

**SURVEI SEROLOGI DAN MOLEKULER
PENYAKIT JEMBRANA DI PROVINSI BALI, LAMPUNG
DAN NANGRO ACEH DARUSSALAM**

(Serological and Molecular Survey Jembrana Disease in Bali, Lampung
and Nangro Aceh Darussalam Provinces)

Ni Luh Putu Agustini

Balai Besar Veteriner Denpasar

ABSTRAK

Survei serologi dan molekuler penyakit Jembrana untuk mendeteksi keberadaan antibodi dan penyebaran penyakit Jembrana di provinsi Bali., Lampung dan Nangro Aceh Darussalam telah dilakukan pada bulan Juni, sampai dengan Oktober 2010. Selama pelaksanaan survei berhasil dikumpulkan 344 sampel serum dan 324 sampel darah dengan antikoagulan EDTA. Semua sampel serum diuji ELISA menggunakan antigen Jembrana J Gag 6 histidin, sedangkan sampel darah diuji PCR. Hasil uji ELISA menunjukkan bahwa prevalensi seropositif antibodi Jembrana di daerah survei sangat rendah. yaitu di provinsi Bali, sebesar 19,52% , di provinsi Lampung dan Nangro Aceh Darussalam ; 6,75% dan 1,35% berturut-turut. Secara molekuler virus penyakit Jembrana hanya ditemukan pada sampel darah asal provinsi Bali sebanyak 9,76% sedangkan sebaliknya, tidak ditemukan pada sampel darah dari provinsi Lampung dan Nangro Aceh Darussalam. Mengingat prevalensi positif antibodi JD di ketiga daerah survei sangat rendah maka perlu dilakukan vaksinasi, pengendalian vektor dan surveilans

Kata Kunci : *Penyakit Jembrana, molekuler , serologi, survei*

ABSTRACT

Serological and molecular survey to detect the presence of antibodies and the spread of Jembrana disease virus in Bali province, Lampung and Nangro Aceh Darussalam has been done in June, to October 2010. During the survey collected 344 serum samples and 324 blood samples with EDTA anticoagulant. All of serum samples were tested ELISA using the antigen Jembrana J Gag 6 histidine, while blood samples were tested PCR. ELISA test results showed that the prevalence of positive antibody Jembrana in the survey area is very low namely in the provinces of Bali, amounting to 19.52%, in the province of Lampung and Nangro Aceh Darussalam : 6.75% and 1.35% respectively. The molecular epidemiology of Jembrana disease virus is only found in blood samples from the Province of Bali, with a prevalence of 9.76% while on the contrary, was not found in blood samples from the provinces of Lampung and Nangro.Aceh Darussalam. Given the prevalence of positive antibody in the third JD survey area is very low, therefore the vaccination vector control and surveillance should be done immediately.

Keywords: *Jembrana disease, molecular , serological, survey*

PENDAHULUAN

Penyakit Jembrana (Jembrana Disease/JD) adalah penyakit virus menular pada sapi Bali (*Bos javanicus*) disebabkan oleh *Lentivirus*, familia *Retroviridae*. JD pertama kali dilaporkan terjadi di kabupaten Jembrana Provinsi Bali pada tahun 1964. Hingga saat ini JD telah menyebar ke beberapa daerah selain Bali meliputi: Lampung, Sumatera Selatan, Sumatera Barat, Bengkulu, Kalimantan Selatan, Kalimantan Tengah, Kalimantan Timur (Hartaningsih, 2005) dan provinsi Nanggro Aceh Darussalam tahun 2009.

Sampai saat ini JD masih merupakan masalah bagi pengembangan peternakan sapi Bali. Salah satu upaya pencegahan JD adalah dengan cara vaksinasi. Namun karena keterbatasan jumlah vaksin yang tersedia, cakupan vaksinasi JD di daerah endemik sangat rendah. Kasus JD yang terakhir di Bali dilaporkan terjadi di Desa Ungasan, Kecamatan Kuta Selatan, Kabupaten Badung pada bulan Desember tahun 2005 (Hartaningsih, 2005).

Data hasil survei serologis Balai Besar Veteriner Denpasar tahun 2009 menunjukkan bahwa seroprevalensi antibodi JD di Bali dan Lampung sangat rendah (Agustini, 2009). Anehnya walaupun seroprevalensi antibodi JD di Bali dan Lampung sangat rendah namun tidak terjadi kasus JD. Fenomena ini sangat menarik untuk diketahui, karena antibodi yang rendah biasanya akan memicu terjadinya

kasus JD, namun berbeda dalam hal ini kasus JD di Bali dan Lampung sangat terkendali. Berdasarkan alasan tersebut, maka perlu dilakukan survei untuk mengetahui seroprevalensi antibodi JD serta penyebaran dan keberadaan virus penyakit Jembrana pada sapi Bali di provinsi Bali, Lampung dan Nanggro Aceh Darussalam.

MATERI DAN METODA

1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan pada bulan Juni, Agustus dan Oktober 2010 di Provinsi Bali, Lampung dan Nanggro Aceh Darussalam. Sebanyak 344 sampel serum dan 324 sampel darah dengan antikoagulan EDTA berhasil dikumpulkan selama pelaksanaan survei.

2. Penanganan sampel

Sampel serum yang telah diambil segera dipisahkan dari gumpalan darah dimasukkan ke dalam ependorf diberi label dan disimpan dalam Freezer (suhu -20°C) sampai dilakukan pengujian.

Untuk sampel darah dilakukan isolasi *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC) dengan cara : darah dengan antikoagulan EDTA disentrifugasi 3000 rpm selama 5 menit, kemudian *buffy coatnya* diambil dan dimasukkan ke dalam tabung dan selanjutnya ditambahkan sebanyak 9 ml NH_4Cl 0,83%. Selanjutnya campuran tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit dan supernatannya dibuang. Pellet yang diperoleh kemudian ditambahkan PBS steril sampai

mencapai 10 ml . Setelah itu dilakukan pencucian dengan cara disentrifugasi kembali 1500 rpm selama 5 menit. Pencucian ini diulangi sebanyak 2 kali dengan cara yang sama. Terakhir supernatannya dibuang dan pellet yang diperoleh ditambahkan 0.5 – 1 ml media TC atau PBS steril dan disimpan pada suhu (-20⁰C) sampai digunakan.

PBMC yang diperoleh selanjutnya diisolasi DNANYa dengan mempergunakan *QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen)* dengan cara sebagai berikut: 20 µl Qiagen Protease (atau Proteinase K) dimasukkan ke dalam tabung microfuge 1.5 ml selanjutnya sebanyak 200 µl sampel PBMC (5 x 10⁶ lymphocyte) ditambahkan ke tabung microfuge. Kemudian 200 µl Buffer AL ditambahkan ke dalam sampel dan dicampur dengan menggunakan vortex selama 15 detik. Sampel selanjutnya diinkubasi pada suhu 56⁰ C selama 10 menit, kemudian disentrifuge sekitar 2 detik. Tambahkan sebanyak 200 µl ethanol, kemudian kocok lagi dengan menggunakan vortex selama 15 detik. Sentrifuge kembali tabung microfuge tersebut sekitar 2 detik. Dengan hati-hati masukkan campuran sampel ke dalam *QIAamp spin column (in a 2ml collection tube)* tanpa membasahi dinding tube, tutup dan centrifuge 6000 g / 8000 rpm selama 1 menit. Tempatkan *QIAamp spin column* dalam 2 ml *collection tube* dan buang tube yang berisi filtrat. Hati-hati buka tabung *QIAamp spin column* dan tambahkan 500

µl buffer AW1 tanpa membasahi dinding tube. Tutup tabung dan centrifuge 6000 g / 8000 rpm selama 1 menit. Tempatkan *QIAamp spin column* dalam 2 ml *collection tube* dan buang tube yang berisi filtrat. Hati-hati buka tabung *QIAamp spin column* dan tambahkan buffer AW2 tanpa membasahi dinding. Tutup tabung dan centrifuge dengan kecepatan penuh 20.000 g / 14.000 rmp selama 3 menit. Tempatkan *QIAamp spin column* pada 1.5 ml tabung *microcentrifuge* yang bersih dan buang tabung yang mengandung filtrat. Tahap Elution. Buka tutup tube secara hati-hati dan tambahkan 200 µl buffer AE atau aquadest. Inkubasi pada suhu kamar selama 1-5 menit dan kemudian centrifuge 6000 g / 8000 rpm selama 1 menit, buang *QIAamp spin column* dan simpan supernatan (DNA) pada suhu – 20⁰ C.

3. Pengujian Sampel

Semua sampel serum diuji terhadap antibodi Jembrana dengan Uji Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) mempergunakan antigen Jembrana J Gag 6 Histidin (Agustini *et al.*, 2002) dengan prosedur kerja sebagai berikut : antigen J Gag 6 Histidin dilarutkan dengan carbonat coating buffer 1:50 kemudian ditambahkan ke masing-masing well sebanyak 50 µl, mulai dari well B2 sampai dengan G11. Masukkan 50 µl hanya coating buffer (tanpa antigen) ke dalam lubang blank B1 s/d G1. Kocok dengan shaker dan diinkubasikan pada suhu 4⁰C selama 24 jam.

Cuci plate dengan PBST sebanyak 3 kali dengan ELISA washer. Blok plate dengan menambahkan ke masing-masing well sebanyak 50 µl larutan skim milk 5% dalam PBST dan plate diinkubasikan selama 1 jam pada suhu ruangan. Cuci plate dengan PBST sebanyak 3 kali dengan ELISA washer. Siapkan sampel serum, sampel serum standar, dan Reference serum dengan cara sebagai berikut: Sampel yang akan diuji diencerkan 1: 100 dalam skim milk 5% dan 50 µl serum tersebut dimasukkan ke dalam masing-masing lubang test. Sampel serum standar (PM) diencerkan mulai dari pengenceran 1 : 100 hingga 1 : 3200 dalam skim milk 5% dan tiap-tiap pengenceran dimasukkan pada lubang dideretkan 2 setiap pengenceran satu lubang mulai dari B2 sampai G2. Sampel *Reference serum* yang digunakan ada dua yaitu *reference serum* positif Jembrana /*Hyperimun* (A), dan *Reference serum* negatif (Nusa Penida /B). Encerkan masing-masing *reference serum* tersebut 1 : 100 dalam skim milk 5% dan masukkan 50 ul *reference serum* A ke lubang B3 , C3 dan D3; 50 µl serum B ke lubang E3, F3, dan G3. Homogenkan dengan dishaker dan inkubasikan pada suhu 37°C selama 1 jam. Cuci plate dengan PBST sebanyak 3 kali dengan *ELISA washer*. Encerkan *conjugate antiovine Ig G Whole molecule* (SIGMA) 1 : 1000 dalam PBST buffer. Masukkan 50 µl conjugate yang telah diencerkan tersebut pada setiap lubang baik yang mengandung serum maupun

lubang blank dan kontrol. Inkubasikan pada suhu 37°C selama 1 jam. Cuci plate dengan PBST sebanyak 3 kali dengan *ELISA washer*. Tambahkan campuran satu bagian *substrate Hidrogen Peroxidase* (HRP) *solution* B dan 9 bagian (*solution* A) atau 2,2- *Azino-bis* (3-*ethylbenzothiazoin-6 sulfonic acid diamonium salt*). Masukkan 50 µl substrate ke dalam setiap well (*blank*, kontrol dan serum sampel), diamkan selama 2 menit. Kemudian stop reaksi dengan menambahkan 50 µl larutan asam oxalat 2 % ke semua well.

4. Pembacaan dan intepretasi hasil

Pembacaan hasil dilakukan pada *ELISA READER* dengan panjang gelombang 405 nm. Bila nilai OD sampel lebih besar atau sama dengan OD pengenceran 1 : 100 maka sampel dikatakan positif sedangkan bila nilai OD sampel lebih kecil dari OD pengenceran 1 : 100 maka sampel dikatakan negatif

4.1. Uji *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

DNA virus dari PBMC diisolasi dengan menggunakan *QIAmp DNA Blood Kit* (Qiagen). Tabung *ependorf* yang sudah berisi DNA filtrat diberi label dan disimpan pada -20°C sampai siap diuji. Sedangkan metoda uji PCR yang dipakai untuk mendeteksi provirus Jembrana ini adalah metoda *second round PCR* yang dikembangkan oleh Masa Tenaya dkk., (2003 & 2004). Bahan-bahan yang diperlukan dalam teknik PCR JD antara lain:

Master mix, PCR water, Primer JDV-1, Primer JDV-3, DNA template, Agarose gel 1%, TAE buffer, dan Ethidium Bromide. Primer yang digunakan terdiri dari Primer JDV-1 dan Primer JDV-3. Forward primer (JDV -1) dengan sekuen 5'GCAGCGGAGGTGGCAATTTT GATAGGA 3'. Reverse primer (JDV - 3) dengan sekuen 5' CGGCGTGGTGGTCCACCCCAT G 3' (Chadwick et al., 1995).

Uji PCR

Untuk setiap reaksi PCR digunakan 25 µL *Master Mix*, 2 µL primer JDV-1, dua µL primer JDV-3, 19 µL PCR water dan DNA *template* sebanyak 2 µL. Bahan-bahan tersebut kemudian dicampur ke dalam tabung effendorf volume 500 µL. Campuran tersebut diamplifikasi dengan *thermocycler* sebanyak 35 siklus dengan perincian sebagai berikut: Step 1 (denaturasi) 94°C selama 5 menit, Step 2 (denaturasi) 94°C selama 30 detik dan (annealing) 66°C selama 1 menit, Step 3 pemanjangan (ekstensi) 72°C selama 1,5 menit. Pada akhir siklus, ada program tambahan 72°C selama 10 menit untuk melengkapi pemanjangan DNA yang belum selesai, dan satu siklus untuk masa inkubasi di bawah suhu ruang, biasanya 15°C dengan waktu tak terbatas. Total siklus adalah selama 2 jam 15 menit. Untuk reaksi *Second Round* PCR, dikerjakan dengan *running* ulang hasil dari *First Round* PCR dengan formula PCR yang sama dengan formula pada *First Round* PCR.

4.2. Analisa dan dokumentasi hasil PCR

Hasil PCR kemudian dielektroforesis dengan 1% gel agarose yang mengandung 5 µg Etidium bromide/ ml. Elektrophoresis dilakukan dengan voltase 70 volt selama 45 menit. Hasil PCR dalam gel kemudian divisualisasi dengan sinar UV pada alat *UV transluminator* dan dianalisa dengan program Gel Doc untuk melihat adanya *band* / pita DNA

HASIL

Seperti diringkaskan pada Tabel 1, terlihat bahwa hasil pengujian ELISA terhadap 196 sampel serum dan darah asal Provinsi Bali menunjukkan 19,52% serum yang diuji positif mengandung antibodi JD. Sedangkan hasil uji molekuler PCR terhadap sampel darah menunjukkan bahwa prevalensi virus Jembrana di Provinsi Bali ditemukan sebanyak 9,76% masing-masing ditemukan pada sampel asal Kabupaten Bangli dan Tabanan dengan prevalensi berturut turut 4,76% dan 5%.

Hasil uji ELISA dan PCR sampel dari Provinsi Lampung menunjukkan hanya 6.75% (5/74) dari serum yang diuji positif mengandung antibodi JD sedangkan hasil uji PCR tidak menemukannya adanya virus JD (Tabel 2) , Untuk sampel serum dan darah asal Provinsi Nangro Aceh Darrusalam hanya 1,35% (1 dari 74 serum) yang diuji positif mengandung antibodi JD dan tidak ditemukan virus JD pada sampel darah (Tabel 3).

Tabel 1.

Prevalensi antibodi dan virus penyakit Jembrana di Provinsi Bali

No	Desa	Kecamatan	Kabupaten	Serum	Jumlah Positif	Prevalensi (%)	Darah EDTA	Positif PCR	Prevalensi (%)
1	Manistutu	Melaya	Jembrana	22	0	0	22	0	0
2	Kuwum	Marga	Tabanan	21	2	9,52	21	1	4,76
3	Ungasan	Kuta Selatan	Badung	20	0	0	20	0	0
4	Penatih	Denpasar Utara	Denpasar	22	0	0	22	0	0
5	Temesi	Gianyar	Gianyar	20	0	0	20	0	0
6	Kawan	Bangli	Bangli	20	2	10	20	1	5
7	Banjarangkan	Banjarangkan	Klungkung	20	0	0	20	0	0
8	Belong	Karangasem	Karangasem	20	0	0	20	0	0
9	Tukad Sumage	Gerokgak	Buleleng	21	0	0	21	0	0
	TOTAL			196	4	19,52	196	2	9,76

Tabel 2.

Prevalensi antibodi dan virus penyakit Jembrana di Kabupaten Way

Kanan Provinsi Lampung

No.	Desa	Kecamatan	Kabupaten	Serum	Positif ELISA	Prevalensi (%)	Darah EDTA	Positif PCR	Prevalensi (%)
1	Darma Setia II	Banjit	Way Kanan	41	2	4,87%	41	0	0
2	Bali Dwipa	Banjit	Way Kanan	33	3	9,09%	13	0	0
	TOTAL			74	5	6,75%	74	0	0

Tabel 3.

Prevalensi antibodi dan virus penyakit Jembrana di Provinsi NAD

No	Desa	Kecamatan	Kabupaten	Serum	Positif ELISA	Prevalensi (%)	Darah EDTA	Positif PCR	Prevalensi (%)
1	Perkebunan	Seruway	Aceh Tamiang	7	1	14,,%	7	0	0
2	Binjai	Seruway	Aceh Tamiang	4	0	0	4	0	0
3	Sungai Kuruk	Seruway	Aceh Tamiang	2	0	0	2	0	0
4	Bangun Rejo	Seruway	Aceh Tamiang	8	0	0	8	0	0
5	Payan Udang	Seruway	Aceh Tamiang	14	0	0	14	0	0
6	Deng	Tanah Luas	Aceh Utara	19	0	0	19	0	0
7	Alue Mulem	Lhoksukan	Aceh Utara	7	0	0	7	0	0
8	Bintang Hu	Lhoksukan	Aceh Utara	7	0	0	7	0	0
9	Pucu Alue	Baktya	Aceh Utara	6	0	0	6	0	0
	TOTAL			74	1	1,35	74	0	0

PEMBAHASAN

Secara imunologi antibodi bisa terbentuk apabila ada vaksinasi atau adanya infeksi alam. Adanya antibodi JD pada sampel serum asal Kabupaten Tabanan dan Bangli Provinsi Bali dapat dipastikan terjadi akibat infeksi alam karena di Provinsi Bali sudah lama tidak dilakukan vaksinasi JD dan diperkuat dengan ditemukannya virus JD pada sampel darah. Fenomena ini memperkuat penelitian Soeharsono *et al.*, 1990 yang menemukan bahwa sapi yang sembuh dari infeksi JD, akan kebal terhadap infeksi berikutnya dan hewan tersebut bersifat *carrier* dan memiliki antibodi yang dapat dideteksi dengan uji ELISA. Dugaan antibodi JD di Lampung dan Nangro Aceh Darussalam disebabkan karena hasil vaksinasi diperkuat oleh hasil uji PCR, dimana tidak ditemukannya virus JD pada sampel darah. Selain itu informasi dari petugas Dinas Peternakan setempat mengatakan bahwa bibit sapi Bali di Nangro Aceh Darussalam didatangkan dari Provinsi Lampung, yang merupakan daerah endemik JD dan di daerah tersebut dilakukan vaksinasi JD. Tidak terjadinya kasus JD di daerah survei walaupun prevalensi antibodi sangat rendah disebabkan karena virus JD tidak ditemukan di daerah tersebut. Tidak ditemukannya virus JD memperkuat penelitian Hartaningsih *et al.*, 2006 yang menyatakan bahwa vaksinasi JD secara berturut-turut 4 kali mampu mengeliminasi agen

penyakit Jembrana. Selain itu hasil ini juga membuktikan bahwa pada vaksin Jembrana, virus JD tidak ditemukan karena virus JD dalam vaksin telah terinaktivasi oleh Triton-X100 sehingga virus tidak mampu melakukan penetrasi ke dalam sel induk semang untuk memperbanyak diri. (Hartaningsih *et al.*, 2009.) Berdasarkan hasil penelitian, telah diketahui bahwa hewan yang sembuh dari JD akan bersifat *carrier* dan membawa virus dalam tubuhnya serta berpotensi sebagai sumber penularan penyakit (Soeharsono *et al.*, 1990). Hanya sapi Bali yang peka terhadap virus Jembrana, sedangkan sapi ras lainnya tahan/resisten. Dengan berimbangannya populasi sapi Bali dengan sapi ras lainnya diduga ikut berperan dalam menekan terjadinya letupan/wabah JD (Putra, *et al.* 2003).

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari uraian di atas dapat disimpulkan bahwa prevalensi antibodi Jembrana di daerah survei sangat rendah (dibawah 50%). Secara molekuler virus penyakit Jembrana hanya ditemukan pada sampel darah asal Kabupaten Tabanan dan Bangli Provinsi Bali. Terkendalanya kasus penyakit Jembrana di Lampung dan Nangro Aceh Darussalam disebabkan karena virus Jembrana tidak ditemukan di daerah survei. Mengingat antibodi JD di daerah survei sangat rendah maka perlu dilakukan vaksinasi JD disertai

dengan penyemprotan atau spraying vektor (serangga) untuk mencegah penularan JD. Selain itu perlu dilakukan surveilans secara rutin setiap tahun untuk mengetahui secara pasti imbalan hewan kebal dan hewan peka dalam rangka mengantisipasi munculnya kasus JD.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kepala Balai Besar Veteriner Denpasar atas kepercayaan dan ijin yang diberikan untuk melaksanakan survei ini. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada Kepala Dinas Peternakan Kabupaten/Kota se-Provinsi Bali, Kepala Dinas Peternakan Way Kanan dan Kepala Dinas Peternakan Kabupaten Aceh Tamiang dan Aceh Utara. Penulis juga mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada I Wayan Masa Tenaya, I Ketut Mayun, I Wayan Ekaana dan I Nengah Mundera yang telah membantu dalam pengambilan dan pengujian sampel.

DAFTAR PUSTAKA

Agustini, NLP., and Hartaningsih, N. (2002). Uji Elisa untuk Mendeteksi Antibodi Lentivirus Menggunakan Antigen Rekombinan J Gag-6. Manual Peningkatan Metode Diagnosa Penyakit Jembrana ACIAR BPPV VI.

Agustini, NLP. (2009). Surveilans Penyakit Jembrana di Provinsi Bali, Lampung dan Sumatera Barat. Laporan Tahunan Balai Besar Veteriner Denpasar.

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

Hartaningsih, N., Sulistyana, K., and G.E. Wilcox. (1996). Serological Test for JDV Antibodies and Antibody Respons of Infected Cattle. In Jembrana Disease and the Bovine Lentiviruses, *ACIAR Proceedings No.75*, page 79-84.

Hartaningsih, N. (2005). Laporan Hasil Investigasi Penyakit Jembrana di Kalimantan Timur. Laporan Tahunan Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Denpasar.

Putra, AAG. (2003). Peranan Hewan Karier penyakit Jembrana dalam penularan penyakit di lapangan. *Buletin Veteriner*. Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Regional VI Denpasar. XV (63) :16-26

Soeharsono, S., Hartaningsih, N., Soetrisno, M., Kertayadnya, G., and Wilcox, GE. (1990). Studies experimental Jembrana disease of infectious agen in Bali cattle. Transmission and persistence of the infectious agent in ruminant and pigs and resistance of recovered cattle to re-infection, *Journal of Comparative Pathology* 103 : 49-59

Tenaya, IWM., Ananda, CK dan Hartaningsih, N. (2003). Deteksi Proviral DNA Virus Jembrana pada Limposit Sapi Bali dengan Uji *Polymerase Chain Reaction*. *Buletin Veteriner*. 63: 44-48, BPPV VI Denpasar.

Tenaya, IWM dan Hartaningsih, N. (2004). Detection of JDV Carrier Animals by PCR. *Buletin Veteriner*. 65: 46-50, BPPV VI Denpasar.