

METODA ISOLASI VIRUS BLUETONGUE

I. SENDOW¹⁾, E. SOLEHA¹⁾, SUKARSIH¹⁾ dan P.W. DANIELS²⁾

¹⁾Balai Penelitian Veteriner, Bogor

²⁾Indonesia International Animal Science Research and Development Foundation, Bogor

(Diterima untuk publikasi 15 Juli 1993)

ABSTRACT

Sendow I., E. Soleha, Sukarsih, and P.W. Daniels, 1993. Isolation methods of bluetongue virus. *Penyakit Hewan* 25(46): 87-93.

Several methods of bluetongue virus isolation have been used. Field samples such as heparinized blood and insects prepared as suspensions were inoculated into BHK-21 cell, *Aedes albopictus* (C6/36) cells, or embryonated chicken eggs. However, a combination of the three isolation methods has been attempted. The results indicated that isolates were obtained from all methods, but more isolates were obtained from sample inoculated first into embryonated eggs.

Key words: Bluetongue virus (BT), cattle, isolation, West Java, Irian Jaya, West Timor, Bali, South Kalimantan

ABSTRAK

Sendow I., E. Soleha, Sukarsih, dan P.W. Daniels. 1993. Metoda isolasi virus bluetongue. *Penyakit Hewan* 25(46): 87-93.

Beberapa metode isolasi virus bluetongue (BT) telah dilaksanakan. Sampel lapangan yang berupa darah berheparin dan serangga setelah diproses diinokulasikan pada biakan sel BHK-21, *Aedes albopictus* (C6/36) atau telur bertunas. Lain daripada itu kombinasi ke-tiga metode tersebut juga dilakukan. Dengan kesemua metode tadi isolat virus dapat diperoleh, tetapi jumlahnya akan lebih banyak bila sampel ini terlebih dahulu diinokulasikan kedalam telur bertunas.

Kata kunci: Bluetongue (BT), sapi, isolasi, Jawa Barat, Irian Jaya, Timor Barat, Bali, Kalimantan Selatan

PENDAHULUAN

Arbovirus adalah virus yang penularannya dilakukan oleh arthropoda (serangga), dimana virus tersebut berkembang-biak (replikasi) dalam tubuh serangga, sebelum ditularkan pada ternak vertebrata. Infeksi arbovirus mempunyai penyebaran yang luas (Ozawa, 1985; Young, 1983). Penyakit oleh arbovirus yang menimbulkan gejala klinik dan dapat menimbulkan kerugian ekonomi di antaranya adalah penyakit bluetongue (BT), *bovine ephemeral fever* (BEF) dan Akabane (Aka) (Young, 1983).

Di Indonesia, penyakit arbovirus pada ternak lokal belum dilaporkan, kecuali BEF (Soeharsono *et al.*, 1982; Ronohardjo dan Rastiko, 1982). Namun, hasil serologi menunjukkan bahwa ternak lokal banyak yang mengandung antibodi terhadap beberapa arbovirus, seperti BEF (Soleha, 1991; Suharsono *et al.*, 1982; Miura *et al.*, 1982), Akabane (Marfianingsih, 1983), kelompok virus Palyam (Miura *et al.*, 1982; Olson *et al.*, 1985), *Epizootic Haemorrhagic Disease of Deer* (EHD) (Miura *et al.*, 1982; Sendow *et al.*, 1991a) dan virus BT (Sendow *et al.*, 1986a; Sendow, 1989; Sendow *et al.*, 1991a).

Walaupun secara serologik, infeksi arbovirus telah banyak ditemukan, tetapi isolat arbovirus tidak banyak diperoleh. Kecuali isolasi 6 tipe virus BT yang telah dikonfirmasi (Sendow *et al.*, 1992, 1993a, b), dimana beberapa diantaranya mempunyai penyebaran yang cukup luas (Sendow *et al.*, 1993b). Kelangkaan memperoleh isolat arbovirus ini mungkin disebabkan oleh metoda isolasinya yang masih kurang tepat atau perlu diperbaiki. Tulisan ini membahas hasil penelitian beberapa cara isolasi virus arbo (khususnya BT) dalam biakan sel dan telur bertunas atau kombinasinya.

BAHAN DAN CARA

Sampel lapangan

Darah berheparin

Darah sapi dalam tabung berheparin yang digunakan untuk isolasi virus diambil setiap minggu, dalam beberapa waktu, dari sentinel sapi di Jawa Barat, Kalimantan Selatan, Timor Barat dan Irian Jaya (Sendow *et al.*, 1988; 1991b). Darah diambil dari tahun 1988 sampai 1991 seperti tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil isolasi virus berasal dari darah berheparin dari sentinel sapi yang diinokulasikan pada biakan sel BHK-21

Tahun	Daerah sentinel	Jumlah sampel darah yang diproses	Isolasi*
1988	Depok	279	9
	Cisarua	122	-
	Kupang	486	5
	Bali	48	-
	Banjar Baru	208	-
1989	Depok	86	1
	Kupang	171	-
	Bali	8	-
1990	Depok	104	8
Total		1512	23

* Sampel yang memperlihatkan CPE pada biakan sel BHK-21

Serangga

Serangga di daerah sentinel (Depok dan Cisarua) ditangkap satu kali seminggu dengan memakai perangkap serangga berlampu. Serangga yang ditangkap ini langsung dimasukkan ke botol penampung yang telah berisi larutan penyangga fosfat - garam faali (PBS) berantibiotik kanamicin 1000 ugr/ml dan sedikit detergen (sabun cair) 0.01%. Penangkapan dimulai jam 4.30 sore hingga jam 8.00 malam. Hasil koleksi tadi langsung disimpan pada 4°C. Keesokan harinya serangga yang diperoleh diidentifikasi, berdasarkan subgenus dan spesies pada disiplin parasitologi. Tiap genus dijadikan beberapa kelompok dan setiap kelompok berisi paling banyak 250 serangga yang digunakan untuk isolasi virus dengan cara menggerusnya pada penggerus jaringan yang diberi PBS steril sebanyak 2 ml, lalu dijernihkan dengan cara memutar pada kecepatan 1500 rpm selama 10 menit, sebelum diinokulasikan pada telur bertunas (TB), suspensi diperlakukan seperti pada perlakuan suspensi jantung pada 2b.

Isolasi virus

Inokulasi pada biakan sel BHK-21

Sampel darah berheparin yang digunakan disini didapat dari sentinel sapi berasal dari Cisarua, Depok (Jawa Barat), Kupang (Timor Barat), Denpasar (Bali) dan Banjarbaru (Kalimantan Selatan) pada tahun 1988, dari Depok, Kupang dan Bali pada tahun 1989 dan Depok tahun 1990.

Sebanyak 0,1 ml darah berheparin tadi diinokulasikan ke dalam tabung biakan sel BHK-21 yang telah berisi sel selapis secara duplo (St. George *et al.*,

1978). Media yang digunakan adalah *minimum essential media* (MEM, Flow laboratory) dan 2% serum janin sapi (SJS), 100 µgr/ml Kanamisin, 100 IU/ml Penisilin dan 100 ug/ml Streptomisin. Biakan jaringan tersebut diinokubasikan pada suhu 37°C secara rotasi. Pada hari kedua, media diganti, dan biakan sel diamati selama 5 hari untuk mengetahui ada tidaknya *cytopathic effect* (CPE). Apabila CPE tidak tampak, dilakukan pasase sampai 3 kali. Apabila ada CPE, sampel tersebut dinyatakan mengandung virus isolat. Isolat disimpan dalam -70°C atau N2 cair untuk proses identifikasi selanjutnya.

Inokulasi pada telur bertunas (TB) dan pasase pada sel BHK-21

Sampel darah berheparin asal Jayapura dan Depok tahun 1989 dan 1990 diinokulasikan pada TB sebelum pasase pada biakan sel BHK-21. Sebanyak 0.1 ml darah berheparin yang telah diencerkan menjadi 10% dalam PBS diinokulasikan secara intravenus ke dalam 4 butir TB umur 10-11 hari, lalu diinkubasikan pada 33,5°C selama 5 hari sambil diamati kematian embrio (embrio yang mati pada hari pertama setelah inokulasi dibuang). Jantung embrio diambil dari TB yang mati setelah hari pertama inokulasi dan kemudian digerus dalam 2 ml media berantibiotik, kemudian di-sonikasi selama 20 detik pada kekuatan 30 amplitudo, lalu suspensi dijernihkan dengan sentrifugasi selama 10 menit 1500 rpm. Supernatan difilter melalui millipore 450 nm sebelum diinokulasikan pada BHK-21 untuk diamati ada tidaknya CPE seperti tersebut diatas.

Inokulasi pada TB, biakan sel *Aedes albopictus* dan BHK-21

Sampel yang telah diproses pada pasase TB, dipasase terlebih dahulu pada biakan sel *Aedes albopictus* (C6/36) sebelum diinokulasikan pada BHK-21.

Supernatan steril dari jantung TB diinokulasikan secara duplo pada biakan C6/36 dalam tabung dan diinkubasikan pada suhu kamar selama 7 hari. Apabila CPE tidak ditemukan pada pasase C6/36, tabung biakan C6/36 dikocok untuk melepaskan biakan C6/36 dan disonikasi pada 30 amplitudo selama 20 detik. Sebanyak 0,1 ml suspensi jaringan tersebut diinokulasikan kembali secara duplo pada tabung berisi sel BHK-21 yang telah berisi sel selapis, dirotasi. Inkubasi dilakukan pada 37°C selama 5 hari. Biakan jaringan tersebut diamati selama 5 hari untuk melihat ada tidaknya CPE. Bila CPE tidak terlihat pasase lanjutan dilakukan sebanyak 3x sebelum inokulum tersebut dibuang.

HASIL

Dengan menggunakan metode isolasi pertama, dimana darah berheparin diinokulasikan langsung pada biakan sel BHK-21, sebanyak 23 isolat virus (1.5%) berhasil diisolasi dari 1512 sampel yang diproses (Tabel 1).

Tabel 2 menunjukkan bahwa dari 2572 sampel darah yang diproses, 1150 (45%) menyebabkan kematian pada TB mulai hari ke-2 sampai ke-5 setelah inokulasi secara intravenus. Jumlah sampel tersebut tidak dihitung dengan sampel yang toksik, dimana pada hari pertama inokulasi, semua embrio telur bertunas yang diinfeksi mati.

Sampel asal serangga *Culicoides* sp. diatas, dikelompokkan kedalam sub-genus dan spesies, sedangkan untuk nyamuk dikelompokkan kedalam genus. Pada Tabel 3 terlihat bahwa 229 sampel kelompok serangga yang terdiri dari *Culicoides* sp. dan nyamuk yang diinokulasikan pada TB secara intravenus, 54 sampel (24%) menimbulkan kematian embrio pada hari ke-2 sampai ke-5 setelah inokulasi. Hanya 4 isolat (7%) berhasil menimbulkan CPE pada pasase biakan sel BHK-21 dari 54 sampel yang diproses.

Kelompok *Culicoides*, terdiri dari: sub-genus Avaritia, sub-genus Trithecoidea, sub-genus Hoffmania, dan spesies *C. actoni*, dan *C. oxystoma*. Kelompok nyamuk terdiri dari genus *Aedes* sp dan genus *Anopheles* sp. Kelompok sub-genus Avaritia terdiri dari *C. fulvus*, *C. maculatus*, *C. orientalis*, *C. wadai*, *C. brevitarsis* dan

C. jacobsoni. Kelompok sub-genus Trithecoidea terdiri dari *C. anophelis*, *C. palpifer*, *C. parahumeralis*, *C. gewertzi*, *C. barnetti* dan *C. albibasis*. Kelompok sub-genus Hoffmania terdiri dari *C. sumatrae*, *C. insignipennis* dan *C. peregrinus*. Namun tidak selalu satu kelompok Avaritia mengandung keempat spesies tersebut, tergantung dari keberadaan spesies *Culicoides* pada saat penangkapan.

Jantung embrio TB yang mati setelah hari pertama inokulasi dipanen dan digabung, bila berasal dari satu sampel. Sebanyak 244 suspensi jantung embrio ayam (Tabel 2) diproses dengan menginokulasikan pada biakan sel BHK-21, menghasilkan 26 (10,6%) isolat virus. Sedangkan dengan metode ketiga, dimana jantung embrio TB yang dipanen diinokulasikan terlebih dahulu pada biakan sel C6/36 sebelum dipasase pada biakan sel BHK-21, menunjukkan bahwa 107 isolat virus (13,4%) berhasil diperoleh dari 799 suspensi gabungan embrio. Adapun kelainan embrio yang mati dapat berupa kekerdilan, perdarahan baik berupa bintik-bintik maupun menyeluruh (Gambar 1).

Beberapa isolat telah diproses untuk identifikasi pendahuluan dengan menggunakan uji agar gel immunodifusi (AGID) (Della-Porta *et al.*, 1983), immuno-dot blotting (IDB) (Afshar *et al.*, 1987) atau teknik fluoresens antibodi (FAT) (Cybinski *et al.*, 1983).

Tabel 4 menunjukkan bahwa 6 isolat bereaksi dengan antibodi kelompok virus BT pada uji AGID dari

Tabel 2. Hasil isolasi virus yang berasal dari darah sentinel sapi yang diinokulasikan secara iv dan TB yang dilanjutkan pada pasase biakan sel

Tahun	Sentinel herd	Jumlah sampel yang diinokulasikan pada TB	Jumlah sampel yang menimbulkan kematian pada TB	E-BHK	isolat	E-A-B	isolat
1989	Depok	43	20	16	1	10	1
	Jayapura	203	119	50	10	119	19
	Bali	100	62			33	6
	Merauke	115	42			28	-
	Kupang	43	17			10	-
1990	Depok	247	175	150	13	80	22
	Kupang	374	120	150	13	80	22
	Kupang	374	120			103	5
	Jayapura	286	103	28	2	103	15
	Merauke	52	14			5	1
1991	Depok	187	92			75	6
	Kupang	293	121			90	14
	Jayapura	259	137			75	5
	Bali	121	53			14	8
	Merauke	249	75			55	5
Total		2572	1150	244	26	799	107

TB = Telur bertunas

E-BHK = Jumlah sampel yang dipasase dari TB pada biakan BHK-21

E-A-B = Jumlah sampel yang dipasase dari TB ke biakan C6/36 lalu ke BHK-21.



Gambar 1. Kelainan embrio ayam berupa perdarahan akibat inokulasi sampel darah dari lapang secara intravenus

23 isolat yang diperoleh melalui inokulasi langsung ke biakan BHK-21. Dua puluh enam isolat yang diperoleh melalui TB menunjukkan reaksi dengan antibodi kelompok virus BT pada uji pendahuluan terhadap kelompok virus BT dari isolat yang diproses. Namun, identifikasi lanjut terhadap serotipe dan konfirmasi virus tersebut masih perlu dilanjutkan di laboratorium referen.

Pada uji kelompok tidak semua isolat yang diperoleh memberikan reaksi dengan antibodi terhadap BT. Isolat ini mungkin termasuk pada kelompok virus arbo lainnya, seperti Flavivirus, Alphavirus, Reovirus, Togavirus, Bunyavirus atau Rhabdovirus yang tidak dilaporkan ataupun belum diproses.

PEMBAHASAN

Beberapa metoda isolasi virus arbo dapat digunakan, baik dengan hewan percobaan, seperti domba, bayi tikus putih (Lee *et al.*, 1974; Goldsmith dan Barzilai, 1985; Goldsmith *et al.*, 1975), maupun telur bertunas dan biakan sel (St George *et al.*, 1978; Gard *et al.*, 1988; Sendow *et al.*, 1992). Beberapa peneliti mengemukakan bahwa bayi tikus putih peka terhadap kebanyakan virus arbo. Namun, bayi tikus tersebut kelihatannya kurang sensitif untuk isolasi BT secara langsung dibandingkan melalui TB, biakan sel ataupun domba (St. George *et al.*, 1978; Gard *et al.*, 1988). Gard *et al.* (1988) menemukan bahwa sistem dengan TB adalah yang terbaik untuk isolasi virus BT dan juga virus rhabdo, walaupun embrio tersebut tidak selalu mati akibat penyuntikan dengan inokulum. Sampel, seperti darah berheparin, serangga, semen dan organ dari hewan terinfeksi dapat digunakan untuk isolasi virus (Goldsmith dan Barzilai, 1985; Gard *et al.*, 1988; Muller dan Standfast, 1986; Parsonson *et al.*, 1981; Mahrt dan Osburn, 1986).

Walaupun lebih banyak isolat yang diperoleh dari metode ke-3, yaitu inokulasi sampel pada TB sebelum dipasase pada biakan sel C6/36 dan BHK-21, namun disini hal tersebut tidak dapat disimpulkan bahwa metode tersebut merupakan metode isolasi yang paling sensitif, karena sampel yang digunakan tidak sama untuk 3 metode isolasi. Disamping itu, aktivitas virus setiap tahun berbeda, sehingga perbedaan di antara sistem isolasi virus yang berbeda dapat disebabkan oleh perbedaan derajat infeksi dari sampel yang diuji.

Untuk isolasi virus BT dan orbivirus lainnya telah digunakan beberapa macam biakan sel. Namun demikian masing-masing jenis biakan sel tadi mempunyai perbedaan suseptibilitas dalam perkembangan biakan virus (Fernandes, 1959). Biakan sel vero dan BHK-21, merupakan biakan sel yang paling banyak digunakan untuk inokulasi virus BT dan menghasilkan CPE (Jennings dan Boorman, 1979). Pearson *et al.* (1985) menggambarkan beberapa cara dimana virus diinokulasikan pada biakan sel dan diamati adanya CPE. Apabila CPE tidak terlihat, biakan sel tersebut di sub-pasase (pasase kembali). Gard *et al.* (1988) melaporkan apabila CPE tidak terlihat pada biakan BHK-21, sebaiknya disonikasi dan dipasase kembali.

Selain darah berheparin, sekumpulan serangga, dalam hal ini *Culicoides* sp. sebagai vektor BT dapat pula digunakan sebagai inokulum untuk mendapatkan isolat virus BT. Namun satu hal yang perlu diperhatikan dalam isolasi virus yang menggunakan suspensi serangga sebagai inokulum, adalah bahwa serangga yang diperoleh dan setelah diidentifikasi menurut spesies ataupun subkelompok, serangga tersebut harus diproses secepat mungkin untuk menghindari kontaminasi, atau kematian virus pada tubuh serangga. Apabila proses inokulasi serangga pada TB ditunda terlalu lama akan terjadi toksik pada TB, sehingga peluang untuk mendapat isolat virus sangat kecil. Dianjurkan penundaan inokulasi serangga tadi tidak lebih dari 1 hari setelah penangkapan.

Serangga untuk isolasi virus tadi haruslah betina yang sudah pernah menghisap darah dan sudah dicerna (*parous*) serta tidak mengandung darah segar. Karena jika dipakai serangga yang mengandung darah segar hewan maka virus yang ada pada serangga tersebut mungkin berasal dari darah hewan yang dihisap tanpa melalui proses biologi dalam tubuh serangga tadi. Dengan kata lain perkembangan biakan virus dalam tubuh serangga sebelum ditularkan ke hewan lain, tidak diketahui.

Untuk *Culicoides*, tidak semuanya dikelompokkan kedalam spesies, karena setiap pengambilan ada

beberapa spesies yang diperoleh hanya dalam jumlah yang kecil (>5 ekor), sehingga spesies tersebut dikelompokkan kedalam sub-genus bersama dengan spesies lainnya. Bagi spesies yang selalu ditemukan dalam jumlah banyak seperti, *C. actoni* dan *C. oxystoma* dikelompokkan tersendiri.

darah yang telah dicuci dapat meningkatkan perolehan isolat BT, karena dengan pencucian tadi antibodi dalam plasma hilang (Osburn *et al.*, 1981; Goldsmith dan Barzilai, 1985). Gracook dan Campbell (1982) menunjukkan bahwa sel-sel darah putih memberikan isolat yang lebih banyak daripada plasma dan darah.

Tabel 3. Hasil isolasi virus yang berasal dari kelompok insek yang diinokulasikan secara iv pada TB yang dilanjutkan pada pasase biakan jaringan

Tahun	Asal serangga	Jumlah sampel yang di-inokulasikan pada TB	Jumlah sampel yang menimbulkan kematian pada TB	E-A-B	isolat
1991	Depok	130	40	40	4
	Cisarua	99	14	14	-
	Total	229	54	54	4

E- A- B : Jumlah sampel yang dipasase dari TB ke biakan jaringan C6/36 lalu ke BHK-21

TB : Telur bertunas

Tabel 4. Hasil identifikasi isolat virus berdasarkan kelompok virus BT

Daerah	Isolat	sumber	Jumlah isolat yang diduga BT
Depok	18	BHK-21	4
Kupang	5	BHK-21	2
Depok	43	TB	14
Jayapura	51	TB	11
Serangga Depok	4	TB	1
Total	121		32

Hasil pada Tabel 3 menunjukkan bahwa 4 isolat dapat diisolasi dari serangga yang berasal dari Depok, sedangkan pada serangga yang berasal dari Cisarua tidak diperoleh isolatnya. Hal ini disebabkan karena jumlah serangga yang diperoleh dari Depok lebih banyak daripada Cisarua. Jumlah serangga yang diperoleh dari Depok berkisar antara 276 sampai 2949 ekor/penangkapan, sedang jumlah serangga yang berasal dari Cisarua berkisar antara 3 sampai 684 ekor/penangkapan, sehingga adakalanya jumlah serangga pada satu kelompok dari Cisarua untuk isolasi virus kadang-kadang hanya 3 ekor, karenanya kemungkinan untuk mendapatkan isolat virus yang berasal dari Cisarua lebih kecil dibandingkan dengan yang berasal dari Depok.

Perlakuan darah yang akan digunakan untuk inokulasi virus dapat menguntungkan. Peneliti pendahulu melaporkan bahwa leukosit, eritrosit yang telah dicuci dapat digunakan untuk isolasi virus. Sebagai contoh,

Lain daripada itu, Gard *et al.* (1989) menemukan bahwa biakan sel C6/36 sama sensitifnya dengan sistem TB untuk mendapatkan isolat virus EHD, sedangkan inokulasi biakan sel BHK-21 sangat efisien untuk menghasilkan virus kelompok Palyam.

Standfast *et al.* (1989) melaporkan bahwa isolasi yang dibuat secara paralel pada tikus putih dan biakan sel menunjukkan bahwa terdapat keuntungan, apabila lebih dari satu metoda isolasi dipergunakan dalam melakukan survei arbovirus. Isolasi pada tikus putih ditemukan lebih efisien untuk isolasi Togaviridae, Bunyaviridae dan Rhabdoviridae, sedangkan isolasi pada biakan sel lebih efisien untuk isolasi Reoviridae (Standfast *et al.*, 1989). Lain daripada itu, Jochim (1985) juga melaporkan kesulitan-kesulitan isolasi virus. Pada beberapa kasus, virus BT dapat diisolasi dari domba, tetapi tidak pada TB, sedangkan pada kasus yang lain, agen virus dapat tumbuh di TB tanpa menunjukkan demam pada domba.

Prosedur yang rutin untuk arbovirus yang berasal dari panen TB atau otak bayi tikus sebaiknya lebih dahulu dipasase ke biakan sel mamalia, untuk mengurangi masalah toksitas dari biakan sel mamalia (Gard *et al.*, 1988).

Pada penelitian ini, umur TB yang digunakan adalah 11 hari. Goldsmith dan Barzilai (1985) juga menemukan TB umur 11-12 hari adalah yang paling cocok untuk inokulasi secara intravenus karena mortalitas yang tidak spesifik lebih rendah dibandingkan dengan menggunakan TB umur 10 hari. Disamping itu, embrio lebih mudah ditangani dibandingkan dengan TB umur 13 hari,

dimana hasil akhirnya hampir sama. Suhu optimum inkubasi TB untuk perkembangbiakan BT dengan mengamati kematian TB adalah 33,5°C, dan suhu tersebut memperlambat perkembangan embrio (Goldsmith dan Barzilai, 1985).

Dalam penelitian ini, jantung embrio ayam digunakan untuk isolasi virus BT. Karena seperti telah dilaporkan oleh penelitian terdahulu, penyakit BT dapat menyebabkan kerusakan pada sel endothelial, peri-endothelial dan reticulo-endothelial (Stair, 1968), sehingga virus BT dapat ditemukan pada sistem peredaran darah, seperti aorta, jantung, hati, limpa dan beberapa kelenjar pertahanan (Pini, 1976; Liendo dan Castro, 1981).

Hasil penelitian ini mengkonfirmasi bahwa beberapa sistem isolasi dapat digunakan untuk mengisolasi virus BT. Walaupun hasil tersebut menunjukkan bahwa inokulasi TB secara intravenus, lebih banyak menghasilkan isolat dibandingkan dengan inokulasi langsung pada biakan sel BHK-21, terutama dalam mengisolasi virus BT, namun studi lanjutan masih diperlukan untuk menentukan pemilihan sistem isolasi untuk arbovirus lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai Balai Penelitian Veteriner, Australian Quarantine and Inspection Service (AQIS), International Atomic Energy Agency (IAEA), United States Naval Medical Research Unit (NAMRU) dan Australian, International Development Assistance Berau (AIDAB). Ucapan terima kasih juga ditujukan untuk staf Dinas Peternakan terkait, Sdr. Ace Endang dan para teknisi bagian Virologi yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- AFSHAR, A., F.C. THOMAS, P.F. WRIGHT, J.L. SHAPIRO, J. ANDERSON, and R.W. FULTON. 1987. Blocking dot ELISA using a monoclonal antibody for detection of antibodies to bluetongue virus in bovine and ovine sera. *J. Virol. Methods*. 18: 271-279.
- CYBINSKI, D.H. and H. ZAKREWEZKI. 1983. The isolation and preliminary characterisation of a rhabdovirus in Australia related to bovine ephemeral fever virus. *Vet. Microbiol.* 86: 221- 235.
- DELLA-PORTA, A.J., R.F. SELLERS, K.A.J. HERNIMAN, I.R. LETTLEJOHNS, D.H. CYBINSKI, T.D. ST. GEORGE, D.A. MC. PHEE, W.A. SNOWDON, J. CAMPBELL, C. CARGILL, A. CORBOULD, Y.S. CHUNG and V.W. SMITH. 1983. Serological studies of Australian and Papua New Guinean cattle and Australian sheep for the presence of antibodies against bluetongue group viruses. *Vet. Microbiol.* 8: 147-162.
- FERNANDES, M.V. 1959. Isolation and propagation of bluetongue virus in tissue culture. *Am J Vet Res* 20: 398-408.
- GARD, G.P., R.P. WEIR, and S.S. WALSH. 1988. Arboviruses recovered from sentinel cattle using several virus isolation method. *Vet. Microbiol.* 18: 119-125.
- GOLDSMIT, L. and E. BARZILAI. 1985. Isolation and propagation of bluetongue virus in embryonating chicken eggs. In *Bluetongue and related orbiviruses. Progress in clinical and biological research*, Vol 178, pp. 307-318 (Eds: T.L. Barber and M.M. Jochim). R. Alan Liss Inc., New York.
- GOLDSMIT, L., E. BARZILAI and A. TADMOR. 1975. The comparative sensitivity of sheep and chicken embryos to bluetongue virus and observations on viraemia in experimentally infected sheep. *Aust. Vet. J.* 51: 190-196.
- GROOCCOCK, C.M. and C.H. CAMPBELL. 1982. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarantine. *Canadian J. Comp. Med.* 46: 160-164.
- JENNINGS, M. and J. BOORMAN. 1979. The susceptibility of cell lines of *Aedes aegypti* (Linn.), *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes pseudoscutellaris* (Theobald) to infection with bluetongue virus. *Arch. Virol.* 59: 121-126.
- JOCHIM, M.M. 1985. An overview of diagnostics for bluetongue. In *Bluetongue and related orbiviruses. Progress in clinical and biological research*, Vol 178, pp. 423-433 (Eds: T.L. Barber and M.M. Jochim). R. Alan Liss Inc., New York.
- LEE, V.H., O.R. CAUSEY and D.L. MOORE. 1974. Bluetongue and related viruses in Ibadan, Nigeria: Isolation and preliminary identification of viruses. *Am J Vet Res* 35: 1105-1108.
- LIENDO, G. and A.E. CASTRO. 1981. Bluetongue in cattle: diagnosis and virus isolation. *Bovine Pract.* 16: 87, 95. Cited by Jochim, M.M. (1985).
- MAHRT, C.R. and B.I. OSBURN. 1986. Experimental bluetongue virus infection of sheep; effect of previous vaccination: clinical and immunologic studies. *Am. J. Vet. Res.* 47: 1191-1197.
- MARFIATININGSIH, S. 1983. Reaksi serologic dari ternak sapi terhadap virus Akabane. In *Annual Report on Animal Disease Investigation in Indonesia during period 1981-1982*. Direktorat Kesehatan Hewan, Jakarta. pp. 90-95.
- MIURA, Y., Y. INABA, T. TSUDA, S. TOKUHISA, K. SATO, H. AKASHI, and M. MATUMOTO. 1982. A survey of antibodies to arthropodborne viruses in Indonesian cattle. *Jpn. J. Vet. Sci.* 44: 857-863.
- MULLER, M.J. and H.A. STANDFAST. 1986. Vectors of ephemeral fever group viruses. In *Arbovirus Research in Australia. Proceedings 4th Symposium* (Eds T.D. St. George, B.H. Kay and J. Blok) CSIRO/QIMR, Brisbane. pp. 295-298.
- OLSON, J.G., T.G. KSIAZEK, V.H. LEE, R. TAN and R.E. SHOPE. 1985. Isolation of Japanese encephalitis virus from *Anopheles annularis* and *Anopheles vagus* in Lombok, Indonesia. *Transactions Royal Soc. Trop. Med. and Hygiene*, 79: 845-847.
- OSBURN, B.I., B. MCGOWAN, B. HERON, E. LOOMIS, R. BUSHNELL, J. STOTT and W. UTTERBACK. 1981. Epizootiologic study of bluetongue: virologic and serologic results. *Am. J. Vet. Res.* 42: 884-887.
- OZAWA, Y. 1985. Bluetongue and Related Orbiviruses: Overview of the World Situation. In *Bluetongue and related orbiviruses*.

- Progress in clinical and biological research, Vol 178, pp. 13-20 (Eds: T.L. Barber and M.M. Jochim). R.Alan Liss Inc., New York.
- PARSONSON, I.M., A.J. DELLA-PORTA, D.A. MCPHEE, D.H. CYBINSKI, K.R.E. SQUIRE, H.A. STANDFAST and M.F. UREN. 1981. Isolation of bluetongue virus serotype 20 from the semen of an experimentally- infected bull *Aust. Vet. J.* 57: 252-253.
- PEARSON, J.E., E.A. CARBREY and G.A. GUSTAFSON. 1985. Bluetongue and related orbivirus diagnosis in the United States. In Bluetongue and related orbiviruses. Progress in clinical and biological research, Vol 178, pp. 469-475 (Eds: T.L. Barber and M.M. Jochim). R.Alan Liss Inc., New York.
- PINI, A. 1976. A study on the pathogenesis of bluetongue: Replication of the virus in the organs of infected sheep. *Ond. J. Vet. Res.* 43: 159-164.
- RONOHARDJO, P. and P. RASTIKO. 1982. Some epidemiological aspects and economic loss of bovine ephemeral fever outbreak in Tuban and surrounding areas, East Java, Indonesia. *Penyakit Hewan* 14(24): 25-29.
- SENDOW, I., P. YOUNG and P. RONOHARDJO. 1986a. Preliminary survey for antibodies to bluetongue - group virus in Indonesian ruminants. *Vet. Rec.*, 119: 603.
- SENDOW, I., N. HUNT, A. BALE, C. BARTZ, TARMUDJI, P. RONOHARDJO, and P.W. DANIELS. 1988. Studies of arboviral infections of sentinel cattle in Indonesia. In *Proceedings of the 6th FAVA Congress*, Denpasar (eds D. Sastradipradja and S.H. Sigit), Indonesian Veterinary Association, Jakarta, pp. 367-373.
- SENDOW, I. 1989. The agar gel immunodiffusion test for the detection of antibody to bluetongue group viruses in Indonesian ruminants. *Penyakit Hewan* 21: 59-64.
- SENDOW, I., P.W. DANIELS, D.H. CYBINSKI, P.L. YOUNG and P. RONOHARDJO. 1991a. Antibodies against certain bluetongue and epizootic haemorrhagic disease viral serotypes in Indonesian ruminants. *Vet. Microbiol* 28: 111-118.
- SENDOW, I., P.W. DANIELS, E. SOLEHA and SUKARSIH. 1991b. Epidemiological studies of bluetongue viral infections in Indonesian livestock. In *Proceedings, Second International Symposium on Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses*, OIE, Paris, June 1991. (In press).
- SENDOW, I., P.W. DANIELS, E. SOLEHA, N. HUNT and P. RONOHARDJO. 1992. Isolation of Bluetongue viral serotypes 7 and 9 from healthy sentinel cattle in West Java, Indonesia. *Aust. Vet. J.* 68: 405.
- SENDOW, I., P.W. DANIELS, E. SOLEHA, B. ERASMUS, SUKARSIH, and P. RONOHARDJO. 1993a. Isolation of bluetongue virus serotypes new to Indonesia from sentinel cattle in West Java. *Vet. Rec.* (In press).
- SENDOW, I., E. SOLEHA, P.W. DANIELS, D. SEBAYANG, J. ACHDIYATI, K. KARMA and B.J. ERASMUS. 1993b. Isolation of bluetongue viral serotypes 1 and 23 from healthy sentinel cattle in Irian Jaya, Indonesia. *Aust. Vet. J.* (In press).
- SOEHARSONO, I.G., D.H. SUDANA, UNRUH and M. MALOLE. 1982. Kecurigaan letupan ephemeral fever pada sapi Ongol di Tuban dan Lamongan. *Laporan Tahunan Hasil Penyelidikan Penyakit Hewan di Indonesia. Periode 1976-1981*. Jakarta. 104-108.
- SOLEHA, E., 1991. A Serum neutralisation test for the serological study of bovine ephemeral fever. *Penyakit Hewan* 41: 33-36.
- ST. GEORGE, T.D., H.A. STANDFAST and D.H. CYBINSKI. 1978. Isolations of Akabane virus from sentinel cattle and *C. brevitarsis*. *Aust. Vet. J.* 54: 558-561.
- STAIR E.L. 1968. PhD thesis, Texas A&M University. Cited by Luedke *et al.* (1985).
- STANDFAST, H.A., A.L. DYCE and M.J. MULLER. 1989. Bluetongue in Australia - an entomologist's view. *Aust. Vet. J.* 66: 369-397.
- YOUNG P.L. 1983. Arbovirus infections of cattle. In *Veterinary Epidemiology*. Ed. Campbell, R.S.F. Pp. 77-84. Vice chancellors committee. AUIDP. Canberra.