

Pelacakan Gen *Env-TM* Virus Penyakit Jembrana Galur Tabanan 1995 dengan Metode *Nucleic Acid Sequence Based Amplification*

**(DETECTION ENV-TM GENE OF JEMBRANA DISEASE VIRUS OF TABANAN 1995
STRAIN BY NUCLEIC ACID SEQUENCE BASED AMPLIFICATION METHOD)**

**Asmarani Kusumawati^{1,4}, Atik Ratnawati^{3,4},
Ida Arlita Wulandari^{4,5}, Sri Hartati², Tri Untari⁶**

¹Bagian Reproduksi, ²Bagian Ilmu Penyakit Dalam, ⁶Bagian Mikrobiologi
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,
Jln. Fauna No. 2, Karang Malang, Yogyakarta Telp (0274) 560863.

³Bagian Virologi, Balai Besar Penelitian Veteriner,
Jln. RE Martadinata No. 30 Bogor

⁴Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana, UGM
Jln. Teknik Utara, Berek, Yogyakarta

⁵Pusat Veteriner Farma, Jln. Jendral A. Yani 68-70, Surabaya
E-mail: kartapati_2008@yahoo.com

ABSTRAK

Penyakit jembrana pada sapi bali disebabkan oleh *Lentivirus* yang disebut virus penyakit jembrana (VPJ), mengakibatkan sindrom penyakit yang bersifat berat dan akut, hingga menyebabkan kematian dengan masa inkubasi yang pendek. Penyakit jembrana telah menyebar ke beberapa daerah di Indonesia, sehingga sangat diperlukan metode deteksi dini penyakit jembrana yang dapat diaplikasikan secara sederhana dan cepat. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menerapkan metode diagnosis cepat VPJ galur Tabanan 1995 dengan metode berbasis *Nucleic Acid Sequence Based Amplification* (NASBA) pada gen *env-TM*. Tahapan penelitian meliputi isolasi RNA sampel jaringan limpa, hati, paru, limfonodus preskapularis, limfonodus prefemoralis, dan darah yang terinfeksi VPJ galur Tabanan 1995. Amplifikasi RNA dengan NASBA pada gen *env-TM* menggunakan penangas air atau *waterbath* dan selanjutnya dilakukan pemisahan fragmen RNA hasil amplifikasi secara elektroforesis pada gel agarose 2%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sampel jaringan sapi bali pengidap VPJ galur Tabanan 1995 berupa limpa, hati, paru, limfonodus preskapularis dan limfonodus prefemoralis serta darah memberikan hasil positif yang ditunjukkan dengan adanya fragmen RNA gen sebesar 207 bp. Pada penelitian ini, metode amplifikasi isothermal NASBA mampu melacak gen *env-TM* VPJ galur Tabanan 1995.

Kata-kata kunci: sapi bali, NASBA, gen *env-TM*, VPJ, galur Tabanan 1995

ABSTRACT

Jembrana disease is an infectious disease in Bali cattle cause by a member of lentivirus called jembrana disease virus (JDV). It causes an acute and severe disease syndrome with short incubation period. As the disease has spread to several areas in Indonesia, a simple and rapid detection method is required. The objective of this study to apply rapid diagnostic method for JDV Tabanan 1995 strain based on Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) methods targeting *env-tm* gene. The steps of this research consisted of viral RNA isolation from organ and blood of cattle experimentally infected with JDV Tabanan 1995 strain. RNA amplification was conducted by NASBA using *waterbath*. The NASBA products were then separated on 2 % agarose gel. Using this technique JDV positive result was obtained from organ samples such as spleen, liver, lung, prefemoralis lymph node, prescapularis lymph node and blood generating a RNA fragment of 207 bp. In this study, diagnosis method for *env tm* of JDV Tabanan 1995 strain can be conducted by isothermal amplification NASBA.

Keywords: Bali cattle, NASBA, *env-TM* gene, JDV, Tabanan 1995 strain

PENDAHULUAN

Virus penyakit jembrana (VPJ) merupakan agen penyakit jembrana (PJ) pada sapi bali (*Bos javanicus*) yang diidentifikasi sebagai anggota dari famili *retrovirinae* (Kertayadnya *et al.*, 1993), subfamili *lentiviridae* (Chadwick *et al.*, 1995^b), memiliki materi genetik ssRNA polarisasi negatif. *Lentivirus* memiliki bentuk bulat kasar dengan diameter 80-100 nm dan diselubungi partikel amplop yang terdiri atas lapisan lipid ganda organisma. Virus penyakit jembrana sensitif terhadap panas, deterjen, dan formaldehid (Goff, 2001). Genom VPJ terdiri atas 7.732 basa nukleotida. Seperti halnya genom *lentivirus* lainnya, genom VPJ memiliki tiga gen utama atau gen struktural yang menyandi protein penting yaitu *gag*, *pol*, dan *env*, serta *long terminal repeats* (LTR) yang merupakan karakter *retrovirus* (Chadwick *et al.*, 1995^b).

Salah satu gen protein struktural VPJ adalah gen *env*, terdiri atas dua subunit, yaitu subunit *su* dan subunit *tm*. Panjang gen *env* adalah sekitar 2.400 basa, terbagi atas subunit *su* sepanjang 1.300 basa dan subunit *tm* sepanjang 1.100 basa (Chadwick *et al.*, 1995^b). Gen *env* diekspresikan menjadi sebuah prekursor *Env* dan kemudian dimaturasi menjadi protein permukaan yaitu (*surface unit*/(SU) dan protein *transmembran* (TM). Kedua protein tersebut berperan sangat penting dalam proses masuknya virus dalam sel inang. Protein permukaan (SU) memengaruhi tropisma virus dan mengenali reseptor spesifik dari sel inang. Protein TM berperan pada proses masuknya virus ke dalam sel inang dengan melakukan fusi antara *envelope* virus dengan membran sel inang (Chadwick *et al.*, 1995^b; Burkala *et al.*, 1998). Protein TM memiliki karakteristik region yang sangat konservatif dan imunogenik sehingga disebut sebagai daerah imunodominan utama (*Principle Immunodominant Region*/PIR), yang memungkinkan terjadinya bagian internal virus memasuki sitoplasma sel target (Sherman dan Greene, 2002).

Diagnosis VPJ selama ini didasarkan pada deteksi serologis yaitu teknik ELISA (Hartaningsih *et al.*, 1993) dan *Western Blotting* (Kertayadnya *et al.*, 1993). Selain itu deteksi VPJ juga didasarkan pada amplifikasi asam nukleat yaitu amplifikasi provirus VPJ dengan PCR (Desport *et al.*, 2007), kuantifikasi virus dalam plasma dengan qRT-PCR (Stewart *et al.*, 2005) dan amplifikasi gen target *env-TM* dengan RT PCR (Kusumawati *et al.*, 2003).

Dengan sistem isothermal, teknik *nucleic acid sequence based amplification* (NASBA) dapat dilakukan dalam penangas air/*waterbath*. Berbeda dengan teknik PCR yang membutuhkan siklus dan perbedaan suhu dalam setiap tahap reaksi sehingga mengharuskan penggunaan perangkat spesifik seperti *thermal cycler* (Deiman *et al.*, 2002). Karena bekerja pada kondisi isotermik, dengan menggunakan penangas air, NASBA dapat diaplikasikan pada laboratorium sederhana.

Aplikasi dan pengembangan metode NASBA telah banyak dikembangkan untuk tujuan deteksi berbagai agen patogen seperti virus, bakteri, jamur, parasit, dan juga sel tumor (Burchill *et al.*, 2002; Loens *et al.*, 2005). Menurut Compton (1991) teknologi NASBA dapat diaplikasikan untuk penapisan jaringan makanan/*food screening*, diagnostik veteriner, akuakultur dan juga ilmu forensik. Secara keseluruhan, NASBA mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi dan merupakan alternatif selain RT-PCR (Lau *et al.*, 2006).

Kelebihan teknik NASBA dibandingkan dengan RT-PCR adalah karakteristik reaksi yang berlangsung dalam suhu isothermal 41°C sehingga dapat dilakukan dengan menggunakan alat sederhana seperti penangas air dengan pengatur suhu. Tingginya efisiensi amplifikasi teknik NASBA disebabkan oleh kondisi isothermal reaksi, sehingga tidak ada waktu yang terbuang akibat perubahan suhu. Risiko kontaminasi NASBA dapat dihindari karena tidak ada proses transkripsi balik (Loens *et al.*, 2005). Produk NASBA berupa ssRNA merupakan target ideal untuk deteksi berbagai metode termasuk hibridisasi probe tanpa denaturasi (Sooknunan *et al.*, 1995; Deiman *et al.*, 2002). Efisiensi proses eksponensial kinetik pada NASBA disebabkan oleh perbanyakan produksi kopi RNA dari cDNA dengan proses transkripsi. Selain itu produk RNA dapat disekuena secara langsung dengan metode dideoksi menggunakan *Reverse Transcriptase* dan primer oligonukleotida berlabel (Deiman *et al.*, 2002).

Kekurangan teknik NASBA dibandingkan dengan RT-PCR adalah suhu rendah pada proses NASBA dapat meningkatkan interaksi primer nonspesifik. Namun, interaksi ini dapat diminimalkan dengan penambahan *dimethyl sulfoxide* (DMSO). Tahap *single melting* diperlukan untuk proses penempelan primer ke target. Enzim NASBA bersifat termolabil sehingga hanya dapat ditambahkan setelah tahap *melting*. Suhu reaksi NASBA tidak

melebihi 42°C. Selain itu panjang sekuen target yang dapat diamplifikasi secara efisien terbatas pada 100-250 nukleotida (Deiman *et al.*, 2002).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendiagnosis gen *env-TM* VPJ, penyakit jembrana galur Tabanan 1995 dengan metode yang berbasis amplifikasi isothermal NASBA. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan untuk penelitian selanjutnya yang berguna untuk program pengendalian penyakit jembrana di Indonesia.

METODE PENELITIAN

Desain Primer

Desain primer dibuat dengan program *Primer3Plus* berdasarkan sekuen gen *env-TM* VPJ galur Tabanan 1995 (Kusumawati *et al.*, 2003). Kandidat primer selanjutnya dikalkulasikan dengan perangkat *oligocalculator online* untuk melihat kemungkinan terbentuknya *hairpin loop* dan *self annealing*. Kandidat primer disimulasikan secara *in silico* PCR ke dalam perangkat lunak program *Fast PCR*. Kandidat primer dianalisis dengan *Basic Local Alignment Search Tool nucleotide* (BLASTn) untuk melihat homologinya terhadap gen *env-TM* JDV.

Ekstraksi Sampel RNA

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah jaringan yang disimpan beku dan plasma darah sapi bali terinfeksi VPJ galur Tabanan 1995 (koleksi Kusumawati). Ekstraksi RNA dilakukan pada sampel plasma darah dan jaringan sapi bali berupa limpa, hati, paru-paru, limfonodus preskapularis, dan limfonodus prefemoralis yang terinfeksi VPJ galur Tabanan 1995. Sampel jaringan memerlukan perlakuan awal yaitu, sebanyak 50-100 mg masing-masing jaringan dihancurkan secara elektrik pada perangkat *micropestle* sampai halus. Ekstraksi sampel RNA dari jaringan dan plasma darah dilakukan dengan menggunakan *High Pure Viral RNA Kit* (Roche®) berdasarkan petunjuk perusahaan.

Kontrol Positif pGEX-TM

Gen *env-TM* JDV galur Tabanan 1995 sebelumnya telah berhasil diinsersi ke dalam vektor plasmid pGEX-2T menghasilkan plasmid rekombinan pGEX-TM (Kusumawati *et al.*, 2003), disimpan di dalam *Luria Bertani* cair

dengan kandungan 50% gliserol. Isolasi plasmid pGEX-TM rekombinan hasil transformasi pada sel kompeten *E.coli* DH5 α dilakukan dengan menggunakan *Gene Jet Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) berdasarkan petunjuk perusahaan.

Amplifikasi dan Deteksi Produk NASBA

Metode NASBA untuk deteksi gen *env-TM* VPJ galur Tabanan 1995 mengikuti metode Malek *et al.* (1994) dan Sooknanan *et al.* (1995) dengan modifikasi. Setiap target diamplifikasi dalam volume reaksi 25 μ L, yang terdiri atas: 10 μ L 2,5X buffer NASBA [40mM Tris-HCl (pH 8,5), 12 mM MgCl₂, 70 mM KCl, 1 mM dNTP (Roche®), 4,1 mM NTP (Roche®)]; 1 μ L 250 mM DDT; 6,25 μ L 4X primer mix [DMSO 15%, primer JTNE/P2 dan JTNRT7/P1 (5 μ M), *nuclease free water*]; 2 μ L enzim mix [0,13 μ L 20 mg/mL BSA, 0,2 U/ μ L RNase-H (Roche®), 8 U/ μ L AMV-RT (Roche®), 40 U/ μ L T7 RNA Polimerase (Roche®)]; 5 μ L sampel RNA; dan *nuclease free water* sehingga volume akhir 25 μ L. Kontrol positif berupa plasmid pGEX-TM rekombinan hasil rekombinasi antara plasmid pGEX-2T dengan gen *env-TM* pada penelitian sebelumnya (Kusumawati *et al.*, 2003), sedangkan kontrol negatif berupa dH₂O. Desain primer NASBA untuk amplifikasi gen *env-TM* VPJ galur Tabanan 1995 disajikan pada Tabel 1.

Proses amplifikasi RNA dengan NASBA dilakukan dengan inkubasi menggunakan penangas air pada suhu 65°C selama lima menit dan dilanjutkan dengan 41°C selama lima menit, kemudian ditambahkan 2 μ L campuran enzim. Inkubasi dilanjutkan pada 41°C selama 90 menit. Pada kontrol pGEX-TM ada perlakuan terlebih dahulu yaitu inkubasi 95-100°C selama lima menit untuk denaturasi dsDNA menjadi ssDNA. Produk NASBA berupa ssRNA antisense (Kievits *et al.*, 1991; Deiman *et al.*, 2002).

Untuk melakukan elektroforesis RNA diperlukan suatu *gel agarose* dengan konsentrasi 2%, dengan pewarna asam nukleat *GoodView*TM (SBS Bio) dalam larutan buffer *Tris-Acetic* EDTA (TAE) satu kali. Pemisahan dilakukan dalam *apparatus* elektroforesis pada tegangan listrik sebesar 100 volt, selama 30 menit. *Ladder* DNA disertakan sebagai *marker* dan visualisasi pita RNA melalui UV *Transilluminator* dan didokumentasi dengan kamera digital *Ixus* (Canon). Hasil positif untuk NASBA ditunjukkan dengan munculnya fragmen RNA pada 207 bp.

Tabel 1. Sekuens primer *nucleic acid sequence based amplification* (NASBA)

Primer	Sequence nukleotida 5'-3'	Produk (bp)	Posisi (bp)
JTNF/ P2	CCCGCTCAGTCTGTAGTCC	207	846-865
JTNRT7/P1	*AATTCTAATACGACTCACTATAGGG TCGGGGATATCTTCCTCTT		1033-1052

Keterangan: sekuen dengan cetak miring adalah sekuen promotor T7 RNA polimerase.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Desain Primer

Primer yang dirancang, dicek menggunakan perangkat lunak/software *in silico* PCR dengan *FastPCR* yang menggunakan cetakan gen *env-TM* JDV galur Tabanan 1995 (Kusumawati et al., 2010). Hasil *in silico* PCR dengan *FastPCR* menunjukkan primer menghasilkan ampikon dengan ukuran 207 bp sesuai dengan salah satu persyaratan primer NASBA yaitu produk NASBA berkisar antara 100-250 bp (Deiman et al., 2002; Loens et al., 2005). Hasil *Basic Local Alignment Search Tool nucleotide* (BLASTn) sekuen nukleotida rancangan primer dengan database sekuen nukleotida menunjukkan primer yang dirancang homolog dan spesifik hanya pada gen *env-TM* (Kusumawati, data tidak dipublikasikan). Metode NASBA mengamplifikasi gen *env-TM* yang berada pada nukleotida 6463 hingga 7541 sepanjang 1079 bp dengan produk 207 bp memiliki tingkat homologi tinggi yang menunjukkan bahwa gen *env-TM* JDV merupakan gen konservatif (Chadwick et al., 1995^{ab}; Desport et al., 2007).

Senyawa RNA hasil isolasi sampel jaringan berupa limpa, hati, paru-paru, limfonodus preskapularis, limfonodus prefemoralis, dan plasma darah yang terinfeksi VPJ galur Tabanan 1995 selanjutnya digunakan sebagai cetakan / *template* uji NASBA dengan kontrol positif plasmid rekombinan pGEX-TM.

Amplifikasi dan Deteksi Produk NASBA

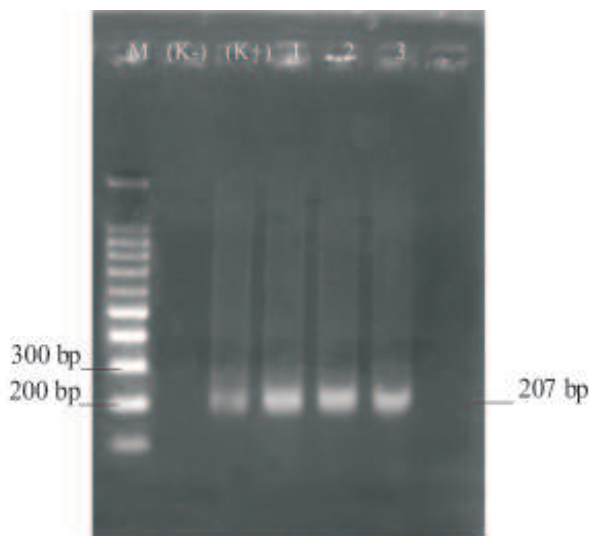
Metode NASBA telah dikembangkan dan dioptimasi untuk mendeteksi gen *env-TM* VPJ galur Tabanan 1995 (Kusumawati, data tidak dipublikasikan). Secara umum teknik NASBA membutuhkan waktu sekitar 90 menit untuk melakukan reaksi amplifikasi, relatif singkat jika dibandingkan dengan teknik RT PCR. Tingginya efisiensi amplifikasi teknik NASBA disebabkan oleh kondisi isothermal reaksi, tidak

memerlukan mesin *thermal cycler*, sehingga tidak ada waktu yang terbuang akibat perubahan suhu.

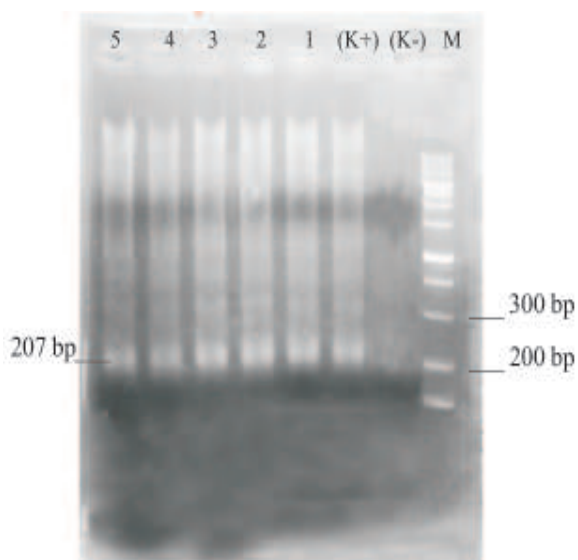
Hasil elektroforesis pada sampel plasma darah disajikan pada Gambar 1. Lajur M adalah DNA *Ladder* (*Marker*) yang berukuran 100 bp. Pada Gambar 1, fragmen RNA hasil amplifikasi NASBA berukuran 207 bp yang merupakan bagian gen penyandi *env-TM* pada VPJ terlihat pada lajur 1 sampai 3. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ketiga sampel plasma darah tersebut mengandung gen *env-TM* VPJ galur Tabanan 1995. Hasil amplifikasi ini sesuai dengan optimasi NASBA sebelumnya yang dilakukan oleh Kusumawati (data tidak dipublikasikan). Amplifikasi menggunakan NASBA merupakan suatu metode alternatif selain PCR yang cepat dan efektif untuk mendeteksi gen *env-TM* VPJ galur Tabanan 1995.

Selanjutnya, hasil elektroforesis pada sampel jaringan yang terdiri dari limpa, hati, paru-paru, limfonodus preskapularis, dan limfonodus prefemoralis disajikan pada Gambar 2. *Marker* atau DNA *ladder* yang digunakan berukuran 100 bp. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya fragmen RNA pada gen *env-TM* sebesar 207 bp yang menunjukkan bahwa sampel tersebut adalah gen *env-TM* VPJ galur Tabanan 1995. Hasil positif ditunjukkan pada semua sampel jaringan (lajur 1 sampai dengan lajur 5), hal tersebut memperlihatkan bahwa lima sampel jaringan tersebut mengandung gen *env-TM* VPJ galur Tabanan 1995. Gen *env-TM* merupakan gen yang *conserved* pada berbagai galur VPJ yang ditemukan di Indonesia yaitu galur Tabanan 1995, Tabanan 2001, Badung 1999, Badung 2004, Kalimantan 2004, Negara 1999, Negara 2004, dan Pulukan 2001 (Desport et al., 2007). Hal tersebut sesuai dengan hasil amplifikasi gen target *env-TM* dengan NASBA.

Menurut Jean et al. (2001) dan Starkey et al. (2006), metode NASBA lebih sensitif dari RT-PCR. Inkubasi NASBA selama 90-120 menit



Gambar 1. Hasil uji NASBA pada sampel plasma darah. Elektroforesis pada gel agarosa 2% dengan tegangan listrik 100 volt. Lajur (1-3): plasma darah sapi bali diinfeksi VPJ galur Tabanan 1995; M: Marker DNA 100 bp; K(+): kontrol positif pGEX-TM; (K-): kontrol negatif dengan dH₂O. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pita pada ukuran 207 bp.



Gambar 2. Hasil uji NASBA pada jaringan. Elektroforesis pada gel agarosa 2% dengan tegangan listrik 100 volt. (1): limpa; (2): hati; (3): paru; (4): limfonodus prescapula; (5): limfonodus prefemoralis. M: Marker DNA 100 bp; (K-): kontrol negatif dengan dH₂O; (K+): kontrol positif pGEX-TM. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pita pada ukuran 207 bp.

meningkatkan hasil amplifikasi hingga 10⁹ kali. Proses NASBA membutuhkan jumlah siklus yang lebih sedikit dari pada RT-PCR. Jumlah molekul pada RT-PCR meningkat dua kali lipat pada tiap siklus, sehingga membutuhkan waktu sekitar 20 siklus untuk menghasilkan amplicon sebanyak satu juta (10⁶) kali lipat. Reaksi NASBA menghasilkan 10-100 kopi RNA setiap tahap transkripsi, sehingga membutuhkan waktu sekitar lima siklus untuk menghasilkan amplicon yang setara. Hal ini diduga menyebabkan pita hasil elektroforesis lebih tebal pada reaksi NASBA (Compton, 1991; Malek *et al.*, 1994).

Di Indonesia, sampai saat ini belum ada publikasi tentang pelacakan virus penyakit jembrana dengan metode NASBA. Pelacakan virus penyakit jembrana selama ini menggunakan metode seperti hibridisasi *in situ* (Chadwick *et al.*, 1998), *Western Immunoblot* (Chadwick *et al.*, 1995a; Kertayadnya *et al.*, 1993), *Northern blot* (Chen *et al.*, 1999), ELISA (Burkala *et al.*, 1999; Hartaningsih *et al.*, 1994; Barboni *et al.*, 2001; Astawa *et al.*, 2006) dan *loop mediated isothermal amplification/LAMP* (Kusumawati *et al.*, 2015a,b). Metode RT-PCR juga banyak digunakan dalam pelacakan VPJ (Chadwick *et al.*, 1995b; Kusumawati *et al.*, 2003; Kusumawati *et al.*, 2010; Tenaya, 2003; Desport *et al.*, 2007).

Metode NASBA telah diaplikasikan untuk deteksi berbagai penyakit seperti flu burung/*Avian Influenza Virus* (AIV), penyakit mulut dan kuku/*Foot and Mouth Disease Virus* (FMD), penyakit tetelo/*New Castle Disease Virus* (NDV), *Classical Swine Fever Virus* (CSFV), *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus* (PRRSV), dan *Infectious Salmon Anaemia Virus/ISAV* (Starkey *et al.*, 2006). Metode NASBA sebagai alternatif selain PCR mampu melacak gen *env-TM* VPJ galur Tabanan 1995 secara dini pada sampel jaringan dan darah. Kemampuan tersebut didukung dengan tingginya efisiensi amplifikasi, karena kondisi isothermal reaksi, sehingga tidak ada waktu yang terbuang akibat perubahan suhu.

SIMPULAN

Gen *env-TM* VPJ galur Tabanan 1995 dapat dilacak dengan metode NASBA dengan munculnya fragmen RNA sebesar 207 bp pada sampel RNA darah dan jaringan.

SARAN

Memberikan masukan mengenai alternatif metode selain RT-PCR untuk pelacakan gen *env-TM* VPJ galur Tabanan 1995 sehingga penyebaran penyakit ini dapat dikendalikan secara dini. Perlu tetap waspada terhadap penyebaran virus penyakit jembrana dengan selalu melakukan pemantauan/*monitoring* sirkulasi virus penyakit jembrana untuk mengetahui situasi terkini penyakit jembrana di Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kepala Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM), Universitas Gadjah Mada. Penelitian ini didanai oleh Proyek Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi (PUPT) Tahun 2014 LPPM UGM, Yogyakarta.

DAFTAR PUSTAKA

- Astawa NM, Hartaningsih N, Agustini LP, Tenaya WM, Berata K, Widiyanti LPM. 2006. Detection of Jembrana Disease Virus Antigen in Peripheral Blood Lymphocytes by Monoclonal Antibody. *Media Kedokteran Hewan* 22(3): 154-160.
- Barboni P, Thompson I, Brownlie, Hartaningsih N, Collins ME. 2001. Evidence for the presence of two bovine lentiviruses in the cattle population of Bali. *Vet Microbiol* 80: 313-27.
- Burchill SA, Perebolte L, Johnston C, Top B, Selby P. 2002. Comparison of the RNA-amplification based methods RT-PCR and NASBA for the detection of circulating tumour cells. *Br J Cancer* 86: 102-109.
- Burkala EJ, Narayani I, Hartaningsih N, Kertayadnya G, Berryman DI, Wilcox GE. 1998. Recombinant jembrana disease virus proteins as antigens for the detection of antibody to bovine lentiviruses. *J Virol Method* 74: 39-46.
- Chadwick BJ, Coelen RJ, Sammels LM, Kertayadnya G, Wilcox GE. 1995^a. Genomic sequence analysis identifies jembrana disease virus as a new bovine lentivirus. *J Gen Virol* 76: 189-192.
- Chadwick BJ, Coelen RJ, Wilcox GE, Sammels LM, Kertayadnya G. 1995^b. Nucleotide sequence analysis of jembrana disease virus: a bovine lentivirus associated with an acute disease syndrome. *J Gen Virol* 76: 1637-1650.
- Chadwick BJ, Desport M, Brownlie J, Wilcox GE, Dharma DM. 1998. Detection of jembrana disease virus in spleen, lymph nodes, bone marrow and other tissues by *in situ* hybridization of paraffin-embedded sections. *J Gen Virol* 79: 101-6.
- Chen H, Wilcox GE, Kertayadnya G, Dharma DMN. 1998. Detection of Jembrana disease virus in spleen, lymph nodes, bone marrow and other tissues by *in situ* hybridization of paraffin-embedded section. *J Virol* 73: 658-666.
- Compton J. 1991. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 350: 91-92.
- Deiman B, van Aarle P, Sillekens P. 2002. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *In Mol Biotech* 20(2): 163-179.
- Desport M, Stewart ME, Mikosza AS, Sheridan CA, Peterson SE, Chavand O, Hartaningsih N, Wilcox GE. 2007. Sequence analysis of jembrana disease virus galurs reveals a genetically stable lentivirus. *Vir Res* 126: 237-239.
- Goff S. 2001. Retroviridae: the retroviruses and their replication. 4th ed. Dalam *Fundamental Virology*. Editor, Knipe D, Howley PM. Philadelphia. Lippincott, Williams and Wilkins. Hlm. 843-911
- Hartaningsih N, Wilcox GE, Dharma DM, Soetrisno M. 1993. Distribution of jembrana disease in cattle in Indonesia. *Vet Microbiol* 38: 23-29.
- Hartaningsih N, Wilcox GE, Kertayadnya G, Astawa M. 1994. Antibody response to Jembrana disease virus in Bali cattle. *Vet Microbiol* 39: 15-23.
- Jean J, Blais B, Darveau A, Fliss I. 2001. Detection of hepatitis A virus by the nucleic acid sequence-based amplification technique and comparison with reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 67(12): 5593-5600.

- Kertayadnya G, Wilcox GE, Soeharsono S, Hartaningsih N, Coelen RJ, Cook RD, Collins ME, Brownlie J. 1993. Characteristics of a retrovirus associated with jembrana disease in Bali cattle. *J Gen Virol* 74: 1765-1778.
- Kievits T, van Gemen B, van Strijp D, Schukkink R, Dircks M, Adriaanse H, Malek LT, Sooknanan R, Lens P. 1991. NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *J Virol Methods* 35: 273-286.
- Kusumawati A, Martin R, Mangkoewidjojo, Widodo JS. 2003. Isolation and cloning of ENV-TM subunit gene of jembrana disease virus in the procaryotic expression vector pGEX-2T. *J Sain Vet* 21(2): 33-38.
- Kusumawati A, Pratiwi R, Astuti P, Hamid PH. 2010. Characterization of *envelope-transmembrane* gene of jembrana disease virus tabanan 1995 isolate. *IJ Biotech* 15(1): 15-19.
- Kusumawati A, Wanahari TA, Tampuboon ID, Mappakaya BA. 2015a. The Comparison of RT-LAMP, RT-PCR and Dot Blot Hybridization for Detection of Jembrana Disease Virus. *Amer J Biochem Biotech* 11(2): 114-118.
- Kusumawati A, Tampubolon ID, Hendarta NY, Salasia SIO, Wanahari TA, Mappakaya BA, Hartati S. 2015b. Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick for an easy and rapid detection of Jembrana disease virus. *Vir Dis* 26(3): 189-195.
- Lau LT, Fung YWW, Yu ACH. 2006. Detection of animal viruses using nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Dev Biol* 126: 7-15.
- Loens K, Ursi D, Goossens H, Ieven M. 2005. Nucleic acid sequence-based amplification. Dalam *Medical Biomethods Handbook*, Editor, Walker JM, Rapley R. Totowa NJ. Humana Press Inc. Hlm. 273-291.
- Malek LT, Sooknanan R, Compton J. 1994. Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). Dalam *Methods in molecular biology*, Vol 28, Edited by Isaac PG. Protocols for nucleic acid analysis by nonradioactive probes. Humana Press Inc. Totowa, NJ. Hlm. 253-260.
- Sherman MP, Greene WC. 2002. Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. *Microbes Infect* 4(1): 67-73.
- Sooknanan R, van Gemen B, Malek LT. 1995. Nucleic acid sequence-based amplification. Dalam *Molecular Methods for Virus Detection*. Editor, Danny LW, Farkas DH. New York. Academic Press. Hlm. 386.
- Starkey WG, Smail DA, Bleie H, Muir KF, Ireland JH, Richards RH. 2006. Detection of infectious salmon anaemia virus by real-time nucleic acid sequence based amplification. *Di. Aquat Organ* 72(2): 107-113.
- Stewart M, Desport M, Hartaningsih N, Wilcox GE. 2005. TaqMan Real-Time Reverse Transcription-PCR and JDVp26 antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay to quantify jembrana disease virus load during the acute phase of in vivo infection. *J Clin Microbiol* 43(11): 5574-5580.
- Tenaya IWM. 2003. Deteksi proviral DNA virus Jembrana pada limposit sapi Bali dengan uji Polymerase Chain Reaction (PCR). *Buletin Veteriner BPPV VI*. 15(63): 44-47.
- Weusten JJAM, Carpay WM, Oosterlaken TAM, van Zuijien MCA, van de Wief PA. 2002. Principles of quantitation of viral loads using nucleic acid sequence-based amplification with homogenous detection using molecular beacons. *Nucl Acids Res* 30(6): 1-7.