easily transfected into susceptible animals and some of the RNAs is stored as proviral-DNA inside the target cells. During this phase, the RNA could be detected using Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) but the proviral-DNA could be detected using the Conventional Polymerase Chain Reaction (C-PCR). In contrast, survived animals become carrier in which they only have proviral-DNA that permanently integrated into host genome of the infected cattle. Sequencing analysis showed that there has been close relation among JDV in Bali, Sumatra and Kalimantan with homology of 100%, 97% and 95% respectively. This condition has confirmed that the origin of JDV was originally from Bali that carried by the carrier animals to Sumatra and Kalimantan via illegal transportation. This data suggested that JDV was highly conserved, which is beneficial associated with the use of vaccine to control the disease. It was concluded that carrier animals are crucial to be considered to control and eradicate JD. Vaccination is strongly recommended to be used in area where population of carrier is still very high but test and slaughter could be applied in area where carrier population is still low.

Kata Kunci: Jembrana disease, carrier, DNA, RNA, RT-PCR, C-PCR.

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit hewan menular strategis (PHMS) diatur dalam pasal 42 UU. No.18/ 2009, dan secara khusus jenis dan jumlahnya diatur sesuai Keputusan Menteri Pertanian No. 4226/2013. Berdasarkan Kementan tersebut ditetapkan ada 25 jenis PHMS (22 yang ada di Indonesia dan 3 bersifat eksotik). Selanjutnya berdasarkan Rapat Koordinasi PHMS Direktorat Kesehatan Hewan tahun 2011, 6 dari 22 PHMS tersebut ditetapkan sebagai PHMS prioritas nasional yaitu Rabies, Anthrax, Brucellosis, AI, Hog Cholera dan Jembrana. Terbatasnya jumlah PHMS yang mendapat prioritas penanganan karena terkait sifat penyakit dan biaya penanganan. Digolongkannya penyakit Jembrana sebagai salah satu penyakit prioritas nasional karena kontribusi sapi Bali (*Bos sondaicus*) dalam swasembada daging sangat strategis (Martoyo,

2003; Wiryosuhanto, 1996). Ternak ini menjadi sangat berharga di daerah transmigrasi (Martoyo, 2003), dan sejak tahun 1980-an sapi Bali telah di sebar ke berbagai daerah dari Aceh sampai Papua Barat dan mendominasi jenis sapi lainnya. Akan tetapi kepekaan sapi Bali terhadap infeksi virus penyakit Jembrana (VPJ) dapat mengancam perkembangan sapi Bali, terutama yang ada di daerah endemis. Penelitian terhadap VPJ telah lama menghasilkan informasi yang komprehensif, terutama yang terkait dengan pathogenesis molekuler (Tenaya, I W.M. 2010). Apabila hasil penelitian tersebut diterapkan dalam pengendalian PJ secara baik dan benar, akan dapat membantu pengendalian penyakit ini secara baik pula. Dengan program vaksinasi yang baik, pelacakan dan penanganan hewan *carrier* merupakan hal mendasar yang harus dilakukan dalam pengendalian PJ. Oleh karena itu perlu dilakukan

diseminasi pengetahuan tentang pathogenesis molekuler dan epidemiologi penyakit Jembrana, untuk merancang strategi pengendalian dan pemberantasannya.

B. Tujuan

Tujuan dari tinjauan pustaka ini adalah untuk menyampaikan hasil penelitian berbasis molekuler sebagai dasar dalam pengambilan keputusan terkait strategi pengendalian dan pemberantasan penyakit Jembrana.

II. PENELITIAN MOLEKULER YANG DILAKUKAN

A. Studi pathogenesis.

Pembuktian patogenesis dilakukan dengan melakukan infeksi VPJ terhadap 5 ekor sapi betina umur sekitar 2 tahun asal Pulau Nusa Penida. Pengamatan klinis dan pengambilan sampel darah dilakukan setiap hari sampai dengan hari ke 21, sesuai prosedur Tenaya *et al.*, 2010. Untuk kontrol pemeriksaan mikroskopis, 2 ekor sapi donor diinfeksi dengan virus yang sama namun diamati sampai hari ke 2 demam kemudian sapi di bunuh untuk pemeriksaan patologi.

B. Pemeriksaan *viral load* dan ekspresi gen *cytokines*.

Untuk kepentingan pemeriksaan jumlah virus (*viral load*) dan keterlibatan *cytokine* dilakukan pengambilan sampel darah. Sel darah putih diambil untuk analisis ekspresi gen *cytokines* dan plasma darah untuk isolasi RNA menggunakan RNeasy Plus with

genomic DNA (gDNA) eliminator columns (Qiagen). Sedangkan total virus diambil dari plasma darah dan RNAny diisolasi menggunakan kit QIAamp Viral Mini Kit (Qiagen). Pengerjaan kedua kegiatan ini sesuai prosedur Tenaya *et al.*, (2010). RNA yang telah diisolasi kemudian di uji dengan Real Time PCR (RT-PCR) menggunakan primer spesifik untuk mengkuantitasi jumlah virus dan ekspresi *cytokines* terutama IL-2, IFN-gamma dan TNF-alfa.

C. Investigasi sel target virus penyakit Jembrana.

Setelah hewan donor dibunuh pada hari ke 2 demam, semua organ lymphoidnya diambil untuk diproses secara histopatologi untuk dilanjutkan uji *double immunostaining* (DIS) dan *In situ hybridization* (ISH). Proses pengerjaan DIS dan ISH dilakukan sesuai dilaporkan oleh M. Desport *et al.*, (2009). Pada saat nekropsi, jaringan segar terutama limpa dan limphenodus lainnya dipotong sebesar 2 x 1 x 0.5 cm dan di fixasi dengan 10% neutral-buffered formalin pH 7.5 selama 48-72 jam, kemudian diproses menggunakan mesin *automatic tissue processor* (Tissue Tek II) dan di tanam dalam parafin. Selanjutnya dilakukan pemotongan jaringan yang telah di tanam dalam paraffin tersebut setebal 4 µm dan ditempelkan pada glass slide *silane coated glass* (ProSciTech) dan disimpan sampai diuji.

Sel target VPJ ditentukan dengan uji DIS, mula-mula slides

diinkubasi dengan campuran 2 antibodi primer (antibody monoclonal anti VPJ dari tikus dan antibody penanda sel B dari kelinci) selama 15-30 menit pada suhu kamar. Setelah dicuci 3 kali dengan Tris-buffered saline (TBS; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.8), antibodi sekunder (*anti mouse* dan *anti rabbit* dengan Alexa Fluor 488 atau 568, diteteskan diatas slide lalu diinkubasi 15-30 menit. Akhirnya slide di cuci dengan TBS dikeringkan di tempat gelap 15 menit, di mounting dengan medium DAPI dan diperiksa di bawah mikroskop fluorescent.

Untuk pemeriksanaan ISH, slide mula-mula di treatmen dengan Tris-EDTA buffer (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 9.2). RNA virus dalam jaringan direaksikan dengan *digoxigenin-labelled probe* dan dideteksi dengan conjugate *sheep anti-DIG-alkaline phosphatase* (Roche) dilarutkan 1:500 dalam *blocking solution and HNPP/Fast Red mixture* (Roche). Slide akhirnya ditetesi media DAPI untuk pewarnaan inti sel (Vector Laboratories), dan diperiksa di bawah mikroskop fluorescent.

D. Deteksi *proviral-DNA*.

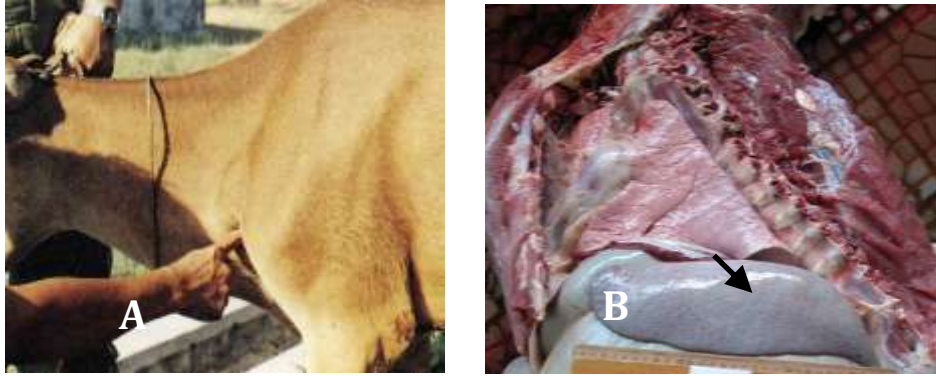
Konfirmasi gejala klinis dilakukan dengan pengujian sampel *proviral-DNA* yang diambil pada

hari demam ke 2, sebelum hewan donor dibunuh. Isolasi DNA dan proses pengujian PCR terhadap sample DNA tersebut dilakukan menggunakan konvensional-PCR (C-PCR) sesuai dilaporkan Tenaya, I W. M. dan Hartaningsih, N. (2005).

III. HASIL PENELITIAN

A. Studi pathogenesis

Virus penyakit Jembrana (VPJ) adalah salah satu virus group lenti yang agak berbeda dengan kebanyakan virus lenti lainnya dari aspek cepat/lambatnya menimbulkan gejala klinis sejak infeksi. Virus lenti lainnya seperti *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) pada manusia, *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV) pada kera dll. memerlukan waktu berbulan bulan untuk menimbulkan gejala klinis. Sedangkan infeksi VPJ pada sapi Bali bersifat akut yakni menimbulkan gejala klinis dan kematian tinggi setelah masa inkubasi singkat antara 5-12 hari. Gejala klinis PJ yang khas meliputi demam, depresi, anorexia dan pembesaran kelenjar limfa (Soeharsono *et al.*, 1990). Gambaran gejala klinis dan perubahan gross patologi yang klasik adalah pembesaran limphoglandula *pre-scapularis* dan limpa (Gambar 1).



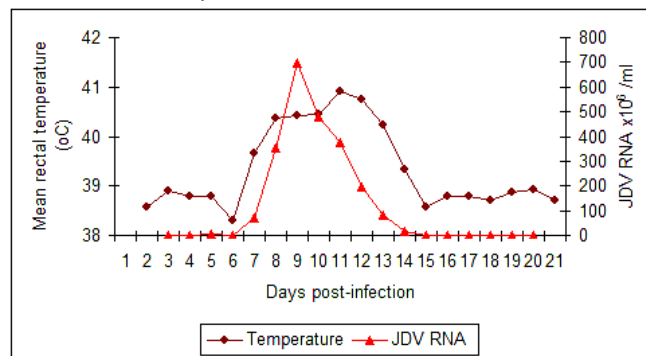
Gambar 1.

Seekor sapi terinfeksi VPJ menunjukkan pembesaran limphoglandula *pre-scapularis* (ditunjuk tangan) (A) dan setelah dibunuh pada hari demam ke 2 menunjukkan pembesaran limpa (*tanda panah*) sekitar 5 kali ukuran normal (B)

B. Pemeriksaan *viral load* dan ekspresi gen *cytokines*.

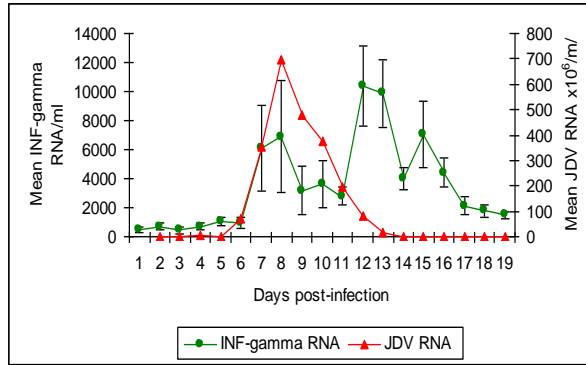
Pada keadaan phase demam (akut) titer virus dalam plasma darah mencapai sekitar 10^8 /ml yang sangat berpotensi untuk penularan ke hewan peka lainnya (Soeharsono *et al.*, 1990) (Gambar 2). Perubahan gambaran darahnya meliputi *leukopenia*, *eosinopenia*, *thrombocytopenia* ringan, *anaemia*, *hypoproteinaemia* dan terjadi peningkatan kadar urea terkait dengan adanya kerusakan ginjal (Soesanto *et al.*, 1990).

IFN-gamma merupakan ekspresi *gen cytokines*, yaitu produk seluler yang paling menonjol terkait kesembuhan penyakit Jembrana. Substansi ini mulai diekpresikan pada saat demam dan segera turun setelah phase demam (Gambar 3). Keadaan ini menggambarkan peran kekebalan seluler sangat penting dalam kesembuhan dari infeksi VPJ pada saat akut, dimana antibodi humoral belum terbentuk karena sel sel B terserang VPJ.



Gambar 2.

Gajala klinis penyakit Jembrana. Pada saat phase akut, terjadi demam (tanda temperature) yang biasanya terjadi antara 6-12 hari pasca infeksi, dimana titer virus sangat tinggi sekitar 10^8 /ml (tanda JDV RNA) sehingga sangat berpotensi disebarkan oleh serangga pengisap darah, lewat kontak atau mekanis lainnya.



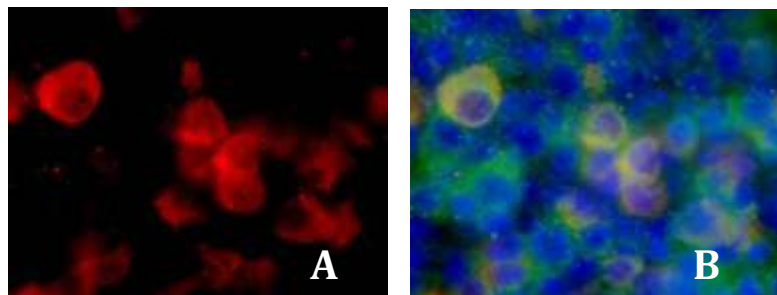
Gambar 3.

Patogenesis molekuler infeksi VPJ. Titer virus sangat meningkat pada phase akut, (merah) dibarengi dengan peningkatan ekspresi TNF-alfa yaitu cytokines penyebab kesembuhan dalam keadaan akut.

C. Deteksi sel target virus penyakit Jembrana.

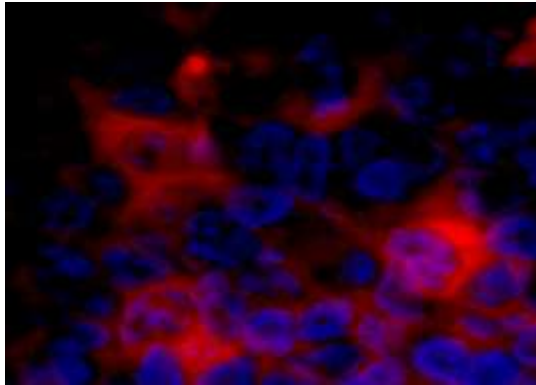
Pada infeksi VPJ antibodi baru muncul sekitar 2-3 bulan pasca infeksi, hal ini dapat dipahami karena hanya sel sel B (sel pembuat antibodi) selama phase akut diserang karena menjadi target virus VPJ (Gambar 4) (Tenaya, IWM. 2010). Dengan demikian uji serologi yang selama ini digunakan untuk mendiagnosa PJ pada saat infeksi awal dinilai kurang tepat. Walaupun tidak

terbentuk antibodi selama kurun waktu yang cukup panjang tersebut, namun sebagian besar (80%) hewan terinfeksi menjadi sembuh menjadi hewan *carrier*. Hal ini karena selama phase tersebut fungsi kekebalan diambil alih oleh sel sel T (CD8) dan sistim imunitas pada awal infeksi adalah sistim seluler dan bukan humoral (Tenaya. IWM. 2010). Pengetahuan ini sangat penting terkait pemilihan uji diagnosa yang harus digunakan.



Gambar 4.

Sel-sel B yang menjadi target virus penyakit Jembrana. Limpa sapi terinfeksi VPJ pada hari demam ke 2 direaksikan dengan *antibody rabbit anti-bovine IgG* dan *goat anti-rabbit antibody labelled* dengan Alexa Fluor 488 (A), dan (B) *monoclonal antibody anti JDV* dengan *goat anti-mouse antibody labelled* dengan Alexa Fluor 568. (C) Merger gambar A dan B untuk membuktikan double pewarnaan merah dan hijau menjadi kuning ketika sel B terinfeksi oleh VPJ. Pembesaran 100X. inti sel terwarnai biru oleh DAPI.



Gambar 5.

Sel target virus penyakit Jembrana. Limpa sapi terinfeksi VPJ pada hari demam ke 2 direaksikan dengan *digoxigenin-labelled probe* dan dideteksi dengan conjugate *sheep anti-DIG-alkaline phosphatase*. Reaksi positif RNA VPJ (merah) terdeteksi di dalam sitoplasma. Pembesaran 100X. inti sel terwarnai biru oleh DAPI.

Untuk konfirmasi lebih jauh tentang terinfeksi sel B oleh VPJ, maka dilakukanlah uji ISH yang prinsipnya mendeteksi RNA pada sitoplasma. Dengan uji ini terbukti bahwa RNA VPJ terlokalisasi pada daerah plasma sel di luar inti sel B. (Gambar 5).

D. Deteksi *proviral-DNA*.

Diagnosa secara definitif hewan terinfeksi VPJ dalam keadaan akut atau kronis pada hewan *carrier* dapat dilakukan dengan uji C-PCR untuk mendeteksi *proviral-DNA* pada sel target (sel B). Sedangkan uji RT-PCR hanya dapat digunakan pada phase akut karena hanya dapat mendeteksi RNA virus, sehingga uji C-PCR ini sangat berguna dalam diagnosa VPJ dalam semua phase penyakit.

IV. PEMBAHASAN

Pasca infeksi VPJ, mayoritas (80%) hewan menjadi sembuh walaupun tidak adanya sistim

kekebalan humoral (antibodi) pada phase akut. Proses kesembuhan ini diduga kuat karena peran kekebalan seluler dimana terjadi peningkatan sel T (CD8) yang melepaskan IFN-gamma dan IL-2 (Tenaya, IWM. 2010) (Gambar 3). Dari hewan yang sembuh tersebut didalam darahnya tetap mengandung VPJ walaupun dengan titer yang rendah (hewan *carrier*) paling tidak sampai 2 tahun dan mungkin selama hidupnya, hal mana sangat berpotensi sebagai sumber penularan (Soeharsono *et al.*, 1995a; Wilcox *et al.*, 1992). VPJ didalam tubuh hewan akan memasuki sel sel B (sel plasma) sebagai sel targetnya dimana virus melakukan replikasi dan terintegrasi secara permanent dalam bentuk *proviral-DNA* dengan gen sapi Bali (Tenaya, IWM 2010; Desport *et al* 2009) dan dapat dibuktikan dengan C-PCR. *Proviral-DNA* tersebut masih dan hanya dapat terdeteksi dengan uji C-PCR pada hewan

yang telah sembuh paling tidak 18 bulan sejak infeksi dan bahkan mungkin selama hidupnya, hal ini menandakan bahwa hewan *carrier* sangat berpotensi menjadi sumber penular apabila menjadi kambing kembali di kondisi lapangan (Tenaya, I W. M dan Hartaningsih, 2003). Hal ini mungkin dapat menjelaskan kejadian PJ di luar Bali yang diduga akibat adanya pemasukan hewan *carrier* secara *illegal* dari suatu daerah endemis.

Penomona tidak adanya antibodi selama 2-3 bulan pasca infeksi dapat dipahami karena hanya sel sel B (sel pembuat antibodi) yang diserang karena menjadi target VPJ (Gambar 4) (Tenaya, IWM. 2010). Dengan demikian uji serologi yang selama ini digunakan untuk mendiagnosa PJ pada saat infeksi awal dinilai kurang tepat. Walaupun tidak terbentuk antibodi selama kurun waktu yang cukup panjang tersebut, namun sebagian besar (80%) hewan terinfeksi menjadi sembuh dan bersifat karier. Hal ini karena selama phase tersebut fungsi kekebalan diambil alih oleh fungsi sel sel T (CD8) dan sistim imunitas pada awal infeksi adalah sistim seluler dan bukan humoral (Tenaya. IWM. 2010). Pengetahuan ini sangat penting terkait pemilihan uji diagnosa yang harus digunakan. Selanjutnya juga diketahui bahwa, kesembuhan hewan dari infeksi VPJ adalah karena adanya produksi Interferon gamma (IFN-gamma) oleh sel sel T (CD8).

Sejak dikembangkannya uji C-PCR, maka diagnosa definitif VPJ hanya dianjurkan menggunakan uji tersebut (Tenaya, I W. M, *et al.*, 2003; Tenaya I W.M. dan Hartaningsih 2005). Uji ini dapat mendeteksi hewan terinfeksi VPJ sejak 3 hari sampai dengan beberapa tahun pasca infeksi, selama adanya gejala klinis maupun setelah hewan sembuh (hewan *carrier*). Dengan aplikasi uji C-PCR ini dimungkinkan untuk melakukan seleksi terhadap hewan-hewan untuk kepentingan tertentu, misalnya untuk bibit. Untuk keperluan uji C-PCR, dari hewan yang masih hidup, sampel yang diperlukan adalah sel sel darah putih (limposit) yang harus diambil menggunakan tabung berisi zat anti pembeku darah (EDTA atau Heparin). Sedangkan bila hewan telah mati (kurang dari 2 jam) maka organ terbaik adalah limfa/spleen. Di lapangan sampel yang telah diambil harus secepatnya dimasukkan kedalam wadah yang diisi es batu dan dikirim secepatnya ke laboratorium (tidak lebih dari 6 jam asalkan es nya harus diganti bila mencair).

V. KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan diatas dapat disimpulkan hal-hal sebagai berikut:

1. Patogenesis Virus penyakit Jembrana (VPJ) sangat unik dan berbeda dengan patogenesis virus lenti lainnya, dimana sel B

menjadi target serangan dan tempat persembunyian VPJ.

2. Kesembuhan dari infeksi VPJ pada phase akut adalah karena peran major dari kekebalan seluler dengan meningkatnya IFN-gamma dan sel CD8, sedangkan peranan kekebalan humoral sangat penting pada phase segera setelah kesembuhan secara klinis.
3. Pada phase akut, titer VPJ dalam plasma sangat tinggi namun setelah phase ini VPJ segera berintegrasi dengan gen sapi secara permanen dalam bentuk *proviral-DNA* dan sapi tersebut menjadi hewan *carrier* yang membawa virus dalam jangka panjang mungkin selama hidupnya.
4. Untuk mendeteksi hewan *carrier* secara definitif dapat dilakukan dengan uji konvensional PCR.

Berdasarkan kesimpulan diatas dapat disarankan hal-hal sebagai berikut:

1. Peranan hewan *carrier* pada patogenesis VPJ sangatlah penting, karena itu pelacakan hewan *carrier* dengan uji C-PCR, harus dapat dilaksanakan terkait upaya pengendalian dan atau pemberantasan penyakit Jembrana.
2. Di suatu wilayah dengan prosentase hewan *carrier* yang masih tinggi, maka pengendalian dianjurkan dengan vaksinasi.

Sebaliknya, di suatu wilayah dengan prosentase *carrier* yang sangat rendah maka dapat dilakukan upaya pembebasan dengan metoda *test and slaughter* terhadap hewan *carrier* tersebut.

3. Pengendalian hewan *carrier* dan pengawasan lalulintas ternak yang ketat sebaiknya dapat dilaksanakan secara bersama sama sehingga pengendalian penyakit Jembrana dapat diwujudkan.
4. Untuk menjamin lebih tahannya sapi Bali asal daerah bebas penyakit Jembrana, yang dikirim ke daerah endemis penyakit Jembrana, dianjurkan untuk memberikan vaksinasi anti penyakit Jembrana di daerah asal sebelum dikirim.

VI. DAFTAR PUSTAKA

- Moira Desport., I.W. Masa Tenaya., Alexander McLachlan., Tegan J. McNab., Judhi Rachmat., Nining Hartaningsih dan Graham E. Wilcox (2009). In vivo infection of IgG-containing cells by Jembrana disease virus during acute infection. *Virology* 393 (2009) 221–227
- Martojo, H (2003). A simple selection program for small holder Bali cattle farmers. In strategies to improve Bali cattle in Eastern Indonesia. Pp.43-53. Edited by K Entwiltel and D R Lindsay. Australian Center for International Agriculture Research.

- Soeharsono, S., Hartaningsih, N., Soetrisno, M., Kertayadnya, G. and Wilcox, G. E. (1990). Studies of experimental Jembrana disease in Bali cattle. I. Transmission and persistence of the infectious agent in ruminants and pigs, and resistance of recovered cattle to re-infection. *J Comp Pathol* 103, 49-59.
- Soesanto, M., Soeharsono, S., Budiantono, A., Sulistyana, K., Tenaya, M. and Wilcox, G. E. (1990). Studies on experimental Jembrana disease in Bali cattle. II. Clinical signs and haematological changes. *J Comp Pathol* 103, 61-71.
- Soeharsono, S., Wilcox, G. E., Putra, A. A., Hartaningsih, N., Sulistyana, K. and Tenaya, M. (1995a). The transmission of Jembrana disease, a lentivirus disease of *Bos javanicus* cattle. *Epidemiol Infect* 115, 367-374.
- Tenaya, I W. M., Ananda, C. K. and Hartaningsih, N. (2003). Deteksi proviral DNA virus Jembrana pada limposit sapi Bali dengan uji polymerase chain reaction. *Buletin Veteriner BPPV Denpasar* 15, 44-46.
- Tenaya, I W. M. and Hartaningsih, N. (2005). Kajian hasil vaksinasi penyakit Jembrana di lampung Tengah. *Buletin Veteriner BPPV Denpasar* 17, 59-63.
- Tenaya, I W.M (2010). Studies of the Pathogenesis of Jembrana disease virus on *Bos javanicus*. PhD Thesis, Murdoch University.
- Wilcox, G. E., Kertayadnya, G., Hartaningsih, N., Dharma, D. M., Soeharsono, S. and Robertson, T. (1992). Evidence for a viral aetiology of Jembrana disease in Bali cattle. *Vet Microbiol* 33, 367-374.
- Wiriyosuhanto, S. (1996). Bali cattle -their economic important in Indonesia. In *Workshop on Jembrana Disease and the Bovine Lentiviruses* pp. 34-41. Edited by G. E. Wilcox, S. Soeharsono, D. M. N. Dharma and J. W. Copland: Australian Centre for International Agricultural Research.

