


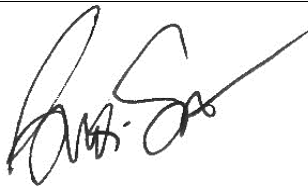




**BALAI VETERINER BUKITTINGGI**  
**INSTRUKSI KERJA PERSONEL**  
**PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN SELLER'S**

---

**NOMOR DOKUMEN :**  
**IKP - L01**

Edisi	:	V
Revisi	:	02
Tanggal	:	26 September 2023

Disiapkan oleh	Diperiksa oleh	Disetujui oleh
		 
Drh. Yul Fitria, M.Biomed Koordinator Lab. Virologi	Drh. Budi Santosa Sub Koor Sub Yantek	Drh. Gigih Tri Pambudi, MM Kepala Balai

**PENGUJIAN RABIESPEWARNAAN SELLER'S  
IKP- L01**

---

**DAFTAR ISI**

<b>No</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
1	Pendahuluan	2
2	RuangLingkup	2
3	Prinsip	2
4	Bahan	2
5	Alat	2
6	Prosedur	3
7	Pembacaan Hasil	3
9	Lampiran	4

# **PENGUJIAN RABIESPEWARNAAN SELLER'S IKP- L01**

---

## **1. PENDAHULUAN**

Rabies merupakan penyakit zoonosis yang disebabkan oleh virus neurotropik dari genus *Lyssavirus* termasuk family *Rhabdoviridae*. Materi genetik virus tersusun dari RNA. Penyakit rabies menyerang hewan berdarah panas termasuk manusia. Dan sebagai vektor atau reservoir adalah anjing, kucing dan kera. Hewan yang terserang rabies ditandai dengan 3 bentuk gejala klinis yang berbentuk galak (*furius rabies*), bentuk tenang (*dumb rabies*) dan atypikal form (tidak menciri).

## **2. RUANG LINGKUP**

Materi yang diperiksa adalah *hypocampus* dari hewan tersangka, berdarah panas (kucing, anjing, kera, dll) dalam keadaan segar atau dalam pengawet gliserin.

## **3. PRINSIP**

Preparat sentuh yang diberikan pewarnaan Seller's akan memberikan gambaran badan berwarna merah magenta dengan *inner granule* berwarna biru atau violet.

## **4. BAHAN :**

- Larutan PBS pH 7,4
- Pewarnaan Seller's
- Minyak Emersi

## **5. ALAT :**

- Kaca Preparat
- Tusuk Gigi
- Bak Pewarnaan
- Mikroskop

# PENGUJIAN RABIESPEWARNAAN SELLER'S IKP- L01

---

## 6. PROSEDUR :

1. Material segar atau material dalam pengawet 50% gliserin, dicuci beberapa kali dalam larutan PBS pH 7,4 (*lihat Lampiran*), disiapkan untuk pembuatan preparat/ film.
2. Pembuatan preparat/film (Metode Rolling) :
  - i. Material dipotong agar terbentuk bola dengan diameter 5 mm.
  - ii. Dengan tusuk gigi, material ditusuk dan dibuat preparat dengan cara mengguling-gulingkan diatas kaca preparat
3. Dalam keadaan masih basah, preparat direndam kedalam bak yang berisi pewarna Seller's (*lihat Lampiran*) selama beberapa detik, tergantung ketebalan preparat.
4. Preparat dibilas dengan menggunakan air kran.
5. Setelah bersih, preparat dibiarkan kering di udara terbuka.
6. Preparat ditetesi minyak emersi untuk selanjutnya diperiksa dibawah mikroskop cahaya pada perbesaran 400 X dan 1000 X.

## 7. PEMBACAAN HASIL

### **Positif :**

Ditemukan adanya Negri Bodi berbentuk bulat, oval, memanjang atau segitiga dan lain-lain, berukuran antara 0,24-27,0  $\mu\text{m}$ , dengan karakteristik sebagai berikut :

Negri Bodies Rabies :

- Mengandung granula-granula yang berwarna biru tua sampai gelap/hitam
- Matriks heterogen
- Kurang retraktif
- Warna merah magenta/merah tua (inner body)

### **Negatif :**

- a. Ditemukan Inklusif Bodi Non Rabies (Canine Distemper, CANINE Infectious hepatitis, Fox Encephalitis)
  - Tidak mengandung struktur internal / granula

# PENGUJIAN RABIESPEWARNAAN SELLER'S IKP- L01

---

- Matriks homogen
  - Lebih retraktif
  - Warna lebih acidofil / lebih pink
- b. Tidak ditemukan adanya Negri Bodi dalam bidang pandang mikroskop

## 8. LAMPIRAN

### 1. PEMBUATAN LARUTAN PBS pH 7,4

#### 1. ALAT :

- Timbangan
- Erlenmeyer 20liter
- pH meter
- Mikroskop

#### 2. BAHAN :

- NaCl
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### 3. PROSEDUR :

- Timbang :

NaCl	150,00 gram
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20,50 gram
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,90 gram

- Masukkan ke-3 bahan diatas kedalam wadah ukuran 20 liter, tambahkan aquades sampai volume 18 liter kemudian larutkan.
- Menggunakan pH meter, pH larutan diukur hingga 7,4 dengan menambah Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> atau KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sesuai kebutuhan.

#### 4. CARA PENYIMPANAN :

- Simpan pada suhu ruang dalam wadah tertutup.

# PENGUJIAN RABIESPEWARNAAN SELLER'S IKP- L01

---

## 2. PEMBUATAN LARUTAN PEWARNAAN SELLER'S

### 1. ALAT :

- Timbangan
- TabungErlenmeyer 2000 ml
- TabungErlenmeyer 1000 ml
- Botol Bertutup

### 2. BAHAN :

- Methylene Blue
- Methanol
- Basic Fuchsin

### 3. PROSEDUR :

- **LarutanA** : Timbang Methylene Blue sebanyak 10 gr tambahkan Methanol (bebas acetone) sampai volume 1000 ml.
- **LarutanB** : Timbang Basic Fuchsinsebanyak 5 gr tambahkan methanol (bebasacetone) sampai volume 500 ml
- Larutan stock A dan B masing-masing disimpan dalam botol tertutup.
- Larutan pewarnaan dibuat 24 jam sebelum digunakan dengan cara :
  - i. 2 bagian larutan A dicampur dengan 1 bagian larutan B.
  - ii. Masukkan larutan campuran tersebut kedalam botol tertutup dan disimpan sampai digunakan.

### 4. CARA PENYIMPANAN :

- Simpan pada suhu ruangdalamwadahtertutup.



**BALAI VETERINER BUKITTINGGI**

**INSTRUKSI KERJA PERSONEL**




**PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN FAT**

---

**NOMOR DOKUMEN :**

**IKP – L02**

Edisi	: V
Revisi	: 02
Tanggal	: 26 September 2023

Disiapkan oleh	Diperiksa oleh	Disetujui oleh
		
Drh. Yul Fitria, M.Biomed Koordinator Lab. Virologi	Drh. Budi Santosa Sub Koor Sub Yantek	Drh. Gigih Tri Pambudi, MM Kepala Balai

**PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN FAT  
IKP- L02**

---

**DAFTAR ISI**

<b>No</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
1	Pendahuluan	2
2	Ruang Lingkup	2
3	Prinsip	2
4	Bahan	2
5	Alat	3
6	Prosedur	3
7	Pembacaan Hasil	5
8	Lampiran	5



# PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN FAT

## IKP- L02

---

### 1. PENDAHULUAN

Pada bentuk galak (*furius rabies*) hewan menyerang dan menggigit tiap makhluk atau benda-benda yang bergerak. Ludah keluar secara berlebihan dan mengalir dari mulut atau terlihat sebagai buih disekitar mulut. Hewan umumnya berubah sifat, yang biasa penakut menjadi berani menyerang hewan lain.

Pada bentuk diam (*dumb rabies*), hewan penampilan tenang, menyendiri atau seperti nanar (tidak sadarkan diri). Terjadi paralisis pada rahang bawah dengan mata terbelalak.

Sedang yang berbentuk *atypical*, hewan memperlihatkan gejala gatal, sembelit, jalan kaku, spasmus dan sebagainya.

### 2. RUANG LINGKUP

Materi yang diperiksa adalah hipocampus dari hewan tersangka, berdarah panas (kucing, anjing, kera, dll) dalam keadaan segar atau dalam pengawet gliserin.

### 3. PRINSIP

Prinsip dari Fluorescent Antibody Test, preparat sentuh (Hipocampus, Medula Oblongata) yang direaksikan dengan antibodi yang dikonyugasi dengan Fluorescein Isothiocyanat yang menghasilkan pendaran berwarna hijau.

### 4. BAHAN :

- Larutan 50% gliserin buffer pH 7,6
- Conjugate Rabies
- Aceton
- Larutan Evans Blue
- Aquadestilata

# PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN FAT

## IKP- L02

---

### 5. ALAT :

- |                  |                   |
|------------------|-------------------|
| 1. Kaca Preparat | 7. Marking Pencil |
| 2. Cover Glass   | 8. Bak pencuci    |
| 3. Scapel        | 9. Coplin Jar     |
| 4. Centrifuge    | 10. Mortar        |
| 5. Mikroskop     |                   |
| 6. Ultra Violet  |                   |

### 6. PROSEDUR :

#### 1. Preparasi Conjugate

- Larutkan conjugate dengan 3 ml aquabidest
- Sentrifuge 1500 rpm selama 5 menit
- Buat 1% larutan Evans Blue dan ambil 20  $\mu$ l campuran dengan 400  $\mu$ l conjugate yang sudah dilarutkan.

#### 2. Pembuatan Preparat Slide

a. Material segar atau dalam pengawet 50% gliserin-garam yang sudah dicuci beberapa kali dalam larutan PBS, dipersiapkan untuk dibuat preparat tempel atau preparat ulas.

b. Pembuatan Preparat Tempel atau Preparat Ulas.

- Preparat tempel/sentuh :

- Material besarnya cukup, kondisi masih baik atau belum mengalami pembusukan.
- Material dipotong dibeberapa bagian, permukaan potongan digunakan untuk membuat satu preparat tempel.
- Dibuat preparat tempel diatas satu kaca preparat, masing-masing area preparat tempel panjangnya  $\pm$  2,5 cm.

- Preparat Ulas :

- Material besarnya cukup, tetapi pada beberapa bagian sudah mengalami pembusukan.

## **PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN FAT IKP- L02**

---

- Material tanpa pengencer digerus dalam mortar dan pastinya digunakan secukupnya untuk membuat preparat ulas.
  - Preparat ulas dibuat sampai  $\frac{3}{4}$  panjang kaca preparat
3. Sisa material atau pastinya disimpan dalam deep freezer untuk pemeriksaan lanjutan/ulang dan uji biologis bilamana pemeriksaan ini negatif.
  4. Dibuat juga preparat tempel dari otak tikus putih yang sudah diinfeksi street virus Rabies sebagai kontrol Positif dan preparat tempel dari otak tikus putih normal sebagai kontrol negatif. Preparat kontrol dapat dibuat beberapa buah sekaligus dan setelah difiksasi dalam aceton dingin, preparat dapat disimpan kering pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk tidak lebih dari 10 hari.
  5. Keringkan Preparat uji di udara terbuka.
  6. Kemudian preparat difiksasi dalam aceton  $-15^{\circ}\text{C}$  sampai  $-20^{\circ}\text{C}$  selama 2-4 jam.
  7. Setelah difiksasi, preparat dikeringkan di udara terbuka.
  8. Setiap preparat tempel dibuat lingkaran pembatas menggunakan pensil lilin (marking pencil).
  9. Pada setiap kaca preparat ditetesi dengan conjugate secukupnya
  10. Konjugat diusahakan merata dengan cara merotasi kaca preparat atau menggunakan tusuk gigi tanpa mengganggu preparat/film.
  11. Preparat diinkubasikan pada ruang lembab pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit.
  12. Selanjutnya preparat dicuci 2 X dengan cara merendam ke dalam bak pencuci yang berisi larutan PBS pH 7,4 dengan menggunakan Coplin Jar masing-masing selama 10 menit.
  13. Preparat dikeringkan di udara terbuka dengan posisi tegak.
  14. Preparat diberi 1 tetes 50% gliserin-buffer (pH 7,6) dan tutup dengan cover slip.
  15. Preparat diperiksa menggunakan mikroskop ultra-violet pada perbesaran 100 dan 400 kali.

# PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN FAT

## IKP- L02

---

### 7. PEMBACAAN HASIL

- **Positif** : Preparat Kontrol Positif dan preparat uji akan memberikan warna flourecent hijau apel atau berstruktur hijau-kuning dengan ukuran bervariasi dari berupa pasir/debu sampai berupa bentuk negri body.  
**Kontrol Positif** selalu diperiksa sebelum dan sesudah contoh uji.
  
- **Negatif** : Preparat kontrol Negatif tidak memberikan warna flourecent, demikian juga contoh uji yang tidak mengandung antigen Rabies.
  1. Bila hasil negatif, selanjutnya dilakukan pemeriksaan ulang pada contoh uji.
  2. Contoh uji dinyatakan negatif Rabies secara FAT setelah minimal 4 kali pemeriksaan preparat (termasuk 2 preparat ulas yang dibuat) tetap memberikan hasil negatif.
  3. Selanjutnya material yang secara FAT negatif rabies, dilanjutkan uji biologis pada tikus putih.

### 8. LAMPIRAN

#### 1. PEMBUATAN LARUTAN 50% GLISERIN BUFFER pH 7,6

##### ALAT :

- Tabung Erlenmeyer
- pH meter

##### BAHAN :

- Gliserin Stock
- Larutan PBS 0,01 mol/l Ph 7,4 (Lihat IKP No. 1.1)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

## **PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN FAT IKP- L02**

---

### **PROSEDUR :**

- Campurkan larutan gliserin stock dengan larutan PBS 0,01 mol/l pH 7,4 dengan perbandingan 1 : 1 dalam tabung Erlenmeyer.
- Dengan menggunakan pH meter ukur larutan diatas sehingga pH menjadi 7,6 dengan menambahkan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

### **CARA PENYIMPANAN :**

- Penyimpanan pada suhu ruang pada wadah tertutup.






## BALAI VETERINER BUKITTINGGI

### INSTRUKSI KERJA PERSONEL PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN UJI BIOLOGIS

**NOMOR DOKUMEN :**

**IKP - L03**

Edisi	:	V
Revisi	:	02
Tanggal	:	26 September 2023

Disiapkan oleh	Diperiksa oleh	Disetujui oleh
		
Drh. Yul Fitria, M.Biomed Koordinator Lab. Virologi	Drh. Budi Santosa Sub Koor Sub Yantek	Drh. Gigh Tri Pambudi, MM Kepala Balai

**PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN UJI BIOLOGIS**  
**IKP- L03**

---

**DAFTAR ISI**

<b>No</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
1	Pendahuluan	2
2	Ruang Lingkup	2
3	Prinsip	2
4	Bahan	2
5	Alat	3
6	Prosedur	3
7	Pembacaan Hasil	4

# **PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN UJI BIOLOGIS**

## **IKP- L03**

---

### **1. PENDAHULUAN**

Virus rabies terdapat dalam ludah penderita. Dapat menular melalui luka gigitan atau lewat selaput lendir. Dari luka tubuh bagian perifer, virus menuju otak melalui urat-urat syaraf dan sumsum tulang belakang. Bagian otak yang sering diserang adalah medulla oblongata yang menyebabkan *paralysis bulber*. Selain itu juga pada hypocampus (*ammon's horn*). Secara makroskopik otak menunjukkan hiperemi, edema piamater dan mungkin ada perdarahan kecil.

### **2. RUANG LINGKUP**

Materi yang diperiksa adalah hypocampus dari hewan tersangka, berdarah panas (kucing, anjing, kera, dll) dalam keadaan segar atau dalam pengawet gliserin.

### **3. PRINSIP**

Rabies dapat didiagnosa secara *in vivo* dengan metode Biologis apabila secara FAT dan Sellers dinyatakan negatif. Uji Biologis yaitu menginokulasi otak ke hewan percobaan mencit, cavia atau kelinci selama 28 hari. Pengamatan gejala klinis dilakukan tiap hari, jika ada kematian menjelang 28 hari, di diagnosa secara FAT. Jika hewan tidak mati setelah 28 hari, hewan di bunuh dan di diagnosa secara FAT.

### **4. BAHAN :**

- |                    |                 |
|--------------------|-----------------|
| 1. NaCL Fisiologis | 4. Penicillin   |
| 2. Aquadestilata   | 5. Streptomisin |
| 3. PBS pH 7,4      | 6. Tikus Putih  |

### **5. ALAT :**

- |                   |               |
|-------------------|---------------|
| 1. Kaca Preparat  | 6. Mortar     |
| 2. Cover Glass    | 7. Coplin Jar |
| 3. Marking Pencil | 8. Spuit 1 cc |



# **PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN UJI BIOLOGIS**

## **IKP- L03**

---

4. Scapel

9. Timbangan

5. Bak pencuci

10. Mikroskop Ultra Violet

### **6. PROSEDUR :**

#### 1. Pembuatan Larutan Pengencer inokulum

- Larutan A : Timbang NaCl sebanyak 0,85 gram dicampur dengan aquadestilata steril sebanyak 100 ml.
- Sebanyak 9 bagian NaCl fisiologis (0,85%) ditambah dengan 1 bagian serum hewan (bebas antibodi rabies) yang sudah di inaktivasi dalam waterbath pada 56°C selama 30 menit.

#### 2. Pembuatan Inokulum.

- Material dalam pengawet 50% gliserin garam dicuci beberapa kali menggunakan larutan PBS pH 7,4.
- Material segar atau material yang dicuci ditimbang beratnya sesuai kebutuhan
- Material digiling sampai halus menggunakan mortar.
- Larutan pengencer inokulum ditambahkan dalam volume (ml) 4 kali dari berat material (gram) untuk membuat suspensi 20%.
- Tambahkan 2 mg streptomisin dan 500 iu penisilin per ml suspensi. Bila material berupa kelenjar ludah, disarankan untuk dilakukan penanaman inokulum pada Agar Darah untuk mengetahui kemungkinan kontaminasi bakteri.
- Suspensi didiamkan selama 30 menit
- Suspensi disentrifuse pada kecepatan 150-200 g selama 5 menit
- Supernatan diambil untuk selanjutnya diinokulasikan pada mencit

#### 3. Inokulasi pada Mencit.

- Mencit masih menyusu atau lepas sapih sebanyak 6 ekor per material dipersiapkan.

## **PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN UJI BIOLOGIS IKP- L03**

---

- Mencit dianestesi dengan cara dimasukkan ke dalam botol tertutup yang berisi kapas ether.
- Mencit-mencit diinokulasi secara intra cerebral dengan suspensi material 20% sebanyak 0,03 ml per ekor menggunakan spuit ukuran 1 CC.
- Mencit-mencit diamati setiap hari selama 21 hari atau lebih.
- Catat pada kartu mencit tanggal inokulasi, nomor agenda material, gejala sakit (bulu berdiri, gemetar, inkoordinasi kaki belakang, kelumpuhan dan sekarat).
- Mencit yang mati mulai hari ke lima setelah inokulasi, otak dikoleksi untuk pemeriksaan FAT atau pewarnaan Seller's.

### **7. PEMBACAAN HASIL**

#### **❖ Positif :**

- a. Mencit menunjukkan gejala sakit (bulu berdiri, gemetar).
- b. inkoordinasi kaki belakang, kelumpuhan, sekarat) dan terjadi kematian mulai hari ke lima atau lebih setelah inokulasi dan diperkuat dengan pemeriksaan FAT (+).

#### **❖ Negatif :**

- a. Mencit yang mati antara 24 jam setelah inokulasi.
- b. Mencit menunjukkan gejala-gejala sakit atau tetap sehat sampai masa observasi dan pemeriksaan FAT (-).


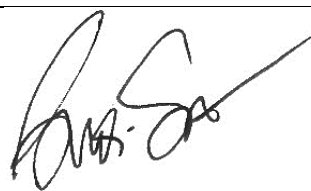



## BALAI VETERINER BUKITTINGGI

### INSTRUKSI KERJA PERSONEL PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN PAGE GREEN

**NOMOR DOKUMEN :**  
**IKP - L04**

Edisi	:	V
Revisi	:	02
Tanggal	:	26 September 2023

Disiapkan oleh	Diperiksa oleh	Disetujui oleh
		
Drh. Ibenu Rahmadani, M.Si. Koordinator Lab. Patologi	Drh. Budi Santosa Sub Koor Sub Yantek	Drh. Gigih Tri Pambudi, MM Kepala Balai

**PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN PAGE GREEN**  
**IKP- L04**

---

**DAFTAR ISI**

<b>No</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
1	Pendahuluan	2
2	Ruang Lingkup	2
3	Prinsip	2
4	Bahan	2
5	Alat	3
6	Prosedur	3
7	Pembacaan Hasil	5
8	Lampiran	6

# **PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN PAGE GREEN**

## **IKP- L04**

---

### **1. PENDAHULUAN**

Hewan tersangka rabies hendaknya diobservasi selama 14 hari, dengan tetap memberikan makan dan minum seperti biasanya. Jika hewan mati dalam waktu 14 hari tersebut, otak hewan diambil dan diperiksa di laboratorium, untuk memastikan apakah hewan mati oleh virus rabies atau tidak. Bahan yang dikirim ke laboratorium sedapat mungkin steril, segera setelah hewan mati/dibunuh.

### **2. RUANG LINGKUP**

Materi yang diperiksa adalah jaringan otak (hipocampus, Cortex dan Medulla oblongata) dari hewan tersangka (kucing, anjing, kera, dan hewan berdarah panas lainnya) dalam keadaan segar atau dalam pengawet formalin 10 %.

### **3. PRINSIP**

Preparat histopat yang diberikan pewarnaan Page Green akan memberikan gambaran Inclusion Bodie's berwarna merah cemerlang dengan inti sel berwarna biru.

### **4. BAHAN**

1. Larutan Acid Alkohol 1%
2. Larutan Ammonia Water
3. Larutan Pewarnaan Shorr's
4. Alkohol 70% atau Formaline 10%
5. Alkohol 80 %
6. Alkohol 95%
7. Xylol Absolut
8. Aceton
9. Paraffin Lunak (42 – 44°C)
10. Paraffin Keras (54 – 58°C)
11. Gliserin
12. Larutan Harry's Hematoxiline

# **PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN PAGE GREEN**

## **IKP- L04**

---

### **5. ALAT**

- |                     |                    |
|---------------------|--------------------|
| 1. Kaca Preparat    | 7. Inkubator       |
| 2. Casset Embedding | 8. Freezer         |
| 3. Cover Glass      | 9. Mikrotom        |
| 4. Bak perendaman   | 10. Pisau Mikrotom |
| 5. Scalpel          | 11. Mikroskop      |
| 6. Pinset           | 12. Water Bath     |

### **6. PROSEDUR**

#### **1) Pembuatan Slide dan Pewarnaan**

- a. Fixasi Contoh uji dalam larutan Formalin 10% atau Alkohol 70%, 18 - 24 jam.
- b. Lakukan pemotongan contoh uji dan masukkan dalam Embedding Cassette.
- c. Cuci dengan air mengalir (kran) selama 30 menit
- d. Proses Dehidrasi :  
Masukkan Embedding Cassette secara berurutan kedalam :
  - Larutan Alkohol absolut I, selama 30 menit dalam suhu 37°C.
  - Tiriskan sebentar dan masukkan ke larutan Alkohol Absolut II, selama 30 menit pada suhu 37°C
  - Tiriskan dan pindah ke Larutan Aceton I, selama 30 menit pada suhu 37°C
  - Tiriskan dan pindah ke Larutan Aceton II, selama 30 menit pada suhu 37°C
  - Tiriskan dan pindah ke Larutan Xylol, selama 30 menit

#### **2) Proses Embedding**

1. Keluarkan contoh uji dari embedding cassette dan masukkan dalam paraffin lunak (suhu 42°C – 44°C) dalam inkubator suhu 60°C – 65°C selama 1 jam..
2. Pindahkan dalam paraffin keras (suhu 54°C – 58°C) dalam inkubator 60°C – 65°C selama 1 jam.
3. Cetak/blok contoh uji

# **PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN PAGE GREEN**

## **IKP- L04**

---

### **3) Proses Pematangan**

1. Letakkan Blok pada mikrotom
2. Lakukan pematangan contoh uji dengan ketebalan 4-5  $\mu\text{m}$
3. Lembaran hasil pematangan diapungkan diatas permukaan air
4. Untuk menghilangkan kerutan jaringan dengan menekan salah satu sisi potongan jaringan dan sisi lainnya ditarik dengan menggunakan kuas kecil.
5. Angkat dengan kaca preparat dan pindahkan dalam waterbath suhu  $\pm 40^{\circ}\text{C}$ .
6. Angkat lagi dengan kaca preparat yang sudah diolesi dengan glycerin – putih telur sambil diatur posisinya.
7. Hilangkan airnya dan biarkan kering.

### **4) Proses Pewarnaan Page-Green**

Masukkan secara berurutan slide berisi potongan contoh uji kedalam :

1. Larutan Xylol (I) selama 5 menit
2. Tiriskan dan pindahkan ke larutan Xylol (II) selama 5 menit
3. Tiriskan dan pindahkan ke larutan Xylol (III) selama 5 menit
4. Tiriskan dan pindahkan ke larutan Alkohol abs. (I) selama 3 menit
5. Tiriskan dan pindahkan ke larutan Alkohol 96%. (I) selama 3 menit
6. Pindahkan ke aquadestilata dengan digoyang-goyangkan selama 1 menit
7. Pindahkan kedalam larutan Harry's Hematoxilin selama 5 menit
8. Pindahkan kedalam aquadestilata selama 1 menit
9. Celupkan dan angkat dalam larutan Acid alkohol sebanyak 5X (sampai Hematoxyline dalam sitoplasma hilang)
10. Masukkan dalam aquadestilata selama 1 menit

## **PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN PAGE GREEN IKP- L04**

---

11. Masukkan dalam larutan Ammonia water 5 X dicelupkan perlahan-lahan sampai menimbulkan warna pada inti sel.
12. Cuci dengan air kran selama 10 menit
13. Masukkan Kedalam pewarna Shorr's selama 1 menit
14. Tiriskan dan pindahkan ke Larutan Alkohol 96% (II) selama 3 menit
15. Tiriskan dan pindahkan ke Larutan Alkohol 96% (III) selama 3 menit
16. Tiriskan dan pindahkan ke Larutan Alkohol abs. (II) selama 3 menit (sambil digoyang-goyangkan)
17. Tiriskan dan pindahkan ke Larutan Alkohol abs. (III) selama 3 menit (sambil digoyang-goyangkan)
18. Tiriskan dan pindahkan ke Larutan Xylol. (IV) selama 5 menit
19. Tiriskan dan pindahkan ke Larutan Xylol. (V) selama 5 menit
20. Slide siap di mounting

### **5) Proses Mounting.**

- Slide yang berisi jaringan ditetesi dengan canada balsam pada permukannya sampai rata dan ditutup dengan cover glass

## **7. PEMBACAAN HASIL**

Dibawah mikroskop dengan pembesaran 10 X 100 kali maka akan terlihat

### **Positif :**

- Benda inksion : Berwarna merah cemerlang
- Jaringan ikat : Berwarna hijau terang
- Jaringan elastik : Berwarna merah keunguan
- Otot : Berwarna merah
- Sel darah merah : Berwarna merah keunguan
- Inti Sel : Berwarna biru



# **PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN PAGE GREEN IKP- L04**

---

## **8. LAMPIRAN**

### **A. PEMBUATAN LARUTAN ACID ALKOHOL 1%**

#### **ALAT :**

- Pipet 5 ml
- Pipet 25 ml
- Tabung Erlenmeyer

#### **BAHAN :**

- Ethyl Alkohol 70 %
- Hydrochloric Acid

#### **PROSEDUR :**

- Ambil dengan pipet 25 ml Ethyl Alkohol 70 % sebanyak 198,00 ml
- Ambil Hydrochloric Acid dengan pipet 5 ml sebanyak 2,00 ml
- Campur dalam tabung erlenmeyer kedua larutan tersebut sehingga homogen
- Terbentuk larutan Acid Alkohol 1%

#### **CARA PENYIMPANAN :**

- Jika belum digunakan simpan pada suhu ruangan dengan wadah tertutup.

### **B. PEMBUATAN LARUTAN AMMONIA WATER**

#### **ALAT :**

- Pipet 1 ml
- Pipet 25 ml
- Tabung Erlenmeyer

#### **BAHAN :**

- Ammonium Hidroxide
- Aquadestilata

# **PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN PAGE GREEN IKP- L04**

---

## **PROSEDUR :**

- Ambil dengan pipet 1 ml Ammonium Hidroxide sebanyak 1,00 ml
- Masukkan kedalam Tabung Erlenmeyer
- Tambahkan Aquadestilata sebanyak 333,00 ml
- Campur dalam tabung erlenmeyer kedua larutan tersebut sehingga homogen
- Terbentuk larutan Ammonia Water

## **CARA PENYIMPANAN :**

- Jika belum digunakan simpan pada suhu ruangan dengan wadah tertutup

## **C. PEMBUATAN PEWARNAAN SHORR'S**

### **ALAT :**

- Pipet 1 ml
- Pipet 50 ml
- Timbangan
- Tabung Erlenmeyer

### **BAHAN :**

- Ethyl Alkohol
- Biebrich Scarlet
- Orange Green
- Fast Green (FCF)
- Phosphotungstic Acid
- Phosphomolybdic Acid
- Glacial Acetic Acid

### **PROSEDUR :**

- Ambil Ethyl Alkohol 200,00 ml
- Timbang Biebrich Scarlet 1,00 gr
- Timbang Orange G 0,50 gr
- Timbang Fast Green, FCF 1,50 gr
- Timbang Phosphotungstic acid 1,00 gr

## **PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN PAGE GREEN IKP- L04**

---

- Timbang Phosphomolybdic acid 1,00 gr
- Ambil Glacial acetic acid 2,00 ml
- Aduk hingga homogen dalam tabung Erlenmeyer

### **CARA PENYIMPANAN :**

- Jika belum digunakan simpan pada suhu ruangan dengan wadah tertutup.





**BALAI VETERINER BUKITTINGGI**  
**INSTRUKSI KERJA PERSONEL**  
**PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN HE**

---

**NOMOR DOKUMEN :**  
**IKP – L05**

Edisi	: V
Revisi	: 02
Tanggal	: 26 September 2023

Disiapkan oleh	Diperiksa oleh	Disetujui oleh
		
Drh. Ibenu Rahmadani, M.Si. Koordinator Lab. Patologi	Drh. Budi Santosa Sub Koor Sub Yantek	Drh. Gigih Tri Pambudi, MM Kepala Balai

**PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN HE  
IKP- L05**

---

**DAFTAR ISI**

<b>No</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
1	Pendahuluan	2
2	Ruang Lingkup	2
3	Prinsip	2
4	Bahan	2
5	Alat	3
6	Prosedur	3
7	Pembacaan Hasil	6

# **PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN HE IKP- L05**

---

## **1. PENDAHULUAN**

Hewan tersangka rabies diobservasi selama 14 hari. Kalau mati dalam masa observasi, bahan yang dikirim ke laboratorium berupa otak. Dalam otak anjing dipilih hipocampus sehingga dalam pemeriksaan akan mudah ditemukan Negri Bodie's. Bila tidak ada lagi hipocampus atau hipocampus rusak, maka hendaknya digunakan untuk bahan pemeriksaan dengan urutan sebagai berikut: kortek serebelum, medulla oblongata, kortek serebrum. Usahakan mengirim sampel dalam keadaan segar dan steril.

## **2. RUANG LINGKUP**

Materi yang diperiksa adalah jaringan otak (hipocampus, Cortex serebelum dan Medulla oblongata) dari hewan tersangka (kucing, anjing, kera, dan hewan berdarah panas lainnya) dalam keadaan segar atau dalam pengawet formalin 10 %.

## **3. PRINSIP**

Preparat histopat yang diberikan pewarnaan Hematoxylin-Eosin akan memberikan gambaran Negri Bodie's Intrasiplasmik berwarna merah cemerlang dengan inti sel berwarna biru

## **4. BAHAN**

- Larutan Acid Alkohol 1%
- Larutan Ammonia Water
- Larutan Harris Hematoxilin
- Larutan Stock Eosin Alkohol 1 %
- Larutan Working Alkohol
- Alkohol 70% atau Formaline 10%
- Alkohol 80 %
- Alkohol 95%
- Xylol Absolut

# **PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN HE IKP- L05**

---

- Aceton
- Paraffin Lunak (42 – 44°C)
- Paraffin Keras (54 – 58°C)
- Gliserin
- Canada Balsam

## **5. ALAT**

- Kaca Preparat
- Casset Embedding
- Mikrotom
- Cover Glass
- Bak perendaman
- Mikroskop
- Scalpel
- Pinset
- Pisau mikrotom
- Inkubator
- Freezer
- Water bath

## **6. PROSEDUR**

### **1. Pembuatan Slide dan Pewarnaan**

- a. Fixasi contoh uji dengan larutan Formalin 10%, 18 - 24 jam.
- b. Lakukan pemotongan contoh uji dan masukkan dalam Embedding Cassette.
- c. Proses Dehidrasi :

Masukkan Embedding Cassette secara berurutan kedalam :

- Larutan Alkohol absolut I, selama 30 menit dalam suhu 37°C.
- Tiriskan sebentar dan masukkan ke larutan Alkohol Absolut II, selama 30 menit pada suhu 37°C

# **PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN HE**

## **IKP- L05**

---

- Tiriskan dan pindah ke Larutan Aceton I, selama 30 menit pada suhu 37°C
- Tiriskan dan pindah ke Larutan Aceton II, selama 30 menit pada suhu 37°C
- Tiriskan dan pindah ke Larutan Xylol, selama 30 menit

### **2. Proses Embedding**

- Keluarkan contoh uji dari embedding cassette dan masukkan dalam paraffin lunak (suhu 42°C – 44°C) dalam inkubator suhu 60°C – 65°C selama 1 jam.
- Pindahkan dalam paraffin keras (suhu 54°C – 58°C) dalam inkubator 60°C – 65°C selama 1 jam.
- Cetak/blok contoh uji

### **3. Proses Pemotongan**

- Letakkan Blok pada mikrotom
- Lakukan pemotongan contoh uji dengan ketebalan 4-5 µm
- Lembaran hasil pemotongan diapungkan diatas permukaan air
- Untuk menghilangkan kerutan jaringan dengan menekan salah satu sisi potongan jaringan dan sisi lainnya ditarik dengan menggunakan kuas kecil.
- Angkat dengan kaca preparat dan pindahkan dalam waterbath suhu  $\pm$  40°C.
- Angkat lagi dengan kaca preparat yang sudah diolesi dengan glycerin – putih telur sambil diatur posisinya.
- Hilangkan airnya dan biarkan kering.

### **4. Proses Pewarnaan**

Masukkan secara berurutan slide berisi potongan contoh uji kedalam :

- Larutan Xylol (I) selama 5 menit
- Tiriskan dan pindahkan ke larutan Xylol (II) selama 5 menit
- Tiriskan dan pindahkan ke larutan Xylol (III) selama 5 menit



## **PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN HE IKP- L05**

---

- Tiriskan dan pindahkan ke larutan Alkohol abs. (I) selama 5 menit
- Tiriskan dan pindahkan ke larutan Alkohol abs. (II) selama 5 menit
- Pindahkan ke aquadestilata dengan digoyang-goyangkan selama 1menit
- Pindahkan kedalam larutan Harry's Hematoxilin selama 20 menit
- Pindahkan kedalam aquadestilata selama 1 menit
- Celupkan dan angkat dalam larutan Acid alkohol sebanyak 2 -3 celupan
- sampai Hematoxyline dalam sitoplasma hilang.
- Masukkan dalam Aquadestilata (I) selama 1 menit
- Masukkan dalam Aquadestilata (II) selama 10 menit
- Masukkan dalam larutan Eosin selama 2 menit
- Tiriskan dan pindahkan ke Larutan Alkohol 96% (II) selama 3 menit
- Tiriskan dan pindahkan ke Larutan Alkohol 96% (III) selama 3 menit
- Tiriskan dan pindahkan ke Larutan Alkohol abs. (II) selama 3 menit (sambil digoyang-goyangkan)
- Tiriskan dan pindahkan ke Larutan Alkohol abs. (III) selama 3 menit (sambil digoyang-goyangkan)
- Tiriskan dan pindahkan ke Larutan Xylol. (IV) selama 5 menit
- Tiriskan dan pindahkan ke Larutan Xylol. (V) selama 5 menit
- Slide siap di Mounting

### **5. Proses Mounting.**

- Slide yang berisi jaringan ditetesi dengan canada balsam pada permukannya sampai rata dan ditutup dengan cover glass.

## PENGUJIAN RABIES PEWARNAAN HE IKP- L05

---

### 7. PEMBACAAN HASIL

Dibawah mikroskop dengan pembesaran 10 X 100 kali maka akan terlihat :

**Positif** : Ditemukannya ***Negri Bodies Intrasitoplasmik***

- Badan inklusi : Ditandai warna merah terang pada intra sitoplasmik.
- Sitoplasma : Warna merah muda
- Inti sel : Ditandai warna biru



**BALAI VETERINER BUKITTINGGI**

**INSTRUKSI KERJA PERSONEL**

**PENGUJIAN NEW CASTLE DISEASE**


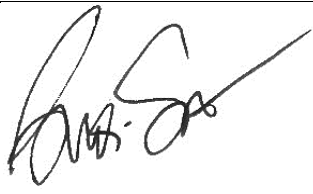


**METHODE HA HI**

---

**NOMOR DOKUMEN :**

**IKP – L06**

Edisi	:	V
Revisi	:	02
Tanggal	:	26 September 2023

Disiapkan oleh	Diperiksa oleh	Disetujui oleh
		 
Drh. Yul Fitria, M.Biomed Koordinator Lab. Virologi	Drh. Budi Santosa Sub Koor Sub Yantek	Drh. Gigin Tri Pambudi, MM Kepala Balai

**PENGUJIAN NEW CASTLE DISEASE METHODE HA HI  
IKP- L06**

---

**DAFTAR ISI**

<b>No</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
1	Pendahuluan	2
2	Ruang Lingkup	2
3	Prinsip	2
4	Bahan	2
5	Alat	3
6	Prosedur	3
7	Pembacaan Hasil	5
8	Lampiran	8

# **PENGUJIAN NEW CASTLE DISEASE METHODE HA HI IKP- L06**

---

## **1. PENDAHULUAN**

New Castle Disease (ND) merupakan penyakit menular pada unggas yang bersifat akut, disebabkan oleh Paramyxovirus dari famili Paramyxviridae. Penyakit ini bersifat endemik (mewabah). Angka morbiditas mencapai 100 % dan mortalitas 80 -100%. Penyakit ini dapat ditularkan melalui penafasan, kotoran, petugas dan peralatan kandang, alat transportasi, burung dan karkas yang tercemar. Unggas yang terserang ditandai dengan gangguan pernafasan dan gejala syaraf (tortikolis), jalan sempoyongan dan lumpuh total.

## **2. RUANG LINGKUP**

Serum yang berasal dari unggas.

## **3. PRINSIP**

Uji Hambatan Haemaglutinasi merupakan uji serologis berdasarkan hambatan terhadap haemaglutinasi antigen virus ND. Titer serum ditentukan berdasarkan hambatan serum pada pengenceran tertinggi yang masih mampu menghambat antigen (4 HAU) mengaglutinasi sel darah merah ayam.

## **4. BAHAN**

- Suspensi 1% Sel Darah Merah Ayam
- Larutan Alserver
- Larutan PBS Isotonis (0,1 M) pH 7,0 – 7,2
- Larutan Phosphat Buffer Saline pH 7,0 – 7,4
- Telur ayam berembryo umur 9 – 11 hari
- Paraffin
- Alkohol 70%

## **5. ALAT**

- Timbangan

# PENGUJIAN NEW CASTLE DISEASE METHODE HA HI

## IKP- L06

---

- Mortar
- Centrifuge
- Refrigerator
- Spuit 1 cc
- Inkubator
- Mikropipet
- Mikroplate

### 6. PROSEDUR

#### *Pembuatan Inokulum*

- Ambil Contoh Uji (potongan organ) dan ditimbang beratnya sesuai kebutuhan.
- Material digiling sampai halus menggunakan mortar
- Tambahkan Larutan isotonis Phospat Buffer Saline (pH 7,0-7,4) yang mengandung Penisilin 2000 iu dan streptomisin 2 mg per ml sampai volume (ml) 4 kali dari berat material (gram) untuk membuat suspensi 20 % Bila material berupa feses, konsentrasi antibiotik 5 kali lipat.
- Suspensi dipindahkan ke dalam tabung reaksi untuk kemudian disentrifuge dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit pada suhu tidak lebih dari 25°C.
- Ambil Supernatan dan diamkan pada suhu kamar 1-2 jam sebelum diinokulasikan.
- Bila waktu inokulasi ditunda, supernatan disimpan pada suhu 4°C selama tidak lebih dari 4 hari.

#### **Inokulasi Telur ayam berembrio**

- Siapkan minimal 5 butir telur ayam berembrio umur 9 – 11 hari dari breeder SPF/SAN.
- Teropong telur-telur dan tandai dengan pensil letak embrio, ruang alantois, batas ruang udara, dan tempat penyuntikan.

## **PENGUJIAN NEW CASTLE DISEASE METHODE HA HI IKP- L06**

---

- Suci hamakan daerah sekitar tempat penyuntikan dengan menggunakan larutan iodium 10% atau alkohol 70%.
- Cangkang tempat penyuntikan dilubangi dengan tanpa merusak membran dinding.
- Suntikkan (diinokulasi) sebanyak 0,02 ml suspensi material 20% ke dalam ruang alantois pada setiap telur tersebut.
- Lubang tempat penyuntikan ditutup kembali dengan parafin.
- Inkubasikan telur pada suhu 37°C selama 4-7 hari.
- Ambil telur-telur tersebut baik yang mati atau hidup setelah 4 – 7 hari.
- Dinginkan telur-telur tersebut pada suhu 4°C sebelum digunakan
- Panen cairan alantois untuk uji aktivitas hemaglutinasinya.

### **C. Uji Hemaglutinasi (HA)**

- Isikan pada lubang-lubang mikroplate plastik dasar V nomor 1 – 12 pada deret A - H (tergantung banyaknya material yang diuji) masing-masing 0,025 ml larutan PBS menggunakan mikropipet.
- Tambahkan 0,025 ml suspensi virus (cairan alantois) pada lubang deret A nomor 1 kemudian homogenkan dengan cara menghisap dan melepaskan hisapan beberapa kali menggunakan mikropipet. Setelah homogen ambil 0,025 ml cairan dari lubang 1 dan masukkan ke lubang kedua (2) dan homogenkan, ambil campuran dari lubang 2 sebanyak 0,025 ml dan masukkan ke lubang 3.
- Begitu seterusnya hingga lubang ke 11. Sehingga terjadi pengenceran suspensi virus kelipatan 2. Lubang nomor 12 sebagai kontrol sel (tidak ditambahkan suspensi virus). Tambahkan kembali 0.025 ml PBS ke dalam setiap lubang pengujian. Tambahkan sebanyak 0.025 ml suspensi sel darah merah ayam 1% pada setiap lubang pengujian.

## **PENGUJIAN NEW CASTLE DISEASE METHODE HA HI IKP- L06**

---

- Lakukan pencampuran (homogenkan) dengan cara mengetuk-ngetuk mikroplate secara perlahan, kemudian diamkan selama 40 menit pada suhu kamar (20 °C) atau 60 menit pada suhu 4 °C, sampai sel darah merah pada lubang no.12 (kontrol) berbentuk titik di dasar tabung.
- Diamkan mikroplate selama 30 menit pada suhu kamar (20 °C) atau 60 menit pada suhu 4 °C. Tambah suspensi darah merah ayam 1 % sebanyak 0,025 ml ke dalam lubang. Lubang kolom nomor 12 deret E,F,G,H sebagai kontrol sel darah.
- Diamkan kembali mikroplate selama 40 menit pada suhu kamar (20 °C) atau 60 menit pada suhu 4 °C.
- Pembacaan hasil dimulai dengan memiringkan plate, pada lubang kontrol akan terlihat bentuk bintik-bintik yang mengalir dari sel darah merah.

### **7. PEMBACAAN HASIL :**

- Titer hambatan hemaglutinasi serum (titer antibodi) dihitung jika pada pengenceran serum 1/16 ( $2^4$ ) atau lebih, serum masih mampu menghambat hemaglutinasi secara sempurna terhadap virus ND standar 4 HAU.
- Protektif : Apabila unggas pasca vaksinasi ditemukan titer antibodi  $\geq 1/16$
- Positif : Apabila unggas belum divaksinasi, ditemukan ada titer antibody

Suspensi virus yang menunjukkan aktivitas hemaglutinasi, selanjutnya dilakukan identifikasi virus ND secara uji hambatan hemaglutinasi menggunakan serum ND standard. Serum ND diperoleh dari ayam-ayam yang divaksin dengan satu strain virus ND.

### **D. Uji Hambatan Hemaglutinasi (HI)**

- Penyiapan antigen 4 HAU



## **PENGUJIAN NEW CASTLE DISEASE METHODE HA HI IKP- L06**

---

- Pada uji hemaglutinasi 1 HAU, misalnya terjadi pada pengenceran 1 : 512 (pengenceran antigen tertinggi, yang masih mampu mengaglutinasi sel darah merah ayam dengan sempurna), maka nilai 4 HAU terdapat pada pengenceran 1 : 128.
- Jadi 1 bagian suspensi virus ditambah dengan 127 bagian PBS.
- Isikan pada lubang-lubang mikroplate plastik dasar V yang bernomor 1 – 12 dan berderet A - H (tergantung banyaknya material yang diuji) masing-masing 0,025 ml larutan PBS menggunakan mikropipet.
- Pengenceran Serum
  - Tambahkan 0,025 ml serum contoh uji dan serum kontrol positif yang sudah diinaktivasi pada 56<sup>o</sup> C selama 30 menit kedalam lubang nomor 1 dan 2 pada deret A - H (tergantung banyak serum yang diperiksa).
  - Pada lubang nomor 2, serum dihomogenkan dengan cara dihisap dan dikeluarkan menggunakan mikropipet.
  - Setelah homogen pindahkan serum sebanyak 0,025 ml dari lubang nomor 2 ke dalam lubang nomor 3, homogenkan dan pindahkan kedalam lubang nomor 4 sebanyak 0,025 ml, begitu seterusnya sampai lubang nomor 11.
  - Lakukan juga untuk serum kontrol positif.
- Lubang nomor 12 sebagai kontrol sel darah merah.
- Tambahkan virus ND standard 4 HAU sebesar 0.025 ml ke dalam lubang no.2 sampai lubang no.11 dan pada lubang nomor 12 deret A.
- Pada lubang kolom 12, dilakukan pengenceran virus ND/Antigen kelipatan dua dari lubang deret A sampai deret D.
- Diamkan mikroplate selama 40 menit pada suhu kamar.

# PENGUJIAN NEW CASTLE DISEASE METHODE HA HI

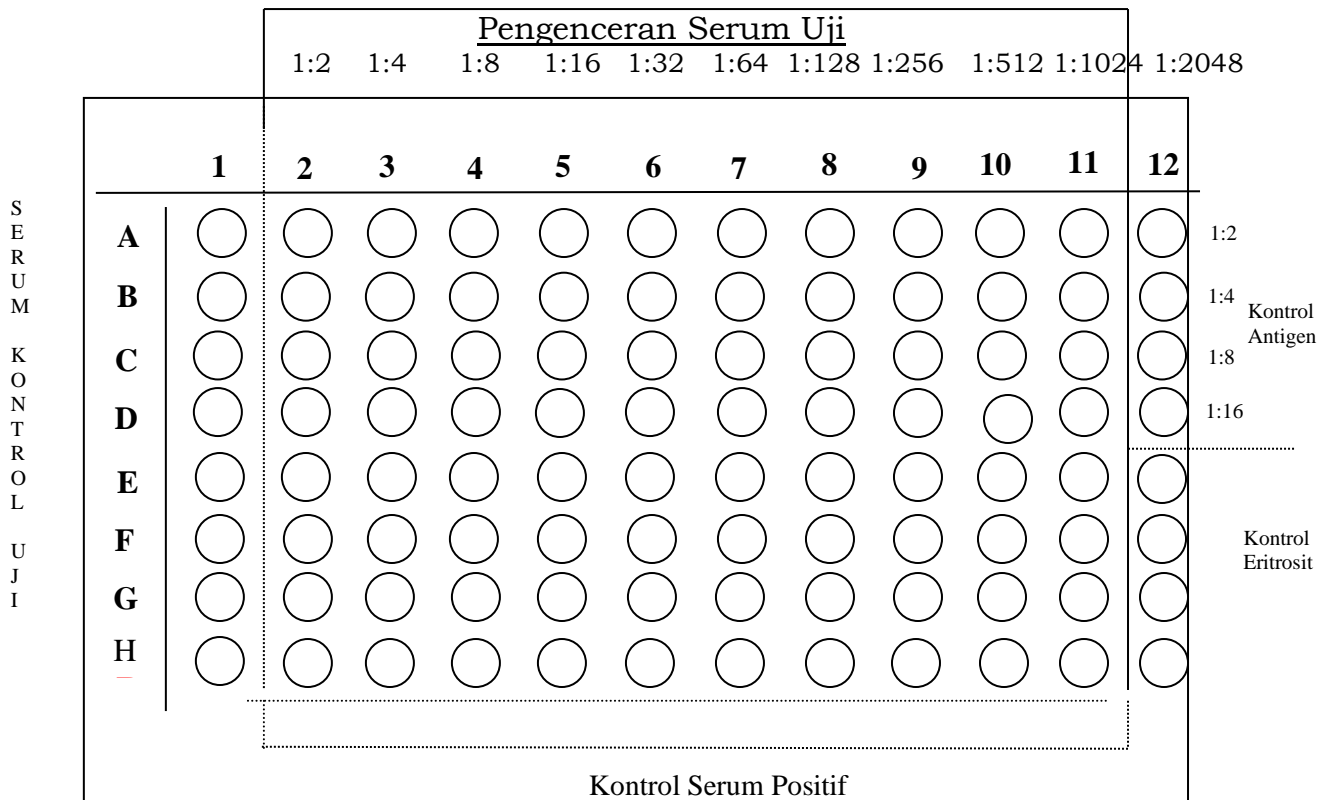
## IKP- L06

- Tambahkan suspensi sel darah merah ayam 1% sebanyak 0.025 ml ke dalam setiap lubang. Lubang kolom nomor 12 deret E, F, G, H sebagai kontrol sel darah merah.
- Diamkan kembali mikroplate selama 40 menit pada suhu kamar.
- Pembacaan hasil dimulai dengan memiringkan plate, dan pada lubang kontrol (lubang no.12) terlihat bentuk titik mengalir dari sel darah merah..

### 7b. PEMBACAAN HASIL

- ❖ Titer hambatan hemaglutinasi serum (titer antibodi) dihitung jika pada pengenceran serum 1/16 ( $2^4$ ) atau lebih, serum masih mampu menghambat hemaglutinasi secara sempurna terhadap virus ND standar 4 HAU.

### DIAGRAM PENGGUNAAN MIKROPLATE PADA PENGUJIAN HAMBATAN HEMAGLUTINASI



# PENGUJIAN NEW CASTLE DISEASE METHODE HA HI IKP- L06

---

## 8. LAMPIRAN

### A. PEMBUATAN SUSPENSII 1% SEL DARAH MERAH AYAM

#### **ALAT :**

- Spuit 2,5 ml
- Tabung berskala
- Sentrifus
- Eppendrop 1000 ul dan pipet tip

#### **BAHAN :**

- Ayam SPF
- Larutan Alserver's
- PBS isotonis 0,1 mol pH 7,0 – 7,2

#### **PROSEDUR :**

- Ambil darah ayam melalui vena sayap dari paling sedikit tiga (3) ekor ayam SPF (Specifik Pathogen Free) atau ayam tanpa vaksinasi dan menunjukkan bebas antibodi virus ND dengan jarum suntik 2,5 ml
- Darah ditampung dalam wadah yang berisi larutan Alsever's. Volume darah yang di tampung sama banyak dengan volume larutan Alsever's.
- Darah dicentrifuge dengan kecepatan 1000 – 1500 rpm selama 10 menit.
- Ambil Supernatan kemudian diganti dengan larutan PBS dengan volume yang sama.
- Diulangi pencucian tersebut sebanyak 3 (tiga) kali
- Pada pencucian terakhir supernatan dibuang dan catat volume endapan yang terbentuk.
- Dari endapan sel tersebut dibuat suspensi 1% dengan cara 1 bagian endapan ditambah 99 bagian PBS isotonis (0,1 M) pH 7,0 – 7,2.

#### **CARA PENYIMPANAN :**

- Disimpan pada suhu 4 C didalam wadah tertutup.

# PENGUJIAN NEW CASTLE DISEASE METHODE HA HI IKP- L06

---

## B. PEMBUATAN LARUTAN ALSEVER'S

### ALAT :

- Timbangan
- Sendok timbangan
- Erlenmeyer
- Gelas ukur
- Autoclave

### BAHAN :

- Glucosa
- Sodium Chloride (NaCl)
- Trisodium Citrate ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- Citric Acide ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ )
- Aquadestilata

### PROSEDUR :

- Timbang Glucosa 20,5 gram
- Timbang Sodium Chloride (NaCl) 4,2 gram
- Timbang Trisodium Citrate ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 8 gram
- Timbang Citric Acide ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) 0,6 gram
- Tambahkan aquadestilata 1 liter
- Aduk larutan sampai homogen
- Sterilkan dalam autoclave
- Bila telah dingin bagi dalam botol sesuai kebutuhan.

### CARA PENYIMPANAN :

- Simpan dalam kulkas bila belum digunakan.

## C. PEMBUATAN LARUTAN PBS ISOTONIS pH 7,0 – 7,2

### ALAT :

- Timbangan
- Erlenmeyer 1000 ml
- Gelas ukur 1000 ml

### BAHAN :

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- Aquades

## **PENGUJIAN NEW CASTLE DISEASE METHODE HA HI IKP- L06**

---

### **PROSEDUR :**

- Timbang :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  12,02 gram..
- Timbang  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,09 gram
- Larutkan bahan diatas dalam 1 liter aquadest dalam tabung erlenmeyer
- Tambahakan HCl atau NaOH sedikit demi sedikit hingga pH 7,0-7,2.

### **CARA PENYIMPANAN :**

- Disimpan pada suhu kamar atau suhu  $4^\circ\text{C}$  di dalam wadah tertutup.






## BALAI VETERINER BUKITTINGGI

### INSTRUKSI KERJA PERSONEL IDENTIFIKASI TRYPANOSOMA PEWARNAAN GIEMSA

**NOMOR DOKUMEN :**

**IKP - L07**

Edisi	: V
Revisi	: 02
Tanggal	: 26 September 2023

Disiapkan oleh	Diperiksa oleh	Disetujui oleh
		
Drh. Eliyus Putra Koordinator Lab. Parasitologi	Drh. Budi Santosa Sub Koor Sub Yantek	Drh. Gigh Tri Pambudi, MM Kepala Balai

# IDENTIFIKASI TRYPANOSOMA PEWARNAAN GIEMSA IKP- L07

---

## DAFTAR ISI

No	Judul	Halaman
1	Pendahuluan	2
2	Ruang Lingkup	2
3	Prinsip	2
4	Bahan	3
5	Alat	3
6	Prosedur	3
7	Pembacaan Hasil	3
8	Lampiran	4

# IDENTIFIKASI TRYPANOSOMA PEWARNAAN GIEMSA

## IKP- L07

---

### 1. PENDAHULUAN

Trypanosomiasis atau Surra adalah penyakit infeksius yang disebabkan oleh *Trypanosoma evansi*, yang ditularkan oleh gigitan lalat famili Tabanidae, Muscae dan nyamuk. Parasit Trypanosoma berbentuk seperti kumparan dengan salah satu ujung lancip dan ujung lainnya tumpul, berukuran antara 19,4 – 35,3 mikrometer dengan lebar antara 1,3 – 1,6 mikrometer.

Ditengah tubuhnya terdapat inti bulat atau sedikit oval dan terdapat kinetoplas yang terletak di depan inti. Dari kinetoplas keluar serabut yang disebut aksonoma yang melanjutkan diri sebagai benang cambuk (flagellum).

Benang cambuk ini terikat dengan tubuh parasit oleh selaput beralun (membran undulans) dan akan melanjutkan diri ke depan sebagai flagellum bebas.

Tetapi hampir semua hewan berdarah panas peka terhadap penyakit ini, dengan derajat kepekaan yang berbeda. Dapat bersifat akut atau kronis. Kuda, unta dan anjing merupakan hewan-hewan sangat peka, ruminansia kurang peka, sedangkan hewan sebangsa unggas juga peka.

### 2. RUANG LINGKUP

Metode ini digunakan untuk mendiagnosa Trypanosomiasis pada ternak sapi, kerbau, kuda kambing, domba, unta, dan anjing.

### 3. PRINSIP

Identifikasi morfologi *Trypanosoma sp.* dapat dilakukan di bawah mikroskop dengan pewarnaan Giemsa dengan pembesaran 400 – 1000 kali. Dibawah mikroskop terlihat *Trypanosoma sp.* dengan membrans undulan dan flagellum dan berwarna ungu kemerahan di luar sel darah merah.



# IDENTIFIKASI TRYPANOSOMA PEWARNAAN GIEMSA

## IKP- L07

---

### 4. BAHAN

- Larutan Giemsa
- Metanol absolut (95%)
- Minyak emersi
- Contoh uji pada kaca preparat

### 5. ALAT

- Mikroskop cahaya
- Stop watch
- Pipet Pasteur
- Bak pewarnaan

### 6. PROSEDUR

- Fixir contoh uji (preparat ulas darah) dalam bak dengan methanol 95% selama 3 menit.
- Keringkan diudara terbuka
- Masukkan contoh uji ke dalam bak yang berisi pewarnaan giemsa selama 30 menit
- Kemudian cuci preparat ulas darah tersebut dengan air lalu keringkan.
- Contoh uji siap diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000 X.

### 7. PEMBACAAN HASIL

- Positif : Ditemukan protozoa Trypanosoma sp. dengan membrans undulan dan flagellum dan berwarna ungu kemerahan.
- Negatif : Tidak ditemukan protozoa Trypanosoma sp.

# IDENTIFIKASI TRYPANOSOMA PEWARNAAN GIEMSA

## IKP- L07

---

### 8. LAMPIRAN

#### A. PEMBUATAN LARUTAN PEWARNAAN GIEMSA

##### ALAT :

- Pipet 10 ml
- Valleus ball
- Erlenmeyer 50 ml
- Gelas beaker 1500 ml
- Pipet Pasteur

##### BAHAN :

- Larutan stok Giemsa
- Kalium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- Dinatrium hydrogen fosfat anhydrous ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- NaCl,  $\text{NaNO}_3$
- Metanol absolute (95%)
- Aquadestilata

##### PROSEDUR :

- **Pembuatan larutan pewarnaan Giemsa :**

- Ambil larutan Giemsa murni sebanyak 1 ml dan campurkan dengan 9 ml PBS pH 6,5

- **Pembuatan larutan PBS pH 6,5 :**

- Larutan A : Timbang  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sebanyak 9,078 gram dan campurkan dengan aquadestilata hingga volume mencapai 1000 ml.
- Larutan B : Timbang  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  sebanyak 11,876 gram dan campurkan dengan aquadestilata hingga volume mencapai 1000 ml.
- Ambil larutan A sebanyak 64 ml dan campurkan dengan larutan B sebanyak 36 ml, kemudian atur keasaman dengan pHmeter, maka terbentuk larutan PBS dengan pH 6,5

# **IDENTIFIKASI TRYPANOSOMA PEWARNAAN GIEMSA**

## **IKP- L07**

---

### **CARA PENYIMPANAN**

- Larutan PBS pH 6,5 disimpan dalam kulkas. Larutan Giemsa murni dan larutan pewarnaan Geimsa yang sudah diencerkan pada suhu ruangan.