

PENGEMBANGBIAKAN SEL LESTARI LIMPHOBLASTOID ASAL KASUS MALIGNANT CATARRHAL FEVER DI KABUPATEN BANYUWANGI

AGUS WIYONO, MUHARAM SAEPULLOH, dan RINI DAMAYANTI

Balai Penelitian Veteriner
Jalan R.E. Martadinata No.30, P.O. Box 151, Bogor 16114

ABSTRAK

Penyakit Malignant Catarrhal Fever (MCF) merupakan penyakit limfoproliferatif yang bersifat fatal pada sapi dan kerbau. Kendala utama pengendalian penyakit ini adalah belum dapat diisolasi agen penyebabnya. Pada penelitian ini dilakukan isolasi sel limfoblastoid (LCL) dari sapi dan kerbau terserang MCF yang diperoleh dari kasus lapang di Kabupaten Banyuwangi. Kasus MCF juga telah diupayakan di Balitvet dengan menempatkan dua sapi Bali di bawah kandang domba. Kasus MCF didiagnosis dengan uji PCR dan dikonfirmasi dengan pemeriksaan histopatologik. Sebagai bagian dari penelitian ini dilakukan pula studi epidemiologi molekuler SA-MCF di Kabupaten Banyuwangi serta deteksi agen penyebab MCF pada sekresi domba dan anak domba di Balitvet. Hasil utama penelitian ini adalah telah diperoleh tiga biakan LCL, yaitu dua dari kerbau, dan satu dari sapi Rambon yang terserang MCF di Kabupaten Banyuwangi. Sedang dari sapi Brangus yang diduga terserang MCF di Banyuwangi, biakan LCL belum terlihat walaupun biakan sel kornea dan turbinat telah berhasil ditumbuhkan. Uji PCR terhadap salah satu sel LCL kerbau yaitu BWK-120 menunjukkan bahwa LCL tersebut mengandung fragmen DNA agen penyebab SA-MCF. Akan tetapi pada saat sel tersebut diinfeksi pada sapi Bali dan kerbau, hewan tersebut belum menunjukkan gejala klinik hingga laporan ini disusun. Sel LCL tersebut bersifat sitotoksik terhadap biakan sel lestari Mardin Darby Bovine Kidney (MDBK), ginjal monyet hijau Afrika (VERO), ginjal bayi hamster (BHK), dan ginjal babi (PK). Berdasarkan hasil penelitian ini disimpulkan bahwa telah diperoleh biakan sel limfoblastoid. Biakan sel ini memperkaya khasanah keragaman hayati jasad renik di Indonesia khususnya bidang virologi veteriner dan biakan tersebut dapat bermanfaat sebagai bahan pembuatan vaksin rekombinan MCF.

Kata kunci : Malignant Catarrhal Fever, biakan sel lestari limfoblastoid, *polymerase chain reaction*

PENDAHULUAN

Maligant catarrhal fever (MCF) atau ingusan adalah penyakit yang fatal dan *lymphoproliferative* yang menyerang sapi, kerbau dan rusa. Ada dua macam penyakit MCF dikenal di dunia yaitu WA-MCF (*Wildebeest-associated MCF*) atau MCF yang berkaitan dengan adanya hewan wildebeest, dan SA-MCF (*Sheep associated MCF*) atau MCF yang berkaitan dengan adanya domba (PLOWRIGHT, 1990). Secara klinik dan patologik kedua bentuk MCF tersebut tidak dapat dibedakan (YOUNG, 1988), tetapi keduanya dapat digolongkan ke dalam empat bentuk yaitu: perakut, intestinal, kepala dan mata serta bentuk kronik/subklinik (PLOWRIGHT, 1990).

Di Indonesia penyakit MCF yang dilaporkan adalah jenis SA-MCF. Penyakit ini pertama kali dilaporkan oleh Paszotta pada tahun 1894 terjadi pada kerbau di Kediri, Jawa Timur. Sejak itu penyakit tersebar di seluruh kepulauan di Indonesia (PARTADIREJA *et al.*, 1988). Selanjutnya

menurut Direktorat Jenderal Peternakan, Departemen Pertanian, MCF merupakan salah satu dari 13 penyakit penting yang mempunyai nilai strategis dan ekonomis di Indonesia. Pengendalian penyakit sejauh ini hanya dengan cara memisahkan ternak sapi atau kerbau dari domba yang merupakan hewan karier MCF. Dengan cara ini penyakit belum dapat dikendalikan secara efektif.

Kendala utama dalam pengendalian penyakit ini adalah belum adanya vaksin, karena agen penyebabnya belum dapat diisolasi. Ada beberapa virus yang dapat diisolasi dari kasus alami MCF, akan tetapi ternyata bukan penyebab utama MCF (PLOWRIGHT, 1990). Sedangkan agen penyebab WA-MCF telah dapat diisolasi, dan pertama kali diisolasi oleh PLOWRIGHT *et al.* (1960) yaitu Alcelaphinae Herpesvirus-1 (AHV-1) karena virus ini bisa diisolasi dari beberapa hewan anggota sub-famili Alcelaphinae. AHV-1 ini telah diklasifikasikan ke dalam sub-famili gammaherpesvirinae.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi agen penyebab SA-MCF di Kabupaten Banyuwangi dalam hal ini dengan memperoleh biakan sel lestari limfoblastoid (selanjutnya disebut LCL) dari sapi dan atau kerbau yang terserang MCF.

MATERI DAN METODE

Sampel

Organ yang diambil dari sapi dan kerbau yang terserang MCF antara lain kornea mata, turbinat, limfoglandula prefemoralis dan preskapularis, jantung, limpa, hati dan ginjal. Organ-organ tersebut diambil secara steril dan disimpan pada "transport" medium dingin (atau suhu 4°C) hingga diproses lebih lanjut di laboratorium.

Sampel sel darah putih perifer (PBL) diperoleh dengan cara mengambil darah berheparin. Sel darah merah dilisis dengan menggunakan ammoniumklorida 0,85%, dan PBL diendapkan dengan cara disentrifugasi 500 g selama 10 menit. Sel darah putih ini kemudian dicuci 2 kali menggunakan Phosphate Buffered Saline (PBS) steril (SAMBROOK *et al.*, 1989). Sel darah putih ini dimasukkan ke dalam flask steril dengan ditambah medium Iscove's dengan 10% Foetal Bovine Serum (FBS) dan *recombinant human interleukin 2* (rhIL-2).

Penyiapan LCL dari organ sapi dan atau kerbau yang terserang MCF

Penyiapan LCL sesuai dengan yang disarankan oleh REID *et al.* (1989). Sampel organ dipotong-potong dengan gunting lalu disuspensikan pada medium Escove's yang dilengkapi dengan 10% foetal bovine serum (FBS). Suspensi sel tersebut (kecuali kornea dan turbinat) disaring menggunakan kasa saring steril. Sejumlah 1×10^7 sel dimasukkan pada flask steril dan disimpan pada inkubator 37°C yang mengandung 5% CO₂. Untuk sel kornea dan turbinat pembiakan dilakukan dengan cara eksplan, yaitu potongan organ langsung ditanam pada flask. Pada setiap flask ditambahkan *recombinant human interleukin 2* (rhIL-2). Pertumbuhan se diamati setiap hari. Apabila pH medium biakan sel menurun (menjadi asam dicirikan dengan terjadinya perubahan warna dari merah menjadi kuning) medium diganti dengan yang segar.

Pengujian PCR terhadap LCL yang diperoleh

Dari sampel berupa LCL, asam deoksiribonukleat (DNA) diekstraksi dengan menggunakan fenol dan kloroform (SAMBROOK *et al.*, 1989). Ekstrak DNA tersebut diuji dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) (BAXTER *et al.*, 1993).

Uji Sitotoksitas LCL terhadap berbagai biakan sel monolayer

Biakan limfoblastoid (LCL) yang diperoleh diinokulasikan pada biakan lestari monolayer yaitu Mardin Darby Bovine Kidney (MDBK), ginjal monyet hijau Afrika (VERO), dan ginjal babi (PK). Pengaruh LCL terhadap pertumbuhan sel monolayer tersebut di atas diamati setiap hari.

Infeksi LCL pada sapi Bali dan kerbau

Biakan limfoblastoid yang diperoleh diinfeksi pada sapi Bali dan kerbau. Sebelum diinfeksi sapi Bali dan kerbau tersebut diperiksa secara klinik, dan PBLnya diuji dengan PCR.

Pemeriksaan histopatologik

Sampel organ dari hewan yang diduga terserang MCF disimpan pada larutan penyangga formalin. Sampel dalam formalin ini selanjutnya diproses dengan prosedur standard dan diwarnai dengan pewarnaan hematoxilin-eosin (HE) untuk pemeriksaan histopatologik.

HASIL

Kasus diduga MCF pada sapi dan kerbau di Banyuwangi

Pada tiga kali kunjungan di Banyuwangi diperoleh 4 kasus yang diduga terserang MCF. Kasus pertama yaitu seekor kerbau asal Dusun Wonosobo, Desa Srono, Kecamatan Gambiran, selanjutnya disebut sampel BWK-120. Gejala klinik yang ditunjukkan kerbau antara lain demam tinggi (40°C), depresi, anoreksia, tidak mau makan, hipersalivasi, erosi pada gusi, dispnoe, bulu berdiri, ataksia, pembesaran limfoglandula prescapularis, leleran seromukus dari mata dan hidung, dan kekeruhan kornea mata. Gambaran pasca mati yang terlihat antara lain perdarahan (haemorrhage) ringan pada miolard, abomasum, usus halus dan limpa, dan perdarahan berat pada trakhea dan kantung kencing.

Kasus kedua yaitu diperoleh seekor kerbau asal Dusun Kali Pahit, Desa Kendal Rejo, Kecamatan Tegaldlimo, selanjutnya disebut BWK-28. Gejala klinik yang ditunjukkan kerbau ini antara lain demam tinggi (40,5°C), pembesaran limfoglandula prescapularis, anoreksia, depresi, tidak mau makan, leleran seromukus dari mata dan hidung, dan kekeruhan kornea mata.

Kasus ketiga yaitu diperoleh sapi Rambon asal Dusun Kedung Dandang, Desa Tatan Rejo, Kecamatan Muncar, selanjutnya disebut BWSR-53. Gejala klinik yang ditunjukkan sapi Rambon ini antara lain demam tinggi (40,5°C), depresi, anoreksia, pembesaran limfoglandula prescapularis dan prefemoralis, leleran seromukus dari mata dan hidung dan kekeruhan kornea mata.

Kasus keempat yaitu diperoleh seekor sapi Brangus asal Dusun Pecemangan, Desa Buluagung, Kecamatan Pesanggaran, selanjutnya disebut BWBR-18. Gejala klinik yang ditunjukkan sapi Brangus ini antara lain demam tinggi (39,6°C), tidak nafsu makan, kekeruhan kornea mata dan keluar ingus encer dari hidung.

Pemeriksaan histopatologik kasus diduga terserang MCF

Hasil pemeriksaan histopatologik pada kerbau BWK-120 diperoleh kelainan splenitis, non supuratif pericarditis dan myocarditis, non supuratif interstitial pneumonia, non supuratif hepatitis, non supuratif encephalitis, lymphadenitis dan non supuratif nephritis. Kesemuanya patognomonik

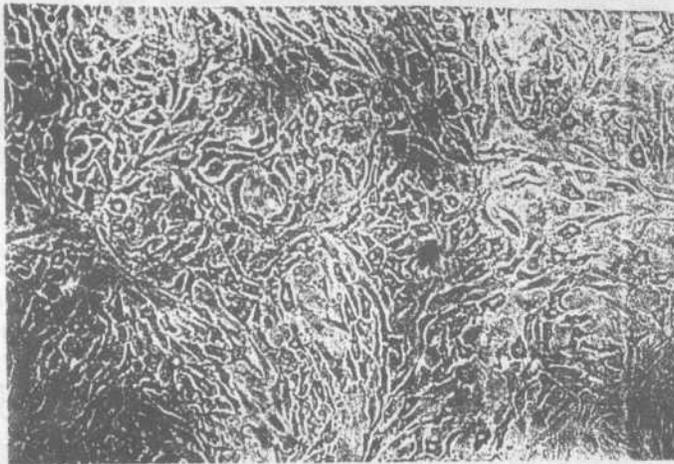
untuk lesi MCF karena lesi disertai vasculitis. Sedangkan sapi Rambon BWSR-53 secara histopatologik menunjukkan lesi MCF yang ditemukan pada paru-paru, hati, rete mirabile dan trakhea. Sedangkan sapi Brangus BWSR-18 pada pemeriksaan histopatologik tidak menunjukkan kelainan spesifik.

Pengujian PCR kasus diduga terserang MCF

Pada uji PCR, sampel PBL baik BWK-120, sapi Rambon BWSR-53, kerbau BWK-28 maupun BWBR-18 menunjukkan bahwa keempat hewan tersebut mengandung virus penyebab MCF.

Pengembangan LCL

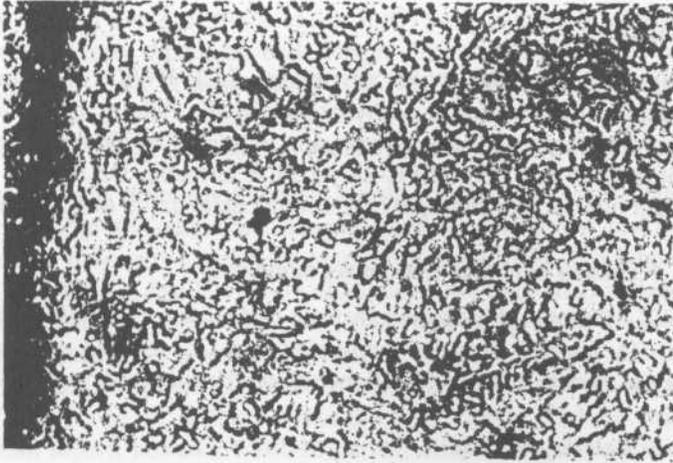
Dari kerbau BWK-120 sampel berupa kornea mata, turbinat, limfoglandula prefemoralis dan mesenterika, serta PBL dibiakan untuk memperoleh LCL. Biakan limfoglandula mesenterika dan prefemoralis, dan turbinat mengalami kontaminasi. Sedangkan biakan PBL mengalami degenerasi setelah dua minggu. Biakan eksplan kornea tumbuh subur, dan terhadapnya dilakukan pasase buta (*blind passage*) dengan mempertimbangkan kemungkinan sel limfoblastoid ada pada biakan tersebut. Pada pasase keempat setelah memasuki minggu ketujuh (setelah 44 hari sejak pertama kali dibiakan) biakan kornea tersebut mulai dipenuhi dengan pertumbuhan sel limfoblastoid (Gambar 1 dan 2). Sel limfoblastoid ini selanjutnya disebut LCL BWK-120 (Gambar 3).



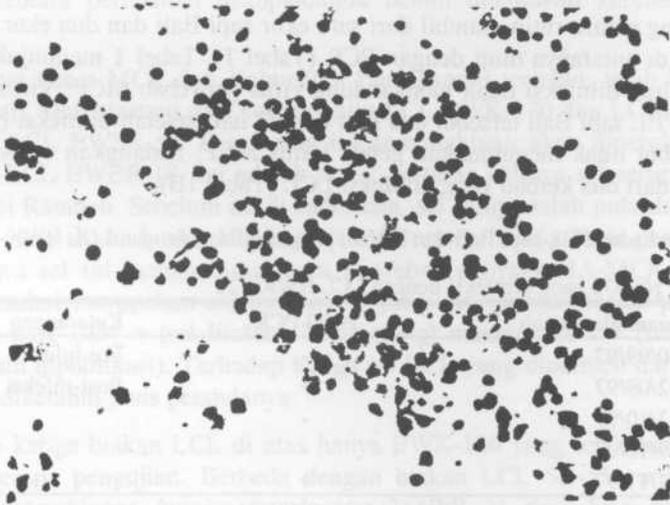
Gambar 1. Sel kornea BWK-120 sebelum tumbuh LCL

Biakan LCL juga diperoleh dari organ kornea mata dari sapi Rambon BWSR-53 dan kerbau BWK-28. Biakan eksplan kornea BWSR-53 dan BWK-28 tumbuh subur. Kemudian dilakukan pasase setiap 1 minggu sekali. Hingga saat ini, LCL telah tampak tumbuh pada eksplan kornea walaupun jumlahnya masih sangat sedikit sehingga belum dapat dilakukan penelitian lebih lanjut.

Sementara itu, dari sapi Brangus (BWBR-18), pada minggu kedua setelah penyiapan sel, biakan sel kornea mulai tumbuh subur. Sedangkan sel monolayer turbinat berhasil diperoleh mulai minggu keempat. Namun demikian, biakan sel kornea maupun turbinat sapi Brangus belum terlihat pertumbuhan.



Gambar 2. Sel kornea BWK-120 diiringi dengan pertumbuhan LCL



Gambar 3. Biakan BWK-120 yang diwarnai dengan HE

Uji pertumbuhan LCL yang diperoleh

Biakan LCL BWK-120 ditumbuhkan pada medium escove's ber rHL-2 tanpa sel makanan (*feeder layer*) yang berupa biakan sel kornea. Namun hingga saat ini, LCL ini belum dapat ditumbuhkan tanpa sel makanan. Sehingga agar LCL BWK-120 tetap tumbuh maka dilakukan inokulasi LCL ke eksplan kornea yang baru berasal dari eksplan kornea anak sapi Bali yang sengaja dipotong untuk pembuatan *feeder layer*. Sedangkan untuk BWSR-53 dan BWK-28 masih diupayakan untuk memperbanyak LCL yang telah berhasil tumbuh, sehingga uji ini belum dapat dilaksanakan pada kedua LCL tersebut.

Pengujian PCR terhadap LCL

Pada uji terhadap DNA yang diekstraksi dari biakan LCL BWK-120 menunjukkan bahwa LCL tersebut mengandung fragmen virus penyebab SA-MCF. Hal ini berarti BWK-120 yang diperoleh atau diisolasi dari eksplan kornea kerbau yang terinfeksi MCF membawa agen penyebab MCF. Sedangkan untuk BWSR-53 dan BWK-28 uji PCR terhadap DNA yang diekstraksi dari biakan LCL belum dapat dilakukan mengingat LCL belum cukup untuk diekstraksi.

Uji sitotoksitas LCL terhadap berbagai biakan sel monolayer

Biakan LCL BWK-120 telah diinokulasikan pada biakan lestari MDBK, VERO, BHK, dan PK pada pelat steril 24 lubang. Ternyata pertumbuhan LCL tersebut merusak keempat se monolayer di atas. Hal ini berarti LCL BWK-120 memiliki efek sitotoksik pada biakan monolayer.

Infeksi LCL pada sapi Bali dan kerbau

Biakan LCL BWK-120 telah diinfeksi pada seekor sapi Bali dan dua ekor kerbau yang secara klinis normal dan dengan uji PCR terhadap PBL-nya tidak menunjukkan sedang terinfeksi MCF.

Sampel PBL yang secara rutin diambil dari satu ekor sapi Bali dan dua ekor kerbau tersebut masing-masing lima di antaranya diuji dengan PCR (Tabel 1). Tabel 1 menunjukkan bahwa sapi Bali dan kerbau sebelum diinfeksi tidak mengandung virus penyebab MCF. Virus penyebab MCF dapat dideteksi dari PBL sapi Bali tersebut dua hari dan 22 hari setelah diinfeksi (Tabel 1A), akan tetapi sapi Bali tersebut tidak menunjukkan gejala klinis MCF. Sedangkan virus penyebab MCF tidak dapat dideteksi dari dua kerbau yang diinfeksi LCL (Tabel 1B).

Tabel 1. Uji PCR terhadap PBL sapi Bali dan kerbau yang diinfeksi dengan LCL BWK-120

A. Satu ekor sapi Bali No.973 yang diinfeksi dengan LCL BWK-120				
No.	Tanggal pengambilan darah	Hasil PCR		Keterangan
1.	10/09/97	-	-	Pre-infeksi
2.	12/09/97	+	-	Post-infeksi
3.	13/10/97	-	-	
4.	29/10/97	-	-	
5.	01/11/97	+	-	

B. Dua ekor kerbau No. 921 dan 925 yang diinfeksi LCL BWK-120				
No.	Tanggal pengambilan darah	Hasil uji PCR		Keterangan
		K-921	K-925	
1.	10/12/97	-	-	Pre-infeksi
2.	11/12/97	-	-	Post-infeksi
3.	12/12/97	-	-	
4.	15/12/97	-	-	
5.	22/12/97	-	-	

PEMBAHASAN

Penelitian mengenai pengembangan biakan LCL sebenarnya mengacu pada hasil penelitian di Moredun Research Institute, Edinburgh, Inggris yang telah berhasil melakukan terobosan yang sangat penting dalam penelitian MCF yaitu dengan berhasil diperolehnya biakan sel limfobalstoid

(LCL) dari kelinci, rusa dan sapi (REID *et al.*, 1989) yang berasal dari kasus SA-MCF di Inggris. Biakan tersebut dapat terus dipelihara baik dengan ditumbuhkan pada sel hidup sebagai makanan (*feeder layer*) maupun dengan penambahan rhIL-2. Biakan sel ini mengandung gen DNA dari virus SA-MCF, tidak dalam bentuk utuh. Dengan jumlah biakan sel sekecil 100 sel, dapat menyebabkan kasus SA-MCF pada kelinci apabila diinfeksi sel tersebut (REID *et al.*, 1989).

Pada penelitian ini, diagnosis terhadap keempat kasus alami yang diduga terserang MCF di Kabupaten Banyuwangi dilakukan baik dengan pemeriksaan standar histopatologik dan uji PCR. Hasil kedua metoda diagnosis tersebut menunjukkan bahwa tiga dari empat yaitu hewan dengan nomor BWK-120, BWK-28 dan BWSR-53 didiagnosis MCF, sedangkan hewan BWBR-18 dengan uji PCR terbukti membawa agen penyebab MCF tapi pada pemeriksaan histopatologik belum menunjukkan perubahan yang spesifik. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa antara uji PCR dan pemeriksaan histopatologik terdapat kesesuaian terutama pada kasus yang secara klinis diduga MCF (WIYONO *et al.*, 1994a; WIYONO *et al.*, 1994b). Hal ini sesuai dengan tiga kasus pertama. Kejadian seperti hewan BWBR-18 pernah dilaporkan pada penelitian di Rumah Potong Perorangan di Cisarua, Jawa Barat (WIYONO, data belum dipublikasi), terutama pada kerbau yang dipotong pada masa inkubasi awal MCF. Besar kemungkinan ini terjadi karena uji PCR sangat spesifik (BAXTER *et al.*, 1993) sehingga agen penyebab MCF dalam jumlah sedikit pun dapat dideteksi, sementara perubahan histopatologik belum ditemukan karena hewan masih dalam inkubasi awal.

Dari empat kasus MCF dari Kabupaten Banyuwangi tersebut, telah berhasil diperoleh tiga biakan sel lestari limfoblastoid dari kerbau yaitu LCL BWK-120 dan LCL BWK-28 dan dari sapi Rambon yaitu LCL BWSR-53. Disamping itu kemungkinan akan diperoleh satu LCL dari sapi Brangus yaitu LCL BWBR-18. Ini adalah untuk pertama kalinya sel serupa dapat diperoleh dari kerbau dan sapi Rambon. Sebelum ini di Indonesia, sel serupa telah pula dapat diperoleh dari satu ekor sapi Bali yang secara buatan ditulari MCF (WIYONO, 1996). Pada pemeriksaan pendahuluan diketahui bahwa sel ini mengandung agen penyebab penyakit SA-MCF. Biakan LCL tersebut kemudian diketahui merupakan sel limfosit T, yang mempunyai kedua 'petanda' (*marker*) pada permukaannya baik CD4 + (sel limfosit T penolong) maupun CD8 + (sel limfosit T sitotoksik) (WIYONO, belum dipublikasi). Terhadap ketiga sel LCL yang diperoleh dari pada penelitian MCF kali ini belum diketahui jenis petandanya.

Di antara ketiga biakan LCL di atas hanya BWK-120 yang telah tumbuh banyak dan telah dilakukan beberapa pengujian. Berbeda dengan biakan LCL SB-55 yang dapat tumbuh tanda penambahan *recombinant human interleukin 2* (rhIL-2) dari luar (*exogenous interleukin*) (WIYONO, 1996), maka pertumbuhan biakan LCL BWK-120 masih tergantung baik pada rhIL-2 maupun pada *feeder layer*. Sungguhpun demikian biakan LCL BWK-120 tersebut ternyata mempunyai sifat sitotoksik terhadap beberapa biakan sel lestari seperti dilaporkan oleh REID *et al.* (1989). Adapun kemudian diketahui bahwa biakan LCL BWK-120 ini tidak mengakibatkan kerbau dan sapi Bali terserang MCF setelah diinfeksi dengan biakan LCL tersebut. Sebenarnya hal ini hampir sama dengan yang ditemukan oleh REID *et al.* (1989). Mereka telah menemukan biakan LCL yang diperoleh dari rusa dan beberapa jenis sapi di Inggris, ternyata hanya biakan LCL yang berasal dari rusa saja yang infeksi (REID *et al.*, 1989). Penelitian sebelumnya di Balitvet menemukan bahwa biakan LCL asal sapi Bali (LCL SB-55) bersifat infeksi pada kelinci, sedangkan turunan (pasase lanjutan) biakan LCL SB-55 ini (LCL BJ-880) bersifat infeksi baik pada kelinci maupun pada sapi Bali (WIYONO, data belum dipublikasi).

Sementara itu hasil infeksi buatan dengan LCL BWK-120 pada sapi Bali dan kerbau yang tidak menyebabkan hewan tersebut terjangkit MCF namun pada PBL sapi Bali mengandung fragmen DNA agen penyebab MCF, hal ini menunjukkan bahwa sapi Bali tersebut sebenarnya telah terinfeksi. Besar kemungkinan bahwa sapi Bali tersebut telah terinfeksi secara sub-klinik. Sejak uji PCR digunakan pada studi epidemiologi molekuler pada ruminansia besar di beberapa wilayah di Indonesia, fenomena infeksi sub-klinik memang telah ditemukan (WIYONO, data belum dipublikasi).

Berdasarkan hasil penelitian ini, disimpulkan bahwa biakan LCL telah diperoleh dari kasus MCF di Banyuwangi. Namun sesungguhnya hal ini baru awal dari beberapa tahap penelitian lebih lanjut yang mutlak harus dilakukan hingga hasil penelitian ini dapat diaplikasikan pada pembuatan vaksin rekombinan. Terlebih dahulu terhadap biakan LCL tersebut harus diketahui jenis sel dan petanda biakan LCL, sifat pertumbuhannya pada biakan selapis (*monolayer*), dan infektifitasnya pada beberapa jenis hewan percobaan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Drh. Sigit, Kepala Dinas Peternakan Kabupaten Banyuwangi yang telah mengijinkan pelaksanaan kegiatan lapang. Ucapan terimakasih juga ditujukan kepada Drh. Satryo Aribowo, Kepala Laboratorium Tipe C Dinas Peternakan Kabupaten Banyuwangi, dan Drh. Budi, Kepala Seksi Kesehatan Hewan Dinas Peternakan Kabupaten Banyuwangi yang telah banyak membantu kegiatan di lapang. Pengambilan sampel dilaksanakan bekerjasama dengan penelitian MCF lainnya yang dipimpin oleh Dr. Sudarisman, MS. Penelitian ini dilaksanakan dengan biaya APBN tahun anggaran 1997-1998.

DAFTAR PUSTAKA

- BAXTER, S.I.F., I. POW, A. BRIDGEN, and H.W. REID. 1993. Polymerase chain reaction detection of the sheep-associated agent of malignant catarrhal fever. *Arch. Virol.* 132:145-159.
- PARTADIREJIA, M., I.G. SUDANA, and SUSILO. 1988. Malignant catarrhal fever in Indonesia. Malignant Catarrhal Fever in Asian Livestock. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra. p.14-18.
- FLOWRIGHT, W. 1990. *Malignant Catarrhal Fever Virus*. In : *Virus Infections of Ruminants*. Eds. Z DINTER and B MOREIN. Elsevier Science Publishers BV. pp.123-150.
- FLOWRIGHT, W., R.D. FERRIS, and G.R. SCOTT. 1960. Blue wildebeest and the aetiological agent of bovine malignant catarrhal fever. *Nature* 188:1167-1169.
- REID, H.W., D. BUXTON, I. POW, and J. FINLAYSON. 1989. Isolation and characterization of lymphoblastoid cells from cattle and deer affected with 'sheep-associated' malignant catarrhal fever. *Res. Vet. Sci.* 47:90-96.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH, and T. MANIATIS. 1989. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- WIYONO, A., S.I.F. BAXTER, M. SAEPULLOH, R. DAMAYANTI, P.W. DANIELS, and H.W. REID. 1994a. PCR detection of ovine herpesvirus-2 DNA in Indonesian ruminants - normal sheep and clinical cases of malignant catarrhal fever. *Vet. Microbiol.* 42: 45-52.
- WIYONO, A., S.I.F. BAXTER, M. SAEPULLOH, SUDARISMAN, R. DAMAYANTI, P.W. DANIELS, dan H.W. REID. 1994b. Diagnosis malignant catarrhal fever di Indonesia dengan menggunakan teknik reaksi berantai polimerase (PCR). Prosiding Seminar Nasional Teknologi Veteriner untuk Meningkatkan Kesehatan

Hewan dan Pengamanan Bahan Pangan Asal Ternak. Bogor 22-24 Maret 1994. Balai Penelitian Veteriner. Bogor. p.112-120.

WIYONO, A. 1996. Pengaruh human interleukin-2 pada pertumbuhan biakan sel lestari limfoblastoid asal kasus MCF pada sapi Bali. Dalam. Prosiding Temu Ilmiah Nasional Bidang Veteriner. Bogor 12-13 Maret 1996. Balai Penelitian Veteriner. Bogor. p.73-81.

YOUNG, M.P., SUDARISMAN, P.L. YOUNG, P. RONOARDJO, and P.W. DANIELS. 1988. Malignant Catarrhal Fever in Bali cattle. In : *Malignant Catarrhal Fever in Asian Livestock*. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra. p. 68-72.
