

SR. 367

SKRIPSI :



IDA BAGUS NGURAH SWACITA

**BEBERAPA KARAKTER ISOLAT VIRUS
NEWCASTLE DISEASE DARI BURUNG KAKATUA**



**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
1985**



SKRIPSI :

IDA BAGUS NGURAH SWACITA

**BEBERAPA KARAKTER ISOLAT VIRUS
NEWCASTLE DISEASE DARI BURUNG KAKATUA**



**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
1985**

BEBERAPA KARAKTER ISOLAT VIRUS NEWCASTLE DISEASE
DARI BURUNG KAKATUA

SKRIPSI

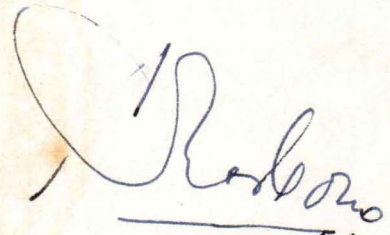
DISERAHKAN KEPADA FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA UNTUK MEMENUHI
SEBAGIAN SYARAT GUNA MEMPEROLEH
GELAR DOKTER HEWAN

OLEH

IDA BAGUS NGURAH SWACITA
SINGARAJA - BALI



(DRH. RAHAYU ERNAWATI, MSC.)
PEMBIMBING UTAMA



(DRH. SOEHARSONO, DTVS.)
PEMBIMBING KEDUA

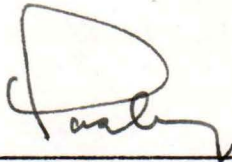
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

1985

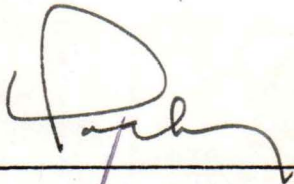
Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik scope maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar DOKTER HEWAN.

Ditetapkan di Surabaya, tanggal:

Panitia penguji,



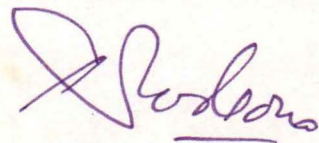
Ketua



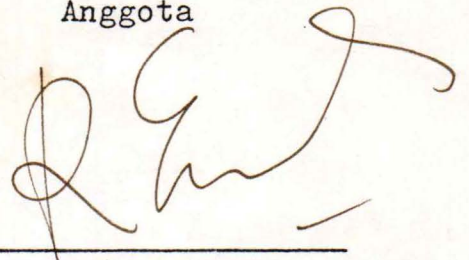
Sekretaris



Anggota



Anggota



Anggota



Anggota



Anggota

KATA PENGANTAR

Berkat rahmat Tuhan Yang Maha Esa, maka penulis telah berhasil menyelesaikan penulisan skripsi ini pada waktunya. Skripsi ini disusun sebagai syarat untuk dapat menempuh ujian dokter hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Dalam penyusunan skripsi ini, banyak pihak telah membantu penulis; untuk itu dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada : Drh. Rahayu Ernawati, MSc. dan Drh. Soeharsono, DTVS. sebagai pembimbing pertama dan kedua dalam penulisan skripsi ini, atas sumbangan pikiran dan waktunya untuk membimbing penulis sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.

Terima kasih pula penulis sampaikan kepada Bapak Drh. I Gde Sudana, DTVM., Kepala Balai Penyidikan Penyakit Hewan (BPPH) Wilayah VI Denpasar, serta Drh. Ketut Santhia Adhy Putra, Kepala Bagian Virologi BPPH. Wilayah VI Denpasar, atas bantuan fasilitas dan materi dalam penelitian ini.

Penulis menyadari, skripsi ini masih banyak kekurangannya, untuk itu saran dan kritik sangat penulis harapkan untuk perbaikan skripsi ini.

Akhir kata, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi almamater.

Penulis.

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	ii
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR LAMPIRAN	vi
BAB I. PENDAHULUAN ..	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Sejarah dan Penyebaran Penyakit	4
2.2. Daya Tahan dan Sifat Virus ..	4
2.3. Penularan Penyakit	6
2.4. Bentuk Penyakit yang Ditimbulkan	7
2.5. Diagnosa	10
BAB III. MATERI DAN METODA	11
3.1. Pembiakan Virus ..	11
3.2. Embryo Lethal Dosis-50	16
3.3. Mean Death Time ..	17
3.4. Intracerebral Pathogenicity Index	18
3.5. Intravenous Pathogenicity Index	19
3.6. Pembentukan Plaque	21
3.7. Thermostabilitas Hemagglutinin	23
3.8. Waktu Elusi	25

BAB IV.	HASIL PENELITIAN	26
4.1.	Pembiakan Virus	26
4.2.	Embryo Lethal Dosis-50	26
4.3.	Mean Death Time	29
4.4.	Intracerebral Pathogenicity Index	29
4.5.	Intravenous Pathogenicity Index	29
4.6.	Pembentukan Plaque	36
4.7.	Thermostabilitas Hemaglutinin	36
4.8.	Waktu Elusi	36
BAB V.	PEMBAHASAN	38
BAB VI.	RINGKASAN	48
DAFTAR PUSTAKA					

DAFTAR TABEL

TABEL	halaman
1. Hasil uji Embryo Lethal Dosis-50 (ELD ₅₀)	27
2. Hasil uji Mean Death Time (MDT).....	30
3. Hasil uji Intracerebral Pathogenicity Index (ICPI)	32
4. Hasil uji Intravenous Pathogenicity Index (IVPI)	34
5. Hasil uji Stabilitas Hemaglutinin ..	37
6. Hasil uji Waktu Elusi	37

DAFTAR GAMBAR

GAMBAR	halaman
1. Bahan dan alat penelitian	12
2. Embryo yang terinfeksi oleh isolat virus ND. dari burung kakatua	28
3. Anak ayam kampung umur sehari yang disuntik dengan isolat virus ND. dari burung kakatua	33
4. Ayam kampung umur 6 minggu yang disuntik dengan isolat virus ND. dari burung kakatua	35
5. Perubahan bedah bangkai pada ayam kampung umur 6 minggu	41
6. Pembentukan plaque pada biakan sel chicken embryo fibroblast (CEF)	47

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN		halaman
I.	Larutan Alsever's	54
II.	Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,2	54
III.	Suspensi 1% Eritrosit Ayam	55
IV.	Stok Antibiotika 40.000 IU	56
V.	Larutan 1% Phenol Red	56
VI.	Larutan 4,4% Sodium Bikarbonat ..	56
VII.	Larutan Glutamin	56
VIII.	Stok Trypsin 5%	57
IX.	Larutan Hank's BSS. 10 x konsentrasi	57
X.	Serum anak sapi	58
XI.	Media 199	59
XII.	Media Agarose 0,75%	59

I. PENDAHULUAN

Newcastle Disease (ND) merupakan penyakit viral menular yang bersifat akut pada unggas, ditandai dengan depresi, anoreksia, gejala saraf berupa tortikolis dan diare putih kehijauan (Bruner dan Gillespie, 1973; Siegmud, 1979; Anon., 1981). Penyakit ini disebut juga Avian pest, Avian distemper, Avian pneumo-encephalitis, Pseudo poultry plaque, Pseudo vogel pest, Pseudo fowl pest dan Ranikhet disease (Petrak, 1969; Hanson, 1972; Andrewes dan Pereira, 1972; Gordon, 1977).

Sedangkan di Indonesia, penyakit ini dikenal dengan nama Sampar ayam atau Penyakit Tetelo (Ressay, 1984).

Newcastle Disease menyerang berbagai jenis unggas seperti angsa, kalkun, itik, puyuh, pheasant (Kingston et al., 1978; Jaafir et al., 1980; Vickers dan Hanson, 1982; Santhia dkk., 1985) dan beberapa burung lain seperti burung merpati, nuri, beo, pelatuk dan kakatua (Erickson, 1980; Santhia dkk., 1982, 1983).

Berbagai jenis burung liar, juga dilaporkan peka terhadap ND. seperti burung budgerigar (*Melopsittacus undulatus*), parkit (*Psittacula krameri*), Amazon parrot (*Amazona orchocephala*), falfmoon conure (*Aratinga canalicularis*), black headed nun (*Lonchura mallaca*) dan swallow (*Hirundo rustica*) (Grausgruber, 1972; Lancaster dan Alexander, 1975; Lancaster, 1977; Eaves dan

Grimes, 1978; Uppal, 1982). Burung-burung tersebut, terserang virus ND. viscerotropik velogenik, yang sering dilaporkan menyerang peternakan ayam (Hanson, 1975). Galur ini, juga dilaporkan menyerang berbagai jenis burung kakatua seperti *Cacatua mollucensis*, *Cacatua lesser*, *Cacatua alba*, *Cacatua sulphurea*; dan burung³ ini dilaporkan dapat bertindak sebagai karier, yang secara klinis tampak normal, tetapi dapat terinfeksi kronis lebih dari satu tahun (Cavill, 1974; Chew dan Liow, 1974; Hanson, 1975).

Virus ND. pada unggas umumnya mempunyai kesamaan antigenik satu dengan lainnya (Gomes-Lillo, 1974; Vickers dan Hanson, 1982). Atas dasar kesamaan antigenik ini, maka berbagai uji *invivo* dan *invitro* telah digunakan di laboratorium untuk membedakan dan menggolongkan suatu isolat virus ND.

Berbagai karakter isolat virus ND. telah dipelajari berdasarkan patogenisitas (Mean Death Time, Intra cerebral Pathogenicity Index, Intravenous Pathogenicity Index), Pembentukan plaque (Schloer dan Hanson, 1968; Allan et al., 1978; Uppal, 1982; Vichere dan Hanson, 1982; Vickers dan Honson, 1982), Thermostabilitas Hemaglutinin (Hanson dan Spalatin, 1978; Eaves dan Grimes, 1978; Jaafir et al., 1980) dan Waktu Elusi (Rosenberger et al., 1975; Santhia dkk., 1985).

Sejak tahun 1979 sampai tahun 1981, Balai Penyelidikan Penyakit Hewan (BPPH) Wilayah VI Denpasar, Bali telah menerima sejumlah material burung kakatua dari Stasiun Karantina Pelabuhan Benoa, Stasiun Karantina Bali International Airport (BIA) Ngurah Rai, Tuban; dan juga milik perseorangan yang tinggal di Denpasar. Hasil isolasi dan identifikasi, menunjukkan positif virus ND. (Santhia dkk., 1982). Berdasarkan adanya laporan dari BPPH., dan juga karena penelitian mengenai karakter isolat virus ND. dari burung kakatua belum pernah dilakukan di Indonesia, maka penulis berkeinginan untuk mempelajari karakter dari virus tersebut.

Tujuan dari penelitian ini disamping untuk mempelajari karakternya, juga untuk dapat menetapkan epizootiologi penyakit ND. di Indonesia yang dalam hal ini berkaitan erat dengan tindakan pencegahan dan pengendalian ND. di Indonesia. Demikian pula mengingat burung kakatua di Indonesia, merupakan salah satu komoditi ekspor non migas dalam usaha meningkatkan devisa negara. Dalam penelitian ini, dua isolat virus ND. dari burung kakatua dipelajari karakternya berdasarkan patogenisitas, pembentukan plaque, thermostabilitas hemaglutinin dan waktu elusi.

Penelitian ini dilakukan di BPPH. Wilayah VI Denpasar, Bali dari tanggal 2 Januari 1985 sampai tanggal 2 Maret 1985.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Sejarah dan Penyebaran Penyakit.

Penyakit ini pertama kali dilaporkan di Indonesia oleh Kraneveld tahun 1926, kemudian Doyle pada tahun 1927 menemukan penyakit yang sama di kota Pelabuhan Newcastle-on-Tyne, Inggris. Konno pada tahun 1926 menemukan penyakit ini di Korea, yang digambarkan sebagai suatu penyakit akut dan biasanya berupa penyakit saraf dan pernafasan yang bersifat fatal. Selanjutnya penyakit ini telah menyebar ke Amerika, Canada, Afrika Selatan, India, China, Iran, Irak, Arab Saudi, Jepang, beberapa negara Eropa, Kepulauan Philipina dan Australia (Merchant dan Packer, 1971; Hanson, 1972; Bruner dan Gillespie, 1973; Gordon, 1977). Penyebaran penyakit hampir merata di seluruh dunia sebagai penyakit enzootik, dan dapat menimbulkan wabah yang hebat di daerah peternakan unggas yang ekstensif.

2.2. Daya Tahan dan Sifat Virus.

Newcastle Disease disebabkan oleh Paramyxovirus, yang mempunyai asam inti ribo beruntai tunggal (single stranded RNA). Bentuk dan ukuran virus ND. sangat bervariasi. Burnet dan Ferry pada tahun 1934 dapat menentukan ukuran virus sebesar

80 - 120 nanometer (nm) setelah mengadakan saringan dengan saringan Seitz, Barkefeld N dan W, saringan Chamberland L₃ dan L₅ (Merchant dan Packer, 1971 ; Bruner dan Gillespie, 1973). Sedangkan dengan mikroskop elektron, berukuran 112 nm. Bentuk virus ini adalah spherik atau pleo-morfik dan virionnya berukuran 120 - 300 nm. (rata-rata 180 nm).

Virus ini mempunyai envelope dan komponen dalam dari nucleocapsid berbentuk spiral (helix) yang simetris, berukuran kira-kira 17 nm. (Andrewes dan Pereira, 1972; Hanson, 1972).

Virus ND. akan segera rusak pada suhu 100° C selama 1 menit dan menjadi inaktif pada suhu 56 dan 60° C selama 30 menit. Pada suhu 37° C virus dapat hidup dalam beberapa jam sampai beberapa hari.

Pada cairan allantois dari telur ayam berembryo, virus tetap stabil pada suhu 37° C selama 26 hari dan pada suhu 45° C selama 156 jam; sedangkan pada suhu (-70° C), virus dapat bertahan sampai beberapa tahun (Merchant dan Packer, 1971; Andrewes dan Pereira ; 1972; Bruner dan Gillespie, 1973).

Semua galur virus ND. dapat tumbuh pada telur ayam berembryo umur 9 - 12 hari pada suhu inkubator 36 - 38° C, dan virus ini dapat membunuh embryo tersebut dalam waktu 2 - 6 hari (Bruner dan

Gillespie, 1973; Hanson, 1975; Gordon, 1977).

Virus ini juga dapat tumbuh pada biakan sel chicken embryo fibroblast (CEF), sel embryo ginjal ayam dan baby hamster kidney (BHK). Kerusakan yang ditimbulkan oleh virus ini pada biakan sel dinamakan cythopathic effect (CPE) dengan ciri adanya bentukan syncytial. Juga dapat ditemukan badan inklusi (inclusion bodies) pada sitoplasma dan kadang-kadang pada nukleus (Andrewes dan Pereira, 1972).

Beberapa galur virus ND. dapat membentuk plaque pada biakan sel CEF. yang dilapisi dengan media agarose (Schloer dan Hanson, 1968; Hanson, 1972).

Semua galur virus ND. dapat mengaglutinasi eritrosit unggas, semua jenis amfibi dan reptil, juga eritrosit manusia, marmut dan tikus. Sedangkan eritrosit sapi, kambing, domba dan kuda hanya dapat diaglutinasi oleh beberapa galur virus ND. saja (Eaves dan Grimes, 1978).

2.3. Penularan Penyakit.

Virus ND. dapat menular secara langsung dari ayam sakit ke ayam-ayam sehat, sedangkan penularan tak langsung dapat melalui jejabah yang tercemar virus ND., pernafasan, petugas atau vaksinator yang pernah berhubungan dengan ayam sakit.

Alat-alat transportasi dapat bertindak sebagai vektor mekanik (Ressang, 1984). Penyakit dapat tersebar secara regional melalui impor unggas, telur dan daging beku (Anon., 1981). Penyebaran virus ND. ke berbagai negara Eropa, Amerika dan Asia banyak terjadi melalui impor burung ke negara tersebut secara melawan hukum / illegal (Cavill, 1974; Lancaster dan Alexander, 1975; Anon., 1985).

2.4. Bentuk Penyakit yang Ditimbulkan.

Galur virus ND. dapat dibedakan atas virulensinya pada ayam yaitu : lentogenik, mesogenik dan velogenik (Whiteman dan Bicford, 1979).

Tiga cara yang biasa digunakan untuk menentukan ketiga galur virus ini adalah (Lancaster dan Alexander, 1975) :

1. Mean Death Time (MDT) adalah waktu rata-rata dalam jam dari kematian seluruh embryo ayam umur 10 hari yang disuntik dengan dosis lethal minimal atau pengenceran virus tertinggi dari virus ND. Galur lentogenik akan membunuh embryo ayam dalam waktu lebih dari 90 jam yang disuntik melalui ruang allantois; galur mesogenik akan membunuh embryo dalam waktu 60 - 90 jam dan galur velogenik akan membunuh embryo dalam waktu 40 - 60 jam.

2. Intracerebral Pathogenicity Index (ICPI) adalah penilaian dari waktu kematian anak-anak ayam umur sehari atau menunjukkan gejala penyakit, setelah disuntik virus ND. secara intracerebral.

ICPI. untuk galur lentogenik adalah kurang dari 0,5; galur mesogenik antara 0,5 - 1,5 dan galur velogenik antara 1,5 - 2.

3. Intravenous Pathogenicity Index (IVPI) yang pada dasarnya mirip dengan uji ICPI. tetapi disini memakai ayam-ayam peka umur 6 minggu yang disuntik virus ND secara intravenous. Galur lentogenik dan mesogenik tidak akan membunuh ayam umur 6 minggu bila disuntik dengan dosis lethal embryo - 50 % (ELD₅₀), sebaliknya galur velogenik akan membunuh ayam-ayam umur 6 minggu bila disuntik dengan dosis lethal embryo (ELD₅₀).

Bentuk penyakit secara klinis dan patologik pada ND. dapat dibedakan menjadi (Hanson, 1972) :

1. Bentuk penyakit dari Doyle.

Dilaporkan pertama kali oleh Doyle pada tahun 1927, sebagai penyakit yang bersifat akut dan fatal terhadap semua umur ayam. Perubahan patologik yang lebih menonjol pada bentuk ini adalah lesi-lesi berdarah yang terjadi pada saluran pencernaan.

Bentuk penyakit ini disebabkan oleh galur velogenik, galur Asia dan galur velogenik viscerotropik ND.

2. Bentuk penyakit dari Beach.

Dilaporkan oleh Beach pada tahun 1942 dan 1946 sebagai penyakit akut yang bersifat fatal pada semua umur ayam. Bentuk penyakit ini ditandai adanya lesi-lesi pada saluran pernafasan dan sistem saraf, sehingga penyakitnya disebut pneumo-encephalitis. Bentuk penyakit ini disebabkan oleh galur velogenik neurotropik.

3. Bentuk Penyakit dari Beaudette.

Ditemukan oleh Beaudette dan Beach pada tahun 1946 sebagai penyakit pernafasan akut dan kadang-kadang menyerang sistem saraf pada ayam-ayam berumur muda. Bentuk penyakit ini disebabkan oleh galur mesogenik yang sering digunakan sebagai vaksin.

4. Bentuk penyakit dari Hitchner.

Dilaporkan oleh Hitchner dan Johnson pada tahun 1948 dan 1950 sebagai penyakit ringan atau penyakit pernafasan yang tidak jelas pada ayam, dan bentuk penyakit ini disebabkan oleh galur lentogenik, yang juga sering digunakan sebagai vaksin.

2.5. Diagnosa.

Newcastle Disease dapat didiagnosa berdasarkan epizootiologik, gejala klinik, patologik dan virologik. Untuk isolasi virus dapat dilakukan dengan menyuntikkan suspensi jaringan otak, trachea dan paru-paru dari ayam tersangka pada telur ayam berembryo umur 9 hari melalui kantong allantois.

Uji Hemaglutinasi (HA) dari cairan allantois yang terinfeksi, kemudian dilanjutkan dengan uji Hambat Hemaglutinasi (HI) adalah merupakan konfirmasi laboratorium yang positif (Hanson, 1972; Siegmud, 1979).

Pada biakan sel chicken embryo fibroblast (CEF), sel ginjal embryo ayam dan baby hamster kidney (BHK), virus ND. dapat menginfeksi biakan sel tersebut yang dinamakan cythopathic effect (CPE) dengan ciri adanya bentukan syncytial.

Uji biologis dapat dilakukan dengan cara menyuntikkan virus ND. pada ayam-ayam peka secara intracerebral atau intramuskuler (Anon., 1981).

ELISA adalah uji serologis yang dilaporkan lebih sensitif daripada uji HI., karena dengan titer antibodi yang rendah, masih dapat dideteksi dengan uji ini (Hanson, 1975).

III. MATERI DAN METODA

3.1. Pembiakan Virus.

Bahan : Dua isolat virus ND. dari burung kakatua, penicilline G, streptomycine, PBS. steril pH 7,2 , 10 butir telur ayam berembryo umur 9 hari, alkohol 70% dan kuteks.

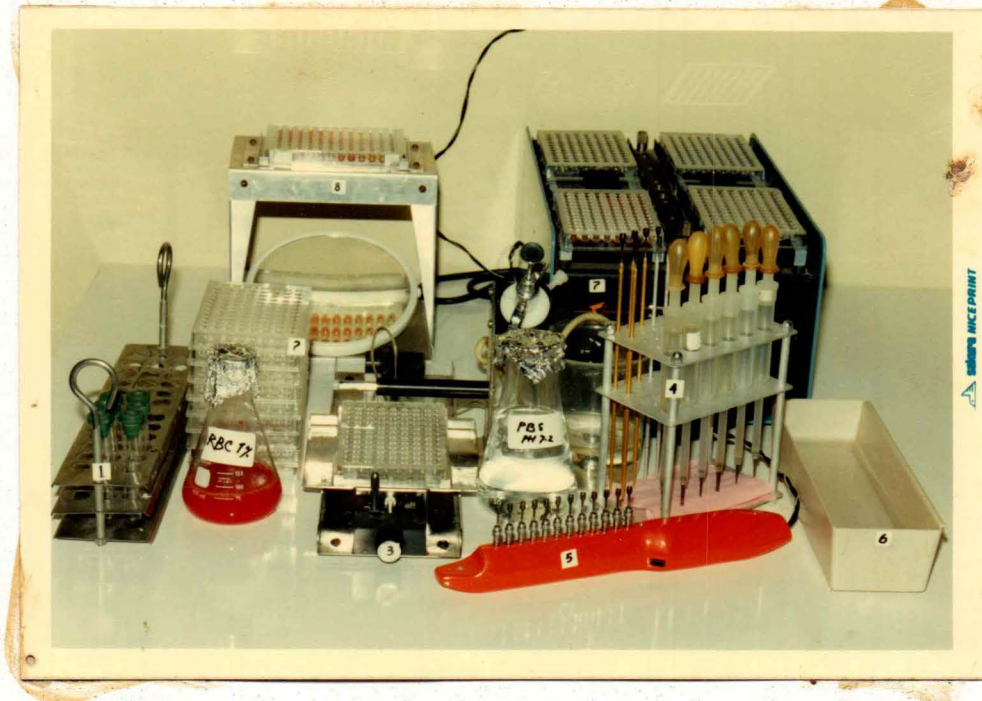
Alat : Tabung reaksi, pipet, Millex-GS 0,22 um. filter unit, refrigerated centrifuge, jarum, spuit 1 ml dan 5 ml, inkubator, lemari es (refrigerater) dan gunting.

Prosedur :

Dua isolat virus ND. dari burung kakatua yang disimpan pada deep freezer (-70°C) dicairkan dengan cara merendamnya pada air kran mengalir. Kemudian dipusingkan pada refrigerated centrifuge dengan kecepatan 4.500 rpm. selama 20 menit. Supernatan diambil dengan spuit 5ml dan disaring dengan Millex-GS filter unit. Tambahkan kedalam virus ini penicil - line G 200 IU/ml dan streptomycine 200 ug/ml, kemudian simpan dalam inkubator 37°C selama 30 menit.

Virus diencerkan secara seri kelipatan 10 mulai pengenceran 10^{-1} - 10^{-3} dengan cara : masukkan 1,8ml PBS. steril pH 7,2 masing-masing kedalam 3 tabung reaksi memakai pipet.

Gambar 1 : Bahan dan alat penelitian.



Keterangan :

1. Tabung reaksi beserta raknya.
2. Microplate.
3. Penetes otomatis (otomatic dropper).
4. Micropipet (micro dropper).
5. Rotatiter.
6. Bak air.
7. Microshaker.
8. Cermin pembaca (reading mirror).

Tambahkan 0,2 ml virus kedalam tabung no.1 dan campur isinya. Pindahkan 0,2 ml campuran ini kedalam tabung no.2 dan seterusnya sampai tabung no.3.

Pengenceran virus 10^{-3} disuntikkan 0,1 ml ke dalam ruang allantois dari telur ayam berembryo umur 9 hari, masing-masing 5 telur untuk setiap isolat. Tutup lubang bekas suntikkan dengan kuteks, dan telur diinkubasi pada 37°C serta diperiksa setiap hari selama 2 - 6 hari. Telur yang mati kurang dari 24 jam dibuang, dan bila mati lebih dari 24 jam, disimpan dalam lemari es selama 30 menit. Buka kulit telur ini dengan gunting pada bagian kantong udaranya, dan cairan allantoisnya dipanen.

Untuk mengetahui titer virus dan konfirmasi (peneguhan) virus yang menginfeksi cairan allantois ini, maka dilakukan uji mikrotiter hemaglutinasi (HA) dan uji mikrotiter hambat hemaglutinasi (HI).

Bahan : Cairan allantois segar yang terinfeksi virus, PBS. steril pH 7,2, suspensi 1 % eritrosit ayam, antigen 4 HA unit/0,025 ml., serum kebal ND.

Alat : Microplate, micropipet, rotatiter, penetes otomatis (otomatic dropper), micro-shaker, cermin pembaca (reading mirror).

Prosedur :

Lubang pada kolom 1 - 11 dari microplate, masing-masing diisi dengan 0,025 ml PBS. memakai penetes otomatis. Sedangkan lubang pada kolom 12 dari microplate, diisi dengan 0,05 ml PBS. sebagai kontrol eritrosit. Lubang pada kolom 1 dari microplate diisi dengan 0,025 ml cairan allantois, kemudian dibuat pengenceran secara seri kelipatan dua memakai rotatiter dengan cara mencampur isi lubang pada kolom 1 dan memindahkan 0,025 ml ke lubang pada kolom 2 dan seterusnya sampai lubang pada kolom 11.

Buang 0,025 ml isi lubang pada kolom 11. Tambahkan 0,025 ml PBS. kedalam lubang pada kolom 1 - 11 dari microplate, kemudian semua lubang dari microplate, masing-masing diisi dengan 0,05 ml suspensi 1% eritrosit ayam. Microplate diayak pada microshaker selama 15 detik, kemudian biarkan microplate ini pada suhu kamar (25°C). Baca titer hemaglutinasinya mulai 15 menit pertama sampai 1 jam kemudian diatas cermin pembaca.

Interpretasi : Pada pengenceran tertinggi dari virus yang memberikan 100% hemaglutinasi di hitung sebagai titik akhir.

Untuk konfirmasi (peneguhan) virus ini, maka dilakukan uji HI. dengan cara : lubang pada kolom 1 sampai 11 dari microplate, masing-masing diisi dengan 0,025 ml PBS. dan lubang pada kolom 12 diisi dengan 0,05 ml PBS. (sebagai kontrol eritrosit) memakai penetes otomatis. Lubang pada kolom 1-2 dari microplate diisi dengan 0,025 ml serum kebal ND., dan kemudian diencerkan secara seri kelipatan dua memakai rotatiter dengan cara mencampur isi lubang pada kolom 2 dan memindahkan 0,025 ml campuran ini ke lubang pada kolom 3; dan seterusnya sampai lubang pada kolom 11. Tambahkan 0,025 ml antigen 4 HA. unit (di buat dari virus yang diencerkan beberapa kali sampai titernya menjadi 4 HA. unit) kedalam lubang pada kolom 1 sampai 11, kemudian microplate diayak pada microshaker selama 30 detik. Inkubasi microplate pada suhu kamar selama 1 jam. Setelah periode inkubasi tersebut, tambahkan masing-masing 0,05 ml suspensi 1% eritrosit ayam kedalam semua lubang dari microplate. Microplate diayak pada microshaker selama 30 detik, dan biarkan pada suhu kamar (25°C). Baca titer serumnya mulai 15 menit pertama sampai 1 jam kemudian diatas cermin pembaca.

Keterangan : lubang pada kolom 1 dari microplate sebagai kontrol serum.

Interpretasi : Pada pengenceran tertinggi dari serum yang dapat menghambat hemaglutinasi 100%, dihitung sebagai titik akhir.

Isolat virus ND. dari burung kakatua ini, di biakkan 2 kali atau pasase 2 kali sebelum dipergunakan untuk mempelajari karakternya. Tehnik pembiakan virus, uji HA. serta konfirmasi virus dengan uji HI. dikerjakan seperti diatas.

3.2. Embryo Lethal Dosis-50 (ELD₅₀).

Bahan : Cairan allantois yang terinfeksi virus ND. penicilline G, streptomycine, PBS. steril pH 7,2 , 90 butir telur ayam berembryo umur 9 hari, alkohol 70% dan kuteks.

Alat : Tabung reaksi, pipet, Millex-GS 0,22 um. filter unit, spuit 1 ml, jarum dan inkubator.

Prosedur :

Cairan allantois yang terinfeksi virus ND. se telah dipusingkan dan disaring dengan Millex-GS 0,22 um. filter unit, diencerkan secara seri kelipatan 10 mulai pengenceran 10^{-1} - 10^{-12} dengan cara : masukkan 1,8 ml PBS. steril pH 7,2 masing-masing ke dalam 12 tabung reaksi memakai pipet. Tambahkan 0,2 ml cairan allantois yang terinfeksi virus ND. ke dalam tabung no.1 memakai pipet dan campur isinya.

Pindahkan 0,2 ml campuran ini kedalam tabung no.2, dan seterusnya sampai tabung no.12. Mulai pengenceran 10^{-4} - 10^{-12} disuntikkan 0,1 ml kedalam ruang allantois dari telur ayam berembryo umur 9 hari, masing-masing 5 telur untuk setiap pengenceran. Tutup bekas lubang suntikkan dengan kuteks dan telur diinkubasi pada 37°C selama 5 - 7 hari. Periksa telur ini setiap 12 jam dan ELD₅₀ dari embryo yang mati, dihitung menurut metoda Reed dan Muench (1938).

3.3. Mean Death Time (MDT).

Bahan : Cairan allantois yang terinfeksi virus ND. penicilline G, streptomycine, PBS. steril pH 7,2 , 100 butir telur ayam berembryo umur 10 hari, alkohol 70% dan kuteks.

Alat : Tabung reaksi, pipet, Millex-GS 0,22 um. filter unit, jarum, spuit 1 ml dan inkubator.

Prosedur :

Dua cairan allantois yang terinfeksi virus ND. setelah dipusingkan dan disaring dengan Millex-GS filter unit, diencerkan secara seri kelipatan 10 mulai pengenceran 10^{-1} - 10^{-10} (isolat₁) dan 10^{-1} - 10^{-11} (isolat₂) dengan cara : masukkan 1,8 ml PBS. steril pH 7,2 masing-masing kedalam 10 tabung reaksi

(isolat₁) dan 11 tabung reaksi (isolat₂). Tambahkan 0,2 ml cairan allantois yang terinfeksi virus ND. kedalam tabung no.1 memakai pipiet dan campur isinya. Pindahkan 0,2 ml campuran ini kedalam tabung no.2 dan seterusnya sampai tabung no.10 (isolat₁) dan tabung no.11 (isolat₂). Pengenceran virus dari 10^{-1} , 10^{-7} - 10^{-10} (isolat₁) dan pengenceran dari 10^{-1} , 10^{-8} - 10^{-11} (isolat₂) disuntikkan 0,1 ml kedalam ruang allantois dari telur ayam berembryo umur 10 hari pada jam 08.00 pagi dan jam 17.00 sore masing-masing 5 telur untuk setiap pengenceran. Tutup lubang bekas suntikkan dengan kuteks, dan telur diinkubasi pada 37°C. Periksa telur ini setiap 8, 16, 8, 16 jam dan seterusnya selama 7 hari. Catat berapa jumlah embryo yang mati, dan MDT. dari embryo yang mati dihitung menurut metoda Hanson (1975).

3.4. Intracerebral Pathogenicity Index (ICPI).

Bahan : Cairan allantois segar yang terinfeksi virus ND., 24 ekor anak ayam kampung umur sehari, NaCl 0,85% steril, alkohol 70%.

Alat : Tabung reaksi, pipet, Millex-GS 0,22 um. filter unit, spuit 1 ml, kandang dan kapas.

Prosedur :

Cairan allantois segar yang terinfeksi virus ND. setelah dipusingkan dan disaring dengan Millex-GS filter unit, diencerkan menjadi 10^{-1} dengan cara memasukkan 1,8 ml NaCl 0,85% steril kedalam tabung-reaksi memakai pipet. Tambahkan 0,2 ml cairan allantois segar yang terinfeksi kedalam tabung tadi, dan campur isinya. Suntikkan masing-masing 0,05 ml secara intracerebral pada 10 anak ayam kampung umur sehari, sedangkan 2 anak ayam kampung lainnya, dipakai sebagai kontrol dan hanya disuntik dengan 0,05 ml NaCl 0,85% steril. Anak ayam percobaan dan anak ayam kontrol diletakkan dalam kandang terpisah, dan diamati setiap hari selama 8 hari. Catat kondisi anak ayam tersebut; berapa yang tetap sehat / normal, sakit dan mati. Intracerebral Pathogenicity Index dihitung menurut metoda Allan (1978).

3.5. Intravenous Pathogenicity Index (IVPI).

Bahan : Cairan allantois segar yang terinfeksi virus ND., 24 ekor ayam kampung umur 6 minggu (tidak mengandung antibodi terhadap ND), NaCl 0,85% steril dan alkohol 70%.

Alat : Tabung reaksi, pipet, Millex-GS 0,22 um.
filter unit, spuit 1 ml, Kandang dan kapas.

Prosedur :

Cairan allantois segar yang terinfeksi virus ND. setelah dipusingkan dan disaring dengan Millex-GS filter unit, diencerkan menjadi 10^{-1} dengan cara memasukkan 1,8 ml NaCl 0,85% steril kedalam tabung reaksi memakai pipet. Tambahkan 0,2 ml cairan allantois segar yang terinfeksi kedalam tabung tadi, dan campur isinya. Suntikkan masing-masing 0,1 ml secara intravenous pada 10 ayam kampung umur 6 minggu, sedangkan 2 ayam kampung lainnya hanya disuntik dengan 0,1 ml NaCl 0,85% steril (sebagai kontrol). Ayam percobaan dan kontrol diletakkan dalam kandang terpisah, dan diamati setiap hari selama 10 hari. Catat kondisi ayam kampung tersebut, berapa yang tetap sehat, sakit, paralisa dan mati. Intravenous Pathogenicity Index (IVPI) dihitung menurut metoda Allan (1978). Ayam-ayam yang mati dinekropsi, dan organ-organ yang mengalami perubahan (otak, paru-paru, trachea, proventrikulus, ventrikulus, usus dan sekaton sil) diambil kemudian digerus untuk membuat suspensi 10%. Suntikkan masing-masing 0,1 ml suspensi 10% ini kedalam 5 telur ayam berembryo umur 9 hari. Telur yang mati, cairan allantoisnya dipanen kemudian dilakukan uji HA. dan HI.

3.6. Pembentukan Plaque.

Bahan : Cairan allantois yang terinfeksi virus ND., 5 telur ayam berembryo umur 9 hari , PBS. steril pH 7,2 , trypsin 0,25%, serum anak sapi, Hank's Growth Media, Media Agarose 0,75%, Netral red 1%.

Alat : Gunting, pinset, pipet, petridish, gelas Erlenmeyer, tabung centrifuge, magnetic stirrer, botol (falcon flask), corong dan filter.

Prosedur :

Biakan sel chicken embryo fibroblast (CEF) monolayer disiapkan dari telur ayam berembryo umur 9 hari. Kulit telur didesinfeksi dengan kapas beralkohol, kemudian telur dibuka dengan gunting steril. Embryo dikeluarkan hati-hati dengan pinset steril, dan segera dimasukkan kedalam petridish. Bagian mata, paruh, anggota gerak dan organ visceral dikeluarkan dan karkas dipotong kecil-kecil sampai halus. Masukkan potongan karkas ini kedalam gelas Erlenmeyer, kemudian dicuci dengan PBS. steril pH 7,2 sebanyak 3 kali sambil diputar pada magnetic stirrer, selama 10 menit. Supernatan dibuang, dan lakukan trypsinasi 3 kali. Tambahkan 20 ml trypsin 0,25% kedalam gelas Erlenmeyer, kemudian putar pada magnetic stirrer selama 15 menit.

Supernatan pada trypsinasi pertama dibuang, sedangkan trypsinasi kedua dan ketiga ditampung.

Tambahkan serum anak sapi 10 ml kedalam supernatan tadi, kemudian disaring. Supernatan dimasukkan kedalam tabung centrifuge dan dipusingkan dengan kecepatan 1000 rpm. selama 10 menit. Supernatan dibuang, dan filtratnya yang mengandung kira-kira 1×10^6 sel, disuspensikan kedalam Hank's Growth Media (70 ml Hank's BSS., 20 ml Media 199, 10 ml serum anak sapi, 1 ml Glutamin, 0,5 ml Vitamin MEM. Eagle's, 200 IU Penicilline, 200 ug Streptomycine, 50 ug Fungizone, 4 ml Sodium bikarbonat 4,4%).

Suspensi sel ini masing-masing dimasukkan 2 ml kedalam 25 botol kecil (falcon flask). Biakan sel diinkubasi 37°C selama 24 - 48 jam sampai terbentuk sel monolayer.

Dua cairan allantois yang terinfeksi virus ND. setelah disaring dengan Millex-GS 0,22 um. filter unit, diencerkan menjadi 10^{-1} dengan cara : masukkan 0,9 ml larutan Hank's kedalam tabung reaksi memakai pipet, kemudian tambahkan kedalamnya 0,1 ml cairan allantois yang terinfeksi virus ND.

Dua cairan allantois yang terinfeksi virus ND. ditambahkan masing-masing 0,1 ml kedalam 10 biakan sel yang medianya telah dibuang.

Dua pengenceran 10^{-1} dari cairan allantois yang terinfeksi, ditambahkan masing-masing 0,1 ml kedalam 10 biakan sel yang medianya telah dibuang. Sebagai kontrol, digunakan 5 biakan sel yang medianya juga dibuang. Semua biakan sel diinkubasi pada 37°C selama 1 jam. Tambahkan media agarose 0,75% (5 ml Agarose 0,75%, 40 ml Media 199, 5 ml serum anak sapi, 200 IU Penicilline dan 200 ug Streptomycine) masing masing 1,5 ml untuk melapisi setiap biakan sel tersebut. Biakan sel diinkubasi pada 37°C selama 72 jam. Setelah periode inkubasi tersebut, tambahkan 1% neutral red masing-masing 0,5 ml untuk melapisi setiap biakan sel. Amati pembentukan plaque setiap hari selama seminggu.

3.7. Thermostabilitas Hemaglutinin.

Bahan : Cairan allantois yang terinfeksi Virus ND., PBS. steril pH 7,2 , suspensi 1% eritrosit ayam.

Alat : Waterbath, lemari es, tabung reaksi, microplate, micropipet, rotatiter, penetes otomatis, microshaker dan cermin pembaca.

Prosedur :

Cairan allantois yang terinfeksi virus ND. di pusingkan dengan kecepatan 3000 rpm. selama 15 menit.

Supernatan diambil dengan pipet dan dimasukkan 5 ml masing-masing kedalam 4 tabung reaksi. Keempat tabung reaksi ini direndam dalam waterbath 56°C selama interval waktu pemanasan 15, 30, 60 dan 120 menit. Setelah periode pemanasan tersebut, tabung reaksi segera dimasukkan kedalam lemari es, dan dibiarkan selama 5 menit. Cairan allantois ini kemudian diuji untuk mengetahui titer hemaglutinasinya, dengan membuat pengenceran seri kelipatan dua. Setelah penambahan 0,05 ml suspensi 1% eritrosit ayam masing-masing kedalam semua lubang dari microplate, maka microplate diayak pada microshaker selama 15 detik. Microplate dibiarkan pada suhu kamar, dan baca titer hemaglutinasinya mulai 15 menit pertama sampai 45 menit kemudian diatas cermin pembaca. Interpretasi : Pada pengenceran tertinggi dari cairan allantois yang terinfeksi virus ND. yang memberikan 100% hemaglutinasi, dihitung sebagai titik akhir.

Catat berapa besar titer hemaglutinasi dari cairan allantois yang terinfeksi virus ND. yang dipanaskan dalam waterbath 56°C selama 15, 30, 60 dan 120 menit.

3.8. Waktu Elusi.

Bahan : Cairan allantois yang terinfeksi virus ND., PBS. steril pH 7,2 , suspensi 1% eritrosit ayam.

Alat : Microplate, micropipet, penetes otomatis, rotatiter, microshaker, lemari es dan cermin pembaca.

Prosedur :

Waktu elusi dari cairan allantois yang terinfeksi virus ND. terhadap eritrosit ayam, dipelajari dengan uji microtiter hemaglutinasi (HA) pada suhu 4°C. Virus diencerkan secara seri kelipatan dua pada microplate dengan PBS. (caranya sama seperti pada uji thermostabilitas hemaglutinin). Setelah penambahan 0,05 ml suspensi 1% eritrosit ayam, microplate diayak pada microshaker selama 15 detik.

Inkubasi microplate ini pada suhu 4°C, dan bila sampai 24 jam belum terjadi elusi, maka microplate diayak kembali pada microshaker selama 15 detik.

Amati terjadinya elusi 2 jam kemudian.

IV. HASIL PENELITIAN

4.1. Pembiakan Virus.

Pada pembiakan virus, telur ayam berembryo yang disuntik dengan virus ND. mati pada hari kedua dan ketiga. Cairan allantoisnya, setelah diuji dengan mikrotiter hemaglutinasi (HA), didapatkan titernya masing-masing 64 HA./0,025 ml (isolat₁) dan 128 HA./0,025 ml (isolat₂).

Pada pembiakan virus kedua atau pasase kedua, telur ayam berembryo yang disuntik dengan cairan allantois yang terinfeksi, mati pada hari ketiga, dan cairan allantoisnya setelah diuji dengan HA., didapatkan titernya masing-masing 1024 HA./0,025 ml (isolat₁) dan 512 HA./0,025 ml (isolat₂).

Konfirmasi (peneguhan) virus ini dengan uji hambat hemaglutinasi (HI) menggunakan serum kebal ND., menunjukkan serum tersebut mampu menghambat hemaglutinasi.

4.2. Embryo Lethal Dosis-50 (ELD₅₀).

Dosis lethal minimal dari virus ND. yang dapat membunuh 50% embryo ayam adalah mempunyai titer $10^{9,4}$ ELD₅₀ / ml (isolat₁) dan $10^{10,6}$ ELD₅₀ / ml (isolat₂). Perhitungan ELD₅₀ menurut metoda Reed dan Muench (1938) dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1 : Hasil uji Embryo Lethal Dosis-50 (ELD_{50}).

Virus Newcastle Disease	Pengenceran virus Log. 10	Ratio kema- tian	Respon		Angka akumulasi			Kematian (%)
			mati	hidup	mati	hidup	ratio	
Isolat ₁	10^{-7}	5/5	5	0	10	0	10/10	100
	10^{-8}	2/5	2	3	5	3	5/8	62,50
	10^{-9}	2/5	2	3	3	6	3/9	33,33
	10^{-10}	1/5	1	4	1	10	1/11	9,09
	10^{-11}	0/5	0	5	0	15	0/15	0
Isolat ₂	10^{-7}	5/5	5	0	16	0	16/16	100
	10^{-8}	4/5	4	1	11	1	11/12	91,66
	10^{-9}	3/5	3	2	7	3	7/10	70
	10^{-10}	2/5	2	3	4	6	4/10	40
	10^{-11}	2/5	2	3	2	9	2/11	18,18
	10^{-12}	0/5	0	5	0	14	0/14	0

Keterangan : ELD_{50} dihitung menurut metoda Reed dan Muench (1938).

$$\text{Isolat}_1 : \text{Proporsionate Distance} = \frac{62,50 - 50}{62,50 - 33,33} = 0,4$$

$$\text{Endpoint Dilution} = 10^{-8 + 0,4} = 10^{-8,4}$$

Dosis penyuntikan 0,1 ml,

$$\begin{aligned} \text{jadi titer virus} &= \frac{1}{10^{-8,4} \times 10^{-1}} \\ &= 10^{9,4} \text{ ELD}_{50}/\text{ml}. \end{aligned}$$

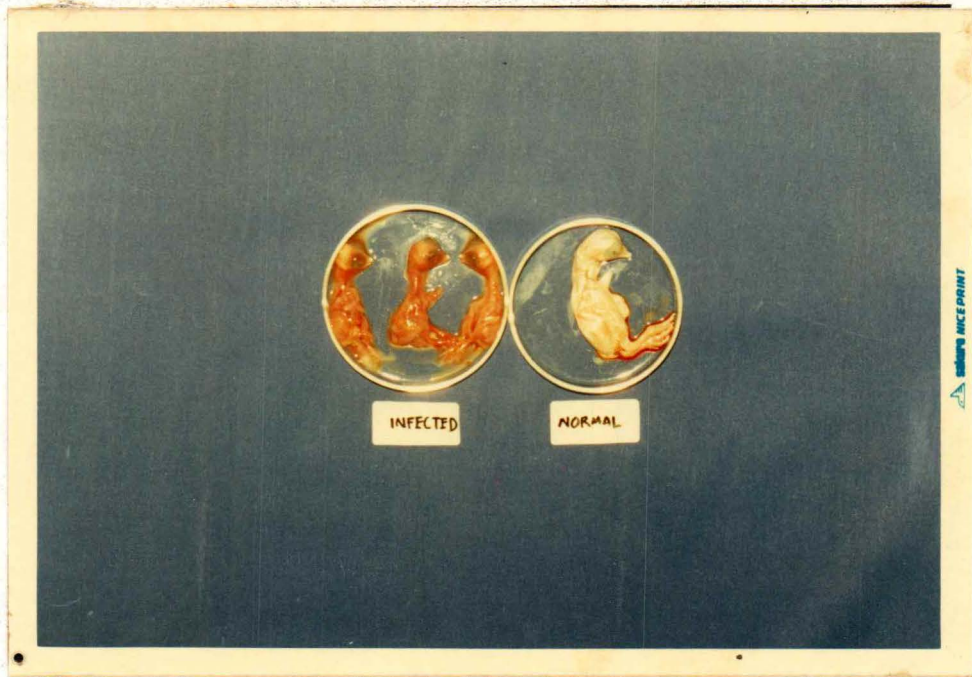
$$\text{Isolat}_2 : \text{Proporsionate Distance} = \frac{70 - 50}{70 - 40} = 0,6$$

$$\text{Endpoint Dilution} = 10^{-9 + 0,6} = 10^{-9,6}$$

Dosis penyuntikan 0,1 ml,

$$\begin{aligned} \text{jadi titer virus} &= \frac{1}{10^{-9,6} \times 10^{-1}} \\ &= 10^{10,6} \text{ ELD}_{50}/\text{ml}. \end{aligned}$$

Gambar 2 : Embryo yang terinfeksi oleh isolat virus ND.
dari burung kakatua.



Keterangan :

Embryo yang terinfeksi oleh isolat virus ND.
dari burung kakatua (kiri) dan embryo kontrol
(kanan).

4.3. Mean Death Time (MDT).

Dosis lethal minimal atau pengenceran tertinggi dari virus ND. yang dapat membunuh semua embryo ayam umur 10 hari adalah dalam waktu : 59,07 jam (isolat₁) dan 58,70 jam (isolat₂).

Perhitungan MDT. menurut metoda Hanson (1975) dapat dilihat pada tabel 2.

4.4. Intracerebral Pathogenicity Index (ICPI).

Kedua isolat virus ND. dari burung kakatua yang disuntikkan pada anak ayam kampung umur sehari masing-masing mempunyai ICPI. 1,73 (isolat₁) dan 1,63 (isolat₂). Perhitungan ICPI. menurut metoda Allan (1978) dapat dilihat pada tabel 3a dan 3b.

4.5. Intravenous Pathogenicity Index (IVPI).

Kedua isolat virus ND. dari burung kakatua yang disuntikkan pada ayam kampung umur 6 minggu, masing-masing mempunyai IVPI. 2,08 (isolat₁) dan 2,44 (isolat₂). Perhitungan IVPI. menurut metoda Allan (1978) dapat dilihat pada tabel 4a dan 4b.

Gejala klinis dari ayam ini menunjukkan adanya depresi, anoreksia, tortikolis dan kelempehan anggota gerak serta diare putih kehijauan. Pemeriksaan bedah bangkai, menunjukkan adanya perubahan berupa lesi-lesi berdarah pada usus halus, perdarahan ptekie dan ekimose pada proventrikulus, ventrikulus dan sekaton sil.

Tabel 2 : Hasil uji Mean Death Time (MDT).

Pengenceran virus Log. 10	Setelah penyuntikkan (jam)												Jumlah infeksi	Kematian (%)	MDT. (jam)
	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96	104	120			
IP* 10 ⁻¹⁰	0	0	-	0	0	-	0	0	-	1	0	-	1/5	20	60,00
10 ⁻⁹	0	0	-	0	0	-	1	0	-	1	0	-	2/5	40	
10 ⁻⁸	0	0	-	2	0	-	1	0	-	0	0	-	3/5	60	
10 ⁻⁷	0	0	-	3	0	-	2	0	-	0	0	-	5/5	100	
10 ⁻¹	0	0	-	5	0	-	0	0	-	0	0	-	5/5	100	
10 ⁻¹¹	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0/5	0	58,29
10 ⁻¹⁰	0	0	-	0	0	-	0	0	-	1	0	-	1/5	20	
10 ⁻⁹	0	0	-	2	0	-	1	0	-	0	0	-	3/5	60	
10 ⁻⁸	0	0	-	3	0	-	2	0	-	0	0	-	5/5	100	
10 ⁻¹	0	0	-	4	0	-	1	0	-	0	0	-	5/5	100	
IS** 10 ⁻¹⁰	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0/5	0	58,13
10 ⁻⁹	0	-	0	0	-	0	1	-	0	1	-	0	2/5	40	
10 ⁻⁸	0	-	0	1	-	0	2	-	0	0	-	0	3/5	60	
10 ⁻⁷	0	-	0	3	-	2	0	-	0	0	-	0	5/5	100	
10 ⁻¹	0	-	0	5	-	0	0	-	0	0	-	0	5/5	100	
10 ⁻¹¹	0	-	0	0	-	0	0	-	0	1	-	0	1/5	20	59,11
10 ⁻¹⁰	0	-	0	1	-	0	2	-	0	0	-	0	3/5	60	
10 ⁻⁹	0	-	0	2	-	0	2	-	0	0	-	0	4/5	80	
10 ⁻⁸	0	-	0	2	-	2	1	-	0	0	-	0	5/5	100	
10 ⁻¹	0	-	0	5	-	0	0	-	0	0	-	0	5/5	100	

Keterangan : IP* = Penyuntikan pagi jam 08.00 WIB.

IS** = Penyuntikan sore jam 17.00 WIB.

0 = Tidak ada embryo yang mati.

1 - 5 = Jumlah embryo yang mati.

- = Tidak diamati.

Perhitungan : MDT. menurut metoda Hanson (1975).

$$\begin{aligned} \text{MDT. (isolat}_1\text{) IP*} &= \frac{(10 \times 48) + (4 \times 72) + (2 \times 96)}{16} \\ &= \frac{480 + 288 + 192}{16} \\ &= \frac{960}{16} = 60,00 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{MDT. (isolat}_1\text{) IS**} &= \frac{(9 \times 48) + (2 \times 64) + (3 \times 72) + (1 \times 96)}{15} \\ &= \frac{432 + 128 + 216 + 96}{15} \\ &= \frac{872}{15} = 58,13 \end{aligned}$$

$$\text{MDT. rata-rata (isolat}_1\text{)} = \frac{60,00 + 58,13}{2} = 59,07$$

$$\begin{aligned} \text{MDT. (isolat}_2\text{) IP*} &= \frac{(9 \times 48) + (4 \times 72) + (1 \times 96)}{14} \\ &= \frac{432 + 288 + 96}{14} \\ &= \frac{816}{14} = 58,29 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{MDT. (isolat}_2\text{) IS**} &= \frac{(10 \times 48) + (2 \times 64) + (5 \times 72) + (1 \times 96)}{18} \\ &= \frac{1064}{18} = 59,11 \end{aligned}$$

$$\text{MDT. rata-rata (isolat}_2\text{)} = \frac{58,29 + 59,11}{2} = 58,70$$

Tabel 3a : Hasil uji Intracerebral Pathogenecity Index
(ICPI) isolat₁

Keadaan anak ayam setelah disuntik	H A R I								Jum- lah	Bobot (Fac- tor)	Total
	1	2	3	4	5	6	7	8			
N o r m a l	10	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0
S a k i t	0	2	0	0	0	0	0	0	2	1	2
M a t i	0	8	10	10	10	10	10	10	68	2	136
J u m l a h									80		138

Perhitungan : ICPI. menurut metoda Allan (1978).

$$\begin{aligned}
 \text{ICPI. (isolat}_1) &= \frac{(10 \times 0) + (2 \times 1) + (68 \times 2)}{80} \\
 &= \frac{0 + 2 + 136}{80} = \frac{138}{80} \\
 &= 1,73.
 \end{aligned}$$

Tabel 3b : Hasil uji Intracerebral Pathogenicity Index
(ICPI) isolat₂

Keadaan anak ayam setelah disuntik	H A R I								Jum- lah	Bobot (Fac- tor)	Total
	1	2	3	4	5	6	7	8			
N o r m a l	10	2	0	0	0	0	0	0	12	0	0
S a k i t	0	4	2	0	0	0	0	0	6	1	6
M a t i	0	4	8	10	10	10	10	10	62	2	124
J u m l a h									80		130

$$\text{ICPI. (isolat}_2) = \frac{130}{80} = 1,63.$$

Gambar 3 : Anak ayam kampung umur sehari yang disuntik dengan isolat virus ND. dari burung kakatua.



Keterangan :

Anak ayam kampung umur sehari yang menunjukkan tanda klinis khas ND.

Tabel 4a : Hasil uji Intravenous Pathogenicity Index (IVPI) isolat₁

Keadaan ayam setelah di- suntik	H a r i										Jumlah	Bobot (Factor)	Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Normal	10	2	2	2	2	2	2	2	2	2	32	0	0
Sakit	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2
Paralisa	0	6	4	0	0	0	0	0	0	0	10	2	20
Mati	0	0	4	8	8	8	8	8	8	8	76	3	228
Jumlah											120		250

Perhitungan : IVPI. menurut metoda Allan (1978).

$$\begin{aligned} \text{IVPI. (isolat}_1) &= \frac{(32 \times 0) + (2 \times 1) + (10 \times 2) + (76 \times 3)}{120} \\ &= \frac{0 + 2 + 20 + 228}{120} = \frac{250}{120} = 2,08. \end{aligned}$$

Tabel 4b : Hasil uji Intravenous Pathogenicity Index (IVPI) isolat₂

Keadaan ayam setelah di- suntik	H a r i										Jumlah	Bobot (Factor)	Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Normal	10	4	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0
Sakit	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	4
Paralisa	0	2	4	0	0	0	0	0	0	0	6	2	12
Mati	0	0	6	10	10	10	10	10	10	10	76	3	228
Jumlah											100		244

$$\begin{aligned} \text{IVPI. (isolat}_2) &= \frac{(14 \times 0) + (4 \times 1) + (6 \times 2) + (76 \times 3)}{100} \\ &= \frac{0 + 4 + 12 + 228}{100} = \frac{244}{100} = 2,44 \end{aligned}$$

Gambar 4 : Ayam kampung umur 6 minggu yang disuntik dengan isolat virus ND. dari burung kakatua.



Keterangan :

Ayam kampung umur 6 minggu yang menunjukkan tanda klinis khas ND.

Virusnya dapat diisolasi kembali dari cairan allantois telur ayam berembryo umur 9 hari, dan pada pemeriksaan mikrotiter hemaglutinasi, virus tersebut masing-masing mempunyai titer 64 HA./0,025 ml (isolat₁ dan 2). Konfirmasi virus ini dengan uji mikrotiter hambat hemaglutinasi menggunakan serum kebal ND., menunjukkan serum tersebut mampu menghambat hemaglutinasi.

4.6. Pembentukan Plaque.

Pada pembiakan sel CEF. yang dilapisi dengan media Agarose 0,75%, kedua isolat virus ND. membentuk red dan clear plaque dalam waktu 72 jam.

4.7. Thermostabilitas Hemaglutinin.

Pada uji thermostabilitas hemaglutinin dengan menggunakan uji mikrotiter hemaglutinasi, kedua isolat virus ND. dari burung kakatua mempunyai stabilitas hemaglutinin pada suhu 56°C sampai 60 menit (tabel 5).

4.8. Waktu Elusi.

Waktu elusi dari kedua isolat virus ND. dari burung kakatua yang diuji dengan mikrotiter hemaglutinasi pada suhu 4°C adalah 26 jam, sedangkan pada suhu kamar (25°C) adalah 24 jam (tabel 6).

Tabel 5 : Hasil uji Stabilitas Hemaglutinin pada suhu 56°C.

Periode pemanasan (menit)	Titer Hemaglutinasi (HA)	
	Isolat ₁	Isolat ₂
15	1024	512
30	512	256
60	64	32
120	0	0

Keterangan : Kedua isolat mempunyai stabilitas hemaglutinin pada suhu 56°C sampai 60 menit.

Tabel 6 : Hasil uji waktu Elusi pada suhu 4°C.

S u h u (°C)	W a k t u e l u s i (j a m)	
	Isolat ₁	Isolat ₂
4	26	26
25	24	24

Keterangan : Waktu elusi kedua isolat pada suhu 4°C adalah 26 jam, sedangkan pada suhu 25°C (sebagai kontrol) 24 jam.

V. PEMBAHASAN

Penyuntikkan isolat virus ND. dari burung kakatua pada telur ayam berembryo umur 9 hari, menyebabkan kematian embryo ayam tersebut dalam waktu 2 - 3 hari.

Perubahan yang terlihat pada embryo ayam yang mati ini, adalah adanya perdarahan pada jaringan sub kutan, daerah occipital, selaput kuning telur dan kongesti umum dari embryo tersebut. Kematian embryo ayam dalam waktu singkat, disertai adanya perdarahan pada jaringan sub kutan, menunjukkan virulensi dari isolat virus ND. tersebut.

Hal ini diperkuat dengan titer virus tersebut pada cairan allantois dengan uji mikrotiter hemaglutinasi (HA) yang relatif rendah.

Pada perhitungan Embryo Lethal Dosis-50 (ELD_{50}) terlihat bahwa pengenceran tertinggi dari isolat virus ND. ini yang dapat membunuh 50% embryo ayam adalah mempunyai titer $10^{9,4}$ ELD_{50}/ml (isolat₁) dan $10^{10,6}$ ELD_{50}/ml (isolat₂). Pengenceran virus yang tinggi namun masih mampu membunuh 50% embryo ayam, menunjukkan indikasi bahwa kedua isolat virus ND. tersebut mempunyai virulensi yang cukup tinggi.

Hasil uji Mean Death Time (MDT) terlihat bahwa dosis lethal minimal (MLD) atau pengenceran tertinggi dari isolat virus ND. yang dapat membunuh seluruh embryo ayam

umur 10 hari adalah rata-rata 59,07 jam (isolat₁) dan 58,70 jam (isolat₂). Standar MDT. yang telah ditentukan dalam "Methods for the Examination of Poultry Biologics" untuk galur lentogenik adalah lebih besar dari 90 jam; galur mesogenik antara 60 - 90 jam dan galur velogenik antara 40 - 60 jam (Allan et al., 1978).

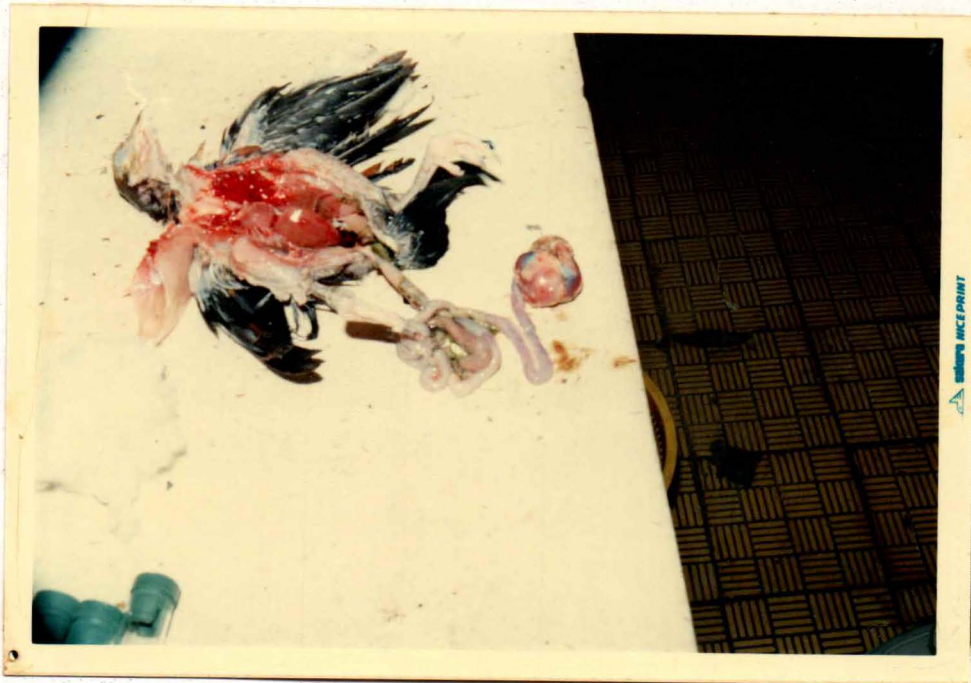
Beberapa galur velogenik yang MDT.nya tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian ini adalah galur Texas GB. (MDT. 55 jam), galur Holland'70 (MDT. 58,6 jam) dan galur England'70 (MDT. 60,0 jam) (Lancaster dan Alexander, 1975; Allan et al., 1978).

Hasil uji Intracerebral Pathogenicity Index (ICPI) didapatkan bahwa semua anak ayam kampung umur sehari mati dalam 2 - 4 hari setelah disuntik secara intracerebral dengan isolat virus ND. Hasil perhitungan ICPI. didapatkan masing-masing 1,73 (isolat₁) dan 1,63 (isolat₂). Standar ICPI. yang telah ditentukan dalam "Methods for the Examination of Poultry Biologics" untuk galur lentogenik adalah kurang dari 0,5 ; galur mesogenik antara 0,5 - 1,5 dan galur velogenik antara 1,5 - 2 (Allan et al., 1978). Beberapa galur velogenik yang ICPI.nya tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian ini adalah galur England'66 (ICPI. 1,70), galur Texas GB. (ICPI. 1,75) dan galur Canada'71 (ICPI. 1,76) (Lancaster dan Alexander, 1975; Allan et al., 1978).

Hasil uji Intravenous Pathogenicity Index (IVPI) pada ayam kampung umur 6 minggu, didapatkan bahwa sebagian besar ayam kampung tersebut mati pada hari keempat setelah disuntik dengan isolat virus ND. secara intravenous. Hasil perhitungan IVPI. didapatkan masing-masing 2,08 (isolat₁) dan 2,44 (isolat₂). Menurut Hanson dan Brandly (1955) mengatakan bahwa galur lentogenik dan mesogenik tidak akan membunuh ayam peka umur 6 minggu bila disuntik dengan dosis lethal embryo 50% (ELD₅₀), sebaliknya galur velogenik dapat membunuh ayam peka umur 6 minggu bila disuntik dengan dosis lethal embryo 50% (ELD₅₀). Beberapa galur velogenik yang IVPI.nya tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian ini adalah galur Canada'71 (IVPI. 2,10), Buxted Essex'70 (IVPI. 2,51) dan galur Asiatic'68 (IVPI. 2,41).

Ayam kampung umur 6 minggu yang disuntik isolat virus ND. dari burung kakatua secara intravenous, menunjukkan tanda klinis depresi, anoreksia, tortikolis, kelumpuhan anggota gerak dan diare putih kehijauan. Diantara gejala klinis diatas, yang paling menonjol adalah gejala saraf berupa tortikolis dan kelumpuhan anggota gerak serta gejala pencernaan berupa diare putih kehijauan. Perubahan patologik yang paling menonjol pada bedah bangkai adalah adanya lesi-lesi berdarah pada saluran pencernaan.

Gambar 5 : Perubahan bedah bangkai pada ayam kampung umur 6 minggu.



Keterangan :

Lesi-lesi berdarah pada usus halus dari ayam kampung umur 6 minggu yang disuntik dengan isolat virus ND. dari burung kakatua.

FKH UNAIR
nama:
IM/NIP:
DOMOR:

tologik seperti diatas menyerupai bentuk pe-
dilaporkan oleh Doyle pada tahun 1927, yang
leh galur viscerotropik velogenik atau lebih
gai galur Asia (Hanson, 1972 dan 1975; Lan-
lexander, 1975).

ND. yang menimbulkan kematian pada ayam kam
pat diisolasi dan diidentifikasi kembali da-
lantois telur ayam berembryo dengan uji hema
glutinasasi (HA) dan uji hambat hemaglutinasasi (HI).

Pembentukan plaque pada biakan sel chicken embryo
fibroblast (CEF) yang dilapisi media Agarose (Agar over-
lay), dapat diamati mulai 72 jam setelah diinfeksi deng-
an isolat virus ND. dari burung kakatua. Tipe plaque
yang tumbuh pada biakan sel CEF. adalah red dan clear
plaque yang berukuran antara 2 - 4 mm. Plaque yang ter-
bentuk pada biakan sel CEF., juga menggambarkan virulen-
si dari virus ND. Galur lentogenik tidak dapat memben-
tuk plaque pada biakan sel CEF.; galur mesogenik hanya
dapat membentuk satu tipe plaque saja, yaitu clear pla-
que yang berukuran antara 0,5 - 1 mm. dan galur veloge-
nik dapat membentuk dua tipe plaque pada biakan sel CEF.
yaitu red dan clear plaque yang ber kuran 0,5 - 4 mm.
(Schloer dan Hanson, 1968; Hanson, 1972).

Kedua isolat virus ND. dari burung kakatua ini,
bersifat thermostabil pada suhu 56°C sampai 60 menit

pada uji thermostabilitas hemaglutinin. Pada penelitian terdahulu dilaporkan bahwa virulensi virus ND. mempunyai hubungan dengan thermostabilitas hemaglutinin pada ayam, dimana hemaglutinin dari galur virulen tahan pemanasan pada suhu 56°C selama 30 - 120 menit, sedangkan hemaglutinin dari galur avirulen akan kehilangan aktifitasnya dalam 5 menit atau kurang (Hanson dan Spalatin, 1978). Thermostabilitas hemaglutinin virus ND. galur viscerotropik velogenik dari burung kakatua Indonesia, yang diteliti dari tahun 1975 - 1977 serta dari burung jenis parrot yang diteliti dari tahun 1968 - 1973, adalah bervariasi antara 30 - 120 menit (rata-rata 60 menit). Hasil penelitian Hanson dan Spalatin (1978) melaporkan bahwa thermostabilitas hemaglutinin dari galur velogenik dan lentogenik adalah bervariasi; adanya galur velogenik yang bersifat thermostabil dari isolat lapangan adalah kebetulan saja. Ini berarti, virulensi virus ND. tidak ada hubungan dengan thermostabilitas hemaglutinin.

Kedua isolat virus ND. dari burung kakatua mempunyai waktu elusi 26 jam pada suhu 4°C . Waktu elusi ini relatif lambat, dan sama seperti yang dilaporkan untuk galur lentogenik yang mempunyai waktu elusi yang bervariasi dari lambat sampai cepat (Rosenberger et al., 1975; Cloud dan Rosenberger, 1980; Vickers dan Hanson, 1982).

Kasus ND. yang menyerang burung kakatua pernah dilaporkan oleh Jurong Bird Park, Singapura yang menyerang 10 ekor burung kakatua jenis sulphurea. Hasil pemeriksaan Laboratorium Veteriner Singapura menetapkan, kesepuluh burung kakatua tersebut terserang virus ND. galur velogenik (- Chew dan Liow, 1974). Galur yang sama, juga dilaporkan telah menimbulkan wabah yang bersifat akut, yang telah menimbulkan kematian 32 ekor burung kakatua yang diekspor dari Singapura ke Inggris selama tahun 1968 (Cavill, 1974).

Berdasarkan uji patogenisitas yang didasari dengan uji MDT., ICPI., dan IVPI., kedua isolat virus ND. dari burung kakatua yang diteliti ini, tergolong galur velogenik. Hal ini sesuai dengan standar yang ditentukan untuk galur velogenik dalam "Methods for the Examination of Poultry Biologics" yaitu mempunyai MDT. 40 - 60 jam; ICPI. 1,5 - 2 dan IVPI. 2 - 3. Hasil uji patogenisitas ini diperkuat oleh hasil uji pembentukan plaque pada biakan sel CEF., yaitu membentuk red dan clear plaque yang sesuai untuk galur velogenik. Kedua isolat virus ND. dari burung kakatua ini bersifat thermostabil pada suhu 56°C dan mempunyai waktu elusi yang relatif lambat pada suhu 4°C.

Berdasarkan gejala klinis dan perubahan patologik pada bedah bangkai dari ayam kampung yang disuntik dengan isolat virus ND., maka kedua isolat virus ND. dari

burung kakatua ini tergolong galur neuro-viscerotropik velogenik.

Dengan telah diketahuinya beberapa karakter isolat virus ND. dari burung kakatua ini, maka kemungkinan pertama bahwa burung-burung kakatua yang terdapat di Indonesia terserang virus ND. galur velogenik. Bila dugaan ini benar, ini berarti burung-burung kakatua yang ada di Indonesia dapat merupakan sumber penularan virus ND.

yang potensial sepanjang tahun terhadap peternakan unggas di Indonesia. Mengingat burung kakatua termasuk burung-burung liar yang terbang bebas, maka pemberantasan ND. pada burung ini sangat sulit dilaksanakan.

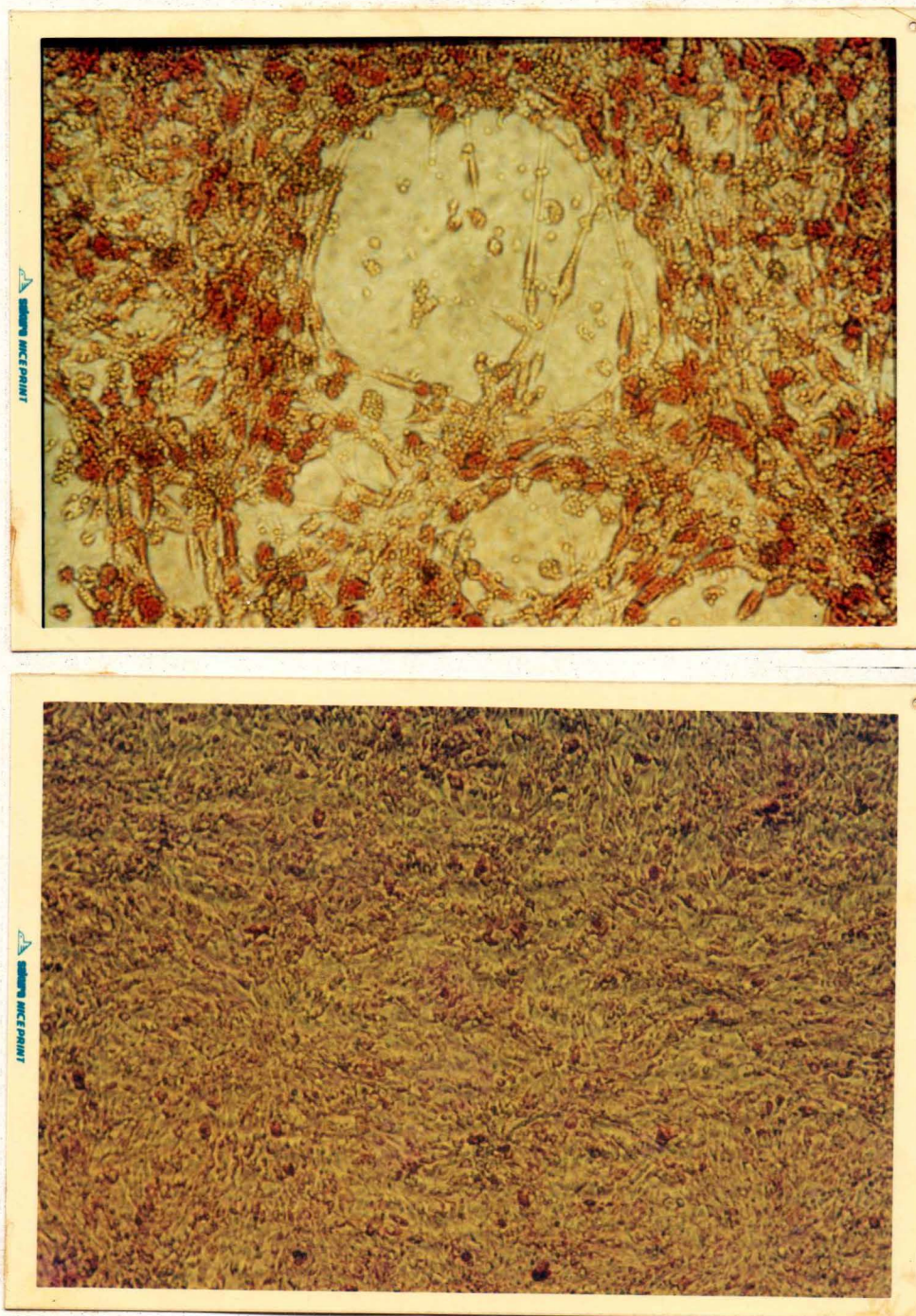
Untuk mencegah wabah ND. yang dapat timbul sewaktu-waktu pada peternakan unggas, maka perlu dilakukan vaksinasi yang rutin sepanjang tahun; ini berarti diperlukan biaya yang cukup banyak untuk tujuan tersebut. Berhubung burung kakatua merupakan penular ND. yang potensial, maka disarankan untuk melakukan pemeriksaan yang ketat terhadap ekspor burung kakatua ke luar negeri.

Burung kakatua banyak dipelihara sebagai burung kesayangan, untuk itu kepada pemiliknya disarankan untuk memvaksinasi burungnya, agar tidak terserang ND.

Kemungkinan kedua, burung kakatua ini tertular virus ND. di tempat-tempat penampungan para eksportir burung atau di tempat Karantina Kehewan.

Bila dugaan ini benar, maka dapat menimbulkan kerugian yang cukup banyak bagi negara dan para eksportir, karena burung kakatua tersebut tidak dapat diekspor lagi. Sebagai pencegahannya, dapat disarankan agar melakukan desinfeksi dan fumigasi pada kandang tempat penampungan burung secara rutin, baik sebelum dan sesudah kandang tersebut digunakan. Disamping itu, lokasi penampungan dan karantina burung harus terisolasi jauh dari peternakan ayam.

Gambar 6 : Pembentukan plaque pada biakan sel CEF.



Keterangan :

Gambar atas : Plaque yang terbentuk pada biakan sel CEF., sedang gambar bawah : kontrol biakan sel CEF.

VI. RINGKASAN

Dua isolat virus ND. dari burung kakatua, dipakai sebagai studi untuk mempelajari beberapa karakter virus tersebut.

Kedua isolat virus ND. tersebut mempunyai ELD_{50} masing-masing $10^{9,4}$ ELD_{50} / ml (isolat₁) dan $10^{10,6}$ ELD_{50} / ml (isolat₂). Patogenisitas dari kedua isolat masing-masing mempunyai : MDT. 59,07 jam (isolat₁) dan 58,70 jam (isolat₂); ICPI. 1,73 (isolat₁) dan 1,63 (isolat₂) dan IVPI. 2,08 (isolat₁) dan 2,44 (isolat₂). Pada ayam kampung yang disuntik dengan kedua isolat ini, menunjukkan tanda klinis dan perubahan bedah bangkai yang menciri untuk ND.

Pada biakan sel CEF. yang dilapisi dengan Media Agarose 0,75%, kedua isolat virus ND. membentuk red dan clear plaque dalam waktu 72 jam.

Karakter lain dari kedua isolat virus ND. ini, adalah menunjukkan stabilitas hemaglutinin pada suhu $56^{\circ}C$ sampai 60 menit, dan mempunyai waktu elusi 26 jam pada suhu $4^{\circ}C$.

Kesimpulan yang dapat ditarik dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kedua isolat virus ND. dari burung kakatua dapat digolongkan kedalam galur neuro-viscerotropik velogenik.

DAFTAR PUSTAKA

- Allan, W.H., Lancaster, J.E. and Toth, B. (1978).
Newcastle Disease Vaccine. FAO, Rome, Italy. :
74 - 79
- Andrewes, C. and Pereira, H.G. (1972). Viruses of Vertebrates. 3th Ed. Bailliere, Tindall, London. :
223 - 226; 234 - 236.
- Anonimus. (1981). Pedoman Pengendalian Penyakit Hewan Menular. Dir.Keswan. Jakarta. : 5 - 16.
- Anonimus. (1985). Kakatua Raja Dikembalikan Dari AS. Harian Pagi Kompas. Ed. Jumat, 15 Maret. :
VI - 4 - 6.
- Bruner and Gillespie. (1973). Hagan's Infectious Disease of Domestic Animals. 6th Ed. Comstock Publishing Ass. Cornel University Press. :
1065 - 1070.
- Cavill, J.P. (1974). Newcastle Disease in Imported Psittacine Birds. Vet. Rec. 94 (11) :
226 - 227.
- Chew, M. and Liow, T.M. (1974). Vaccination of Cockatoos and Parakeet Against Newcastle Disease. Avian Dis. 18 (1) : 111 - 117.

- Cloud, S.S. and Rosenberger, J.K. (1980).
Characterization of Nine Avian Paramyxoviruses.
Avian Dis. 24 (1) : 139 - 152.
- Eaves, F.W. and Grimes, T.M. (1978). The Isolation and
Characterization of a Newcastle Disease Virus
an Exotic Parrot. Aust. vet. J. 54 (11) :
534 - 537.
- Erickson, G.A. (1980). Viscerotropic Velogenic Newcastle
Disease in Pigeons : Clinical Disease and Immu-
nization. Avian Dis. 24 (1) : 257 - 267.
- Gomes-Lillo, M., Bankoski, R.A. and Wiggins, A.D. (1974).
Antigenic Relationship Among Viscerotropic
Velogenic and Domestic Strains of Newcastle
Disease Virus. Am. J. Vet. Res. 35 (4) :
471 - 475.
- Gordon, R.F. (1977). Poultry Disease. 1st Published.
Bailliere, Tindall. : 81 - 94.
- Grausgruber, W. (1973). Newcastle Disease in Parrots.
Vet. Bull. 43 (9) : 3967.
- Hanson, R.P. (1972). Newcastle Disease In : Disease of
Poultry. M.S. Hofstad. Eds. The Iowa State
University Press Ames. : 619 - 645.
- Hanson, R.P. (1975). Newcastle Disease In : Isolation

- Hanson, R.P. (1975). Newcastle Disease In : Isolation and Identification of Avian Pathogen.
S.B. Hitchner. Eds. Am. Ass. of Avian Path.
Arnold Printing Corp. Ithaca, New York. :
160 - 170.
- Hanson, R.P. and Spalatin, J. (1978). Thermostability of Hemagglutinin of Newcastle Disease Virus as a Strain Marker in Epizootiologic Studies.
Avian Dis. 22 : 659 - 665.
- Jaafir, N.A., Al-Hilly and Hatem, A.K. (1980).
An Outbreak of Newcastle Disease in a Pheasant Flock in Iraq. Avian Path. 9 : 583 - 585.
- Kingston, D.J., Dharsana, R. and Chavez, E.R. (1978).
Isolation of a Mesogenic Newcastle Disease Virus From an Acute Disease in Indonesian Ducks. Trop. Ani. Hlth. Prod. 10 : 161 - 164.
- Lancaster, J.E. (1977). Newcastle Disease a Review of the Geographical Incidence an Epizootiology.
Vet. Bull. 48 (2) : 797.
- Lancaster, J.E. and Alexander, D.J. (1975).
Newcastle Disease Virus and Spread. Canada Department of Agriculture. Monograph No.11 .
- Merchant, I.A. and Packer, R.A. (1971). Veterinary Bacteriology and Virology.

- Merchant, I.A. and Packer, R.A. (1971). *Veterinary Bacteriology and Virology*. The Iowa State University Press, Ames. : 670 - 674.
- Petrak, M.L. (1969). *Newcastle Disease In : Disease of Cage and Aviary Birds*. Lea and Febiger. Philadelphia. : 377 - 378.
- Ressang, A.A. (1984). *Patologi Khusus Veteriner*. Edisi Kedua, N.V. Percetakan Bali. : 567 - 574.
- Rosenberger, J.K., Klopp, S. and Kraus, W.C. (1975). *Characterization of Newcastle Disease Virus Isolated From Migratory Waterfowl in The Atlantic Flyway*. *Avian Dis.* 19 (1) : 142 - 149.
- Santhia, A.P.K., Dharma, D.N., Syafriati, T. dan Ekaputra, G.M.A. (1982). *Kasus Penyakit Tetelo Pada Burung Kakatua*. Dir, Keswan. Jakarta. : 193 - 196.
- Santhia, A.P.K., Dharma, D.N. dan Darmadi, P. (1983). *Kasus Penyakit Cacar Pada Burung Beo (Gracula religiosa)*. Dir.Keswan. Jakarta. : 139 - 142.
- Santhia, A.P.K., Armana, B. dan Sudana, I G. (1985). *Karakterisasi Isolat Virus ND. Pada Ayam, Angsa, Itik, Burung Pelatuk, Nuri dan Kakatua*. *Bull. Vet. BPPH. Wil. VI Denpasar, Bali.* 2 (1) : 1 - 8.

- Schloer, G.M. and Hanson, R.P. (1968). Plaque Morphology of Newcastle Disease Virus as Influenced by Cell Type and Enviromental Factor. Am. J. Vet. Res. 29 (4) : 883 - 889.
- Siegmud, O.H. (1979). The Merck Veterinary Manual. A Handbook of Diagnosis and Therapy for Veterinarian. Published by Merck & CO., Rahway, N.J. USA. : 1106 - 1217.
- Uppal, P.K. (1982). Studies on Virulence of Newcastle Disease Virus Isolated From The Bird *Hirundo Rustica* (Swallow) in Iraq. Ind. J. Comp. Micro., Imm. & Inf. Dis. 3 (4) : 204 - 207.
- Vickers, M.L. and Hanson, R.P. (1982). Characterization of Newcastle Disease Virus From Migratory Birds and Turkey. Avian Dis. 29 (1) : 127 - 133.
- Whiteman, C.E. and Bicford, A.A. (1979). Avian Disease Manual. Am. Ass. of Avian Path. Texas A & M University, College. : 49 - 53.

Lampiran I : Larutan Alsever's.

Komposisi	: D-glukosa	2,050 g
	Sodium citrate	0,800 g
	Sodium chlorida	0,420 g
	Asam citrate	0,055 g
	Aquabides	100,000 ml.

Larutan diputar pada magnetic stirrer, kemudian disaring dengan kertas saring. Sterilkan larutan ini pada autoclave, tekanan 15 lbs. selama 15 menit. Larutan tersebut didinginkan dan disimpan pada suhu 4°C (lemari es) sampai digunakan.

Lampiran II : Phosphate Buffered Saline (PBS)

(Dulbecco A) pH 7,2 - 7,4.

Komposisi	: Sodium chlorida	8,00 g
	Potassium chlorida	0,20 g
	Disodium hydrogen phosphate	1,15 g
	Potassium dihydrogen phosphate	0,20 g
	Aquabides	1000,00 ml.

Larutan diputar pada magnetic stirrer, kemudian disaring dengan kertas saring. Sterilkan larutan ini pada autoclave, tekanan 15 lbs. selama 15 menit. Larutan tersebut didinginkan dan disimpan pada suhu 4°C (lemari es) sampai digunakan.

Lampiran III : Suspensi 1% eritrosit ayam.

Darah ayam diambil dari vena dibawah sayap dengan venojec, kemudian darah dialirkan kedalam tabung reaksi yang berisi larutan Alsever's. Pusingkan darah ini dengan kecepatan 2000 rpm. selama 10 menit. Supernatannya, termasuk bagian plasma dan lekositnya, dibuang memakai pipet. Eritrosit dicuci 3 kali dengan PBS., dengan cara menambahkan PBS. sebanyak 20 kali volume eritrosit, kemudian dipusingkan dengan kecepatan 2000 rpm. selama 10 menit. Supernatan dan sisa-sisa bagian lekositnya dibuang dengan pipet. Ulangi pencucian dengan PBS. 2 kali lagi. Eritrosit dihitung konsentrasinya dengan cara mengisap eritrosit dengan tabung kapiler, kemudian salah satu ujung tabung kapiler ini disumbat dengan cara membakarnya. Tabung kapiler dipusingkan pada microcentrifuge selama 5 menit. Konsentrasi eritrosit dibaca pada microhematokrit reader. Setelah konsentrasinya diketahui (misalnya 15%), maka dibuat suspensi 1% dengan cara mencampur 1 bagian eritrosit 15% ini dengan 14 bagian PBS. Simpan suspensi eritrosit ini pada suhu 4°C (lemari es) sampai digunakan.

Lampiran IV : Stok Antibiotika 40.000 IU / ml.

Komposisi : Penicilline 5.000.000. IU
 Streptomycine 5 g
 Aquabides 125 ml.

Larutan antibiotika disaring dengan filter Seitz, kemudian disimpan pada suhu (-30°C) dengan volume 4 ml. Larutan tidak dapat dibekukan kembali setelah dicairkan.

Lampiran V : Larutan 1% Phenol red.

Komposisi : Phenol red (water soluble) 1,0 g
 Aquabides 100,0 ml.

Sterilkan pada autoclave, tekanan 15 lbs. selama 15 menit dan simpan larutan 1% phenol red ini pada suhu 4°C .

Lampiran VI : Larutan Sodium bikarbonate 4,4%.

Komposisi : Sodium bikarbonate analar 13,2 g
 Phenol red 1% 0,3 ml.
 Aquabides 300,0 ml.

Simpan larutan ini pada suhu 25°C (suhu kamar).

Lampiran VII : Larutan Glutamin.

Komposisi : Glutamin 2,92 g
 Aquabides 100,00 ml.

Saring larutan ini dengan filter Seitz, kemudian simpan pada suhu (-20°C) dalam volume 2 ml.

Lampiran VIII : Stok Trypsin 5%.

Komposisi	: Sodium chlorida	4,00 g
	Potassium chlorida	0,10 g
	Disodium hydrogen phosphate	2,25 g
	Potassium dihydrogen phosphate	0,10 g
	Phenol red 1%	0,50 ml.
	Aquabides	500,00 ml.
	Trypsin 1:250 (Difco)	2,50 g

Tambahkan serbuk trypsin pelan-pelan kedalam komposisi larutan diatas, kemudian putar pada magnetic stirrer selama 60 - 90 menit pada suhu 37°C. Larutan ini disaring dengan kertas saring, kemudian disimpan pada suhu (-30°C) tidak lebih dari 6 bulan, dalam botol volume 10 ml.

Trypsin dicairkan bila digunakan dan sisanya disimpan pada suhu 4°C tidak lebih dari seminggu.

Lampiran IX : Larutan Hank's BSS. 10 x konsentrasi.

Komposisi	: Sodium chlorida	80,00 g
	Disodium hydrogen phosphate	0,48 g
	Potassium chlorida	4,00 g
	Potassium dihydrogen phosphate	0,60 g
	Magnesium sulphate	2,00 g
	Calcium dichlorida	1,86 g
	D-glukosa	10,00 g
	Phenol red 1%	15,00 ml.
	Aquabides	1000,00 ml.

Tambahkan bahan-bahan diatas satu persatu kedalam 800 ml aquabides, kemudian buat volumenya sampai 1000 ml.

Untuk single strenght dapat dibuat dengan cara mencampur 1 bagian larutan Hank's BSS. 10 x konsentrasi dengan 9 bagian aquabides. Sterilkan larutan ini pada autoclave tekanan 15 lbs., 120°C selama 30 menit. Kedalam larutan ini ditambahkan chloroform 1 ml/100 ml larutan, kemudian simpan larutan ini pada suhu 4°C (lemari es).

Lampiran X : Serum anak sapi.

Darah diambil dari vena jugularis sapi-sapi berumur muda. Biarkan mengental pada suhu kamar atau suhu 37°C selama 2 jam. Bila serum sudah keluar, segera masukkan kedalam lemari es (4°C) selama 24 jam.

Keluarkan darah yang menggumpal (clot), kemudian serum dipusingkan pada refrigerated centrifuge dengan kecepatan 2500 rpm. selama 30 menit pada suhu 10°C. Serum diambil dan disaring dengan K5 atau EKS Seitz filter (filter ini dicuci dahulu sebelum digunakan dengan PBS. A).

Serum disimpan dalam botol susu pada suhu (-30°C) tidak lebih dari 6 bulan. Serum setelah dicairkan tidak boleh dibekukan lagi.

Lampiran XI : Media 199 (Dried TC 45, Wellcome).

Komposisi : Media 199 10 g
 Aquabides 950 ml.

Bila perlu dapat ditambahkan antibiotika. Sterilkan larutan ini dengan cara menyaring menggunakan filter Seitz besar. Simpan larutan ini pada suhu 4°C (lemari es).

Lampiran XII : Media Agarose 0,75%.

Komposisi : A. Media 199 40 ml.
 Serum anak sapi 5 ml.
 Penicilline 200 IU
 Streptomycine 200 ug

 B. Agarose 750 mg.
 Aquabides 100 ml.

Komposisi A dicampur, kemudian dipanaskan dalam waterbath suhu 45°C. Komposisi B setelah dicampur di autoclave pada tekanan 15 lbs. selama 15 menit. Biarkan larutan Agarose 0,75% ini pada suhu kamar sampai suhunya turun menjadi 50°C. Komposisi A dan B ini dicampur, kemudian media agarose ini segera dipergunakan untuk melapisi (overlay) biakan sel yang telah diinfeksi dengan virus ND.