Metode Penghitungan Eritrosit dan Leukosit Total pada *Raptor* di *Wildlife Rescue Centre (WRC) Jogja*

The Method of Total Erythrocyte and Leukocyte Counting in Raptors at Wildlife Rescue Centre (WRC) Jogja

Andreas Bandang Hardian^{1*}, Warih Pulung Nugrahani², Irhamna Putri Rahmawati², Dorothea Vera Megarani³

¹Laboratorium Patologi Anatomi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya

²Wildlife Rescue Centre Jogja, Yayasan Konservasi Alam Yogyakarta

³Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada

*E-mail : andreasbandangh@ub.ac.id

ABSTRAK

Spesies elang adalah salah satu jenis *raptor* yang mendominasi populasi burung yang direhabilitasi di WRC Jogja untuk tujuan konservasi. Pemeriksaan rutin selama rehabilitasi melibatkan pemeriksaan hematologi untuk mengevaluasi dan monitoring status kesehatan *raptor*. Akan tetapi, kendala di lapangan masih sering ditemui seperti rendahnya kualitas sampel hingga populasi sel darah yang terlalu padat untuk dihitung dengan metode pengenceran dan kamar hitung standar. Studi ini bertujuan untuk memberikan gambaran metode penghitungan eritrosit dan leukosit total yang dilakukan pada elang di WRC Jogja. Metode *handling* dan *restraint* pada elang dilakukan secara fisik menggunakan *hood* dan handuk, mengadaptasi metode *Aba*. Pengambilan darah sebanyak 1-2,5 ml dilakukan melalui *vena ulnaris* atau *vena basilica* dengan *syringe* 3 ml dan jarum 24 G (*gauge*). Darah ditampung dalam tabung dengan antikoagulan EDTA dan dihitung maksimal tiga jam setelah koleksi darah dilakukan. Metode pengambilan darah memakan waktu kurang dari 30 menit dan observasi elang pascakoleksi darah tidak menunjukkan tanda-tanda *hypovolemic shock*. Modifikasi dilusi darah dilakukan dengan mengencerkan darah 250 kali dengan larutan Natt-Herrick's untuk penghitungan eritrosit dan 50 kali untuk penghitungan leukosit dengan larutan Rees-Ecker. Hasil modifikasi pengenceran menunjukkan populasi sel darah yang dapat dihitung dengan metode manual menggunakan kamar hitung. Metode ini diharapkan dapat diaplikasikan untuk penghitungan sel darah pada kondisi yang sama pada spesies burung lain.

Kata kunci: elang, hematologi, eritrosit, leukosit, konservasi

ABSTRACT

Most of raptor species rehabilitated for conservation purpose at WRC Jogja are eagles. Annually, we perform general raptor examination involving conventional routine hematologic examination. However, low sample quality and over dense blood cell population during total erythrocyte and leukocyte counting were deemed as obstacles. This study aimed to give wider insight in how total erythrocyte and leukocyte counting was performed at WRC Jogja to overcome those obstacles. Firstly, handling and restraint were done physically adapting the *Aba* method. One-to-two half millilitres of blood was collected from the ulnar vein using 3-ml-syringe with 24-gauge-needle which was then preserved in an EDTA-containing tube and proceeded to subsequent method no more than 3 hours after collection. No hypovolemic shock was observed. During total erythrocyte and leukocyte counting using Neubauer-ruled counting chamber, we modified the dilution factor to be 250-fold and 50-fold respectively. This method yielded a countable cell density and can be applied in other species in similar condition.

Keywords: eagle, haematology, erythrocyte, leukocyte, conservation

PENDAHULUAN

Elang brontok (*Nisaetus cirratus*) dan elang ular bido (*Spilornis cheela*) adalah spesies *raptor* terbanyak dari populasi elang yang direhabilitasi di *Wildlife Rescue Centre* (WRC) Jogja. Individu-individu *raptor* yang menjalani rehabilitasi memerlukan pemeriksaan kesehatan yang dilakukan minimal setahun sekali. Salah satu metode pemeriksaan kesehatan yang paling murah dan dapat dilakukan di lokasi adalah pemeriksaan hematologi. Sampai saat ini, pemeriksaan hematologi pada burung liar dilakukan berdasar metode yang dilakukan di unggas pada umumnya (Walberg, 2001). Kondisi-kondisi khusus sering ditemui di WRC Jogja selama pemeriksaan hematologi elang sehingga diperlukan modifikasi pada metode yang umum dilakukan.

Pemeriksaan hematologi manual pada elang di beberapa lembaga konservasi dilakukan menggunakan kamar hitung dengan metode dilusi (Santosa *et al.*, 2003). Metode ini dilakukan dengan mengencerkan darah hingga konsentrasi tertentu dilanjutkan dengan penghitungan sel darah di dalam area kamar hitung (Carisch *et al.*, 2019). Jumlah sel darah yang sebenarnya akan dihitung menggunakan rumus khusus sehingga didapatkan estimasi jumlah darah per satuan volume (Carisch *et al.*, 2019). Metode pemeriksaan hematologi manual pada spesies burung dinilai lebih akurat dibandingkan dengan metode penghitungan otomatis karena morfologi eritrosit burung yang berinti sering terbaca sebagai leukosit dengan mesin hitung otomatis (Carisch *et al.*, 2019; Walberg, 2001).

Beberapa kendala di lapangan terkait pemeriksaan hematologi pada spesies *raptor* masih sering ditemui, seperti pendekatan metode *handling* dan

restraint, pengambilan darah hingga metode pengenceran yang tepat untuk mendapatkan populasi sel darah dengan kepadatan tertentu yang dapat dihitung. Berbagai pendekatan telah dipaparkan sebagai pilihan metode *handling* dan *restraint* pada *raptor*, termasuk metode *restraint* fisik dan kimia (Whitworth *et al.*, 2007), namun pada praktiknya, pendekatan yang dilakukan sangat tergantung pada kondisi dan perilaku elang itu sendiri. Pada penghitungan eritrosit dan leukosit total, pengamatan populasi sel darah elang di WRC Jogja selalu menunjukkan kepadatan sel yang tinggi di dalam kamar hitung. Untuk itu, perlu dilakukan penyesuaian dilusi darah agar populasi darah dapat dihitung. Studi ini bertujuan untuk mengembangkan dan memodifikasi metode pengambilan darah, penghitungan total eritrosit, dan total leukosit yang dilakukan di WRC Jogja pada elang brontok dan elang ular bido.

MATERI DAN METODE

Perijinan dan Kelaikan Etik

Studi ini dilakukan berdasar izin Keputusan Direktur Jenderal Konservasi Sumber Daya Alam dan Ekosistem Nomor:SK.353/KSDAE/SET/KSA.2/8/2019 tentang Izin Akses Sumber Daya Genetik Satwa Liar untuk Kepentingan Penelitian kepada Yayasan Konservasi Alam Yogyakarta dan Keterangan Kelaikan Etik (*Ethical Clearance*) Nomor: 0124/EC-FKH/Eks./2019 yang dikeluarkan oleh Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada. Seluruh kegiatan dalam penelitian ini dilakukan di bawah supervisi dokter hewan.

Hewan dan Perkandangan

Sebanyak masing-masing tiga ekor elang brontok dan elang ular bido yang direhabilitasi di WRC Jogja digunakan dalam studi ini. Semua elang adalah elang dewasa yang telah berada di WRC Jogja lebih dari dua tahun dengan berbagai latar belakang mulai dari serahan warga hingga hasil sitaan. Setiap elang ditempatkan dalam kandang individu berukuran 2 x 2 x 2 meter yang dilengkapi dengan kolam berisi air dan tenggeran pada kedua sudut kandang. Pembersihan kandang dilakukan setiap pagi mulai pukul 07.30-08.30 WIB. Pakan berupa 2-3 ekor kadal kebun (*Eutropis multifasciata*) yang diberikan sekali sehari pada pagi hari.

Handling dan Restraint

Sebelum dilakukan tindakan *handling*, observasi perilaku dilakukan untuk melihat kondisi eksternal elang. Elang yang memperlihatkan kondisi stres dengan terbang menabrak dinding kandang atau *moulting* berlebih perlu dipertimbangkan kembali untuk diambil darahnya. Karena pengambilan sampel darah biasa dilakukan bersamaan dengan pemeriksaan rutin, koleksi darah direkomendasikan dilakukan pada awal pemeriksaan untuk menghindari bias

hematologi akibat stres (Campbell dan Ellis, 2013).

Handling dilakukan secara fisik oleh operator. Peralatan yang digunakan untuk kebutuhan *handling* dan *restraint* antara lain sarung tangan tebal seperti sarung tangan las, *hood*, handuk, dan jaring jika diperlukan. Setiap operator memakai sarung tangan tebal pada tangan yang akan digunakan untuk menangkap kaki elang. Walau demikian, Payne (2007) menyatakan bahwa menangkap kaki elang dengan tangan kosong memberikan genggamannya yang lebih baik. Operator dapat menggunakan satu tangan untuk mengalihkan perhatian elang sedangkan tangan terkuatnya segera memegang kedua tarsus elang yang sedang bertengger. Kepala elang diposisikan sedemikian sehingga menggantung ke bawah dan tangan yang bebas menangkap bagian *os supraoccipital* dan daerah *os cervicalis* yang mendekati *os basioccipital* (**Gambar 1**). Hindari memegang area mata untuk mencegah trauma pada mata dan hindari menekan daerah trakhea agar jalur respirasi tetap terbuka. Beberapa teknik imobilisasi seperti melemparkan handuk yang menutupi kepala dan badan elang atau penggunaan jaring dapat dilakukan untuk membatasi ruang gerak elang.

Gambar 1. Metode *handling* pada elang di WRC Jogja

Restraint pada elang dilakukan dengan menggunakan *hood* kain untuk menutup kepala dan handuk untuk mengamankan sayap (**Gambar 2**). Elang diposisikan rebah dorsal dengan bagian

tarsus dan kedua sisi sayap dipegang oleh operator. Untuk kebutuhan pengambilan darah, sayap elang dapat dikeluarkan dari dan dipegang oleh operator yang lain.

Gambar 2. Aplikasi metode *restraint* pada elang di WRC Jogja

Pengambilan Sampel Darah

Sebanyak 1-2,5 ml darah diambil dari masing-masing tiga ekor elang brontok dan elang ular bido yang direhabilitasi di WRC Jogja. Lokasi pengambilan darah terletak di sisi ventral sayap yang kemudian didisinfeksi dengan alkohol. Darah dapat diambil dari *vena ulnaris* yang terletak di antara *os radius* dan *os ulna*, *vena basilica* atau *vena brachialis* menggunakan *syringe* 3 ml dan jarum 24 G (**Gambar 3**). *Vena brachialis* menjadi lokasi pilihan terakhir ketika pengambilan darah tidak

bisa dilakukan pada kedua vena yang lain. Sebelum memulai prosedur, *plunger* pada *syringe* 3 ml yang telah dirangkai dengan jarum 24 G ditarik hingga memberikan ruang udara pada badan spuit kurang lebih 0,5 ml. Jarum ditusukkan ke dalam vena dengan lubang jarum menghadap ke atas dan ujung runcing berada di sisi bawah. Ketika darah sudah mulai terlihat masuk ke dalam sambungan jarum dan *syringe*, sedot darah perlahan dengan menarik *plunger* hingga skala 3 ml.

Gambar 3. Skema anatomi sayap elang dan titik pengambilan darah yang biasa dilakukan pada elang-elang di WRC Jogja.

Darah yang sudah dikoleksi kemudian disimpan dalam tabung yang sudah diisi dengan antikoagulan EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) sedangkan untuk koleksi serum, darah sebagian disimpan dalam tabung tanpa antikoagulan. Darah dan EDTA dicampurkan dengan membolak-balik tabung. Penghitungan eritrosit total dan leukosit total dilakukan tidak lebih dari tiga jam setelah pengambilan darah. Tabung berisi darah disimpan di dalam kulkas jika prosedur penghitungan tidak dilakukan sesaat setelah pengambilan darah.

Penghitungan Eritrosit Total dan Leukosit Total

Metode penghitungan eritrosit total dan leukosit total pada raptor di WRC Jogja dilakukan dengan metode manual menggunakan kamar hitung Neubauer dan pengenceran dengan pipet Thoma eritrosit dan leukosit. **Gambar 4** menunjukkan rumus penghitungan yang digunakan untuk mendapatkan estimasi konsentrasi sel darah per satuan volumenya (Sulaiman *et al.*, 2010).

$$\text{Jumlah sel total} = \frac{\text{Jumlah sel terhitung} \times \text{faktor dilusi}}{\text{Volume terhitung}} \text{ (sel/mm}^3\text{)}$$

$$\text{Faktor dilusi} = \frac{\text{Volume bohlam pipet Thoma}}{\text{Volume darah}}$$

Gambar 4. Rumus umum penghitungan estimasi jumlah sel total dengan kamar hitung Neubauer.

Larutan pengencer yang digunakan di WRC Jogja untuk penghitungan eritrosit burung adalah larutan Natt-Hericks. Untuk mendapatkan campuran dengan faktor dilusi 250 dalam pipet Thoma eritrosit, maka darah elang dihisap hingga tanda 0.4 kemudian ditambahkan dengan larutan Natt-Hericks hingga tanda 101. Kedua larutan dicampur hingga homogen dengan membolak-balik pipet Thoma eritrosit. Campuran kemudian didiamkan selama lima menit. Setelah itu, pipet dibolak-balik kembali untuk memastikan campuran homogen sebelum ditetaskan ke dalam celah kamar hitung. Tiga tetes pertama larutan dibuang dengan menempelkan mulut pipet ke tisu penyerap dan tetes selanjutnya ditetaskan ke dalam celah kamar hitung.

Larutan Rees-Ecker modifikasi Dixon (Dixon dan Torbert, 1959)

digunakan untuk mengencerkan darah burung dalam penghitungan leukosit total. Darah diencerkan hingga 50 kali dengan pipet Thoma leukosit dengan menghisap darah hingga tanda 0.2 kemudian ditambahkan larutan Rees-Ecker hingga tanda 11. Langkah selanjutnya adalah sama dengan langkah-langkah pada penghitungan eritrosit total.

Sel-sel eritrosit dan leukosit dihitug berdasar prinsip penghitungan kamar hitung yang berlaku (Walberg, 2001) pada perbesaran 1000 kali. Jumlah total eritrosit dihitug pada empat kotak di setiap sudut dan kotak di tengah kamar hitung eritrosit (**Gambar 5**). Jumlah total leukosit dihitug pada empat kotak besar seperti diilustrasikan pada **Gambar 5**. Volume terhitung adalah volum total kotak yang digunakan dalam penghitungan sel darah.

Gambar 5. Skala dan ukuran kamar hitung Neubauer dengan kamar hitung eritrosit (merah) dan kamar hitung leukosit (biru) (a), pipet Thoma eritrosit (b), pipet Thoma leukosit (c), dan modifikasi pipet dengan sambungan selang untuk menghisap darah dengan *syringe* 10 ml (d)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Teknik *Restraint* dan Koleksi Sampel Darah

Seluruh prosedur koleksi darah dilakukan kurang dari 30 menit. Hal ini dilakukan untuk mencegah stres berlebihan pada elang akibat tindakan *restraint* yang terlalu lama. Prosedur *restraint* yang dilakukan di WRC Jogja mengadaptasi metode Aba (Maechtle, 1998) yang pada prinsipnya melakukan imobilisasi pada kepala dan kedua sayap dengan kain. Secara umum, *restraint* pada *raptor* bertujuan mengamankan lima titik ekstremitas: kepala, dua sayap, dan dua kaki (Payne, 2007). Jika diperlukan lampu atau *head lamp* selama dilakukan prosedur, hindari kontak cahaya dengan

mata elang karena akan menyebabkan elang memberontak atau eksitasi.

Berdasar observasi selama dilakukan prosedur *handling* dan *restraint* pada elang di WRC Jogja, elang ular bido cenderung lebih tenang dibandingkan elang brontok. Elang ular bido memperlihatkan postur ‘pura-pura mati’ dengan tetap diam dan mata tertutup selama dilakukan prosedur *restraint*. Elang brontok terlihat lebih sering memberontak dan bersuara daripada elang ular bido.

Secara praktis, burung-burung ukuran medium di WRC Jogja seperti kakatua, nuri bayan, dan *raptor* ukuran medium diambil darahnya sebanyak 1-2 ml untuk kebutuhan pemeriksaan rutin setiap tahun. *Raptor* ukuran kecil seperti elang alap jambul dan elang tikus

diambil darahnya sebanyak 0,5-1 ml sedangkan burung ukuran besar seperti elang laut perut putih dan kasuari dapat diambil darahnya hingga 3 ml. Sebagian besar darah akan diambil untuk koleksi serum sedangkan untuk pemeriksaan hematologi hanya membutuhkan 0,5-1 ml darah. Laboratorium diagnostik seperti Balai Besar Veteriner biasanya membutuhkan serum sekitar 0,5-1 ml untuk pemeriksaan biokimia darah atau deteksi antibodi. Darah yang tersisa setelah pemeriksaan hematologi akan disimpan dalam *freezer* sebagai arsip dan kebutuhan deteksi molekuler seperti deteksi jenis, *genetic sexing* atau analisis kekerabatan spesies.

McGuill dan Rowan (1989) mengatakan *10 percent – 10 percent rule* merupakan aturan umum pengambilan sampel darah yaitu darah yang diambil adalah 10% dari total darah dalam tubuh. Berdasar estimasi bahwa total darah dalam tubuh adalah 10% berat badan, maka darah yang diambil tidak boleh lebih dari 1% berat badan *raptor* dalam gram (Walberg, 2001). Sebagai contoh, *raptor* dengan bobot 100 gram hanya bisa diambil darahnya maksimal 1 ml. Hawkins *et al.* (2001) merekomendasikan pengambilan darah sebanyak 0,5 ml pada setiap 100 gram berat badan burung dengan mengasumsikan bahwa volume darah burung adalah 7 ml per 100 gram berat badan. Pengambilan darah elang di WRC Jogja dilakukan pada *vena ulnaris* yang terletak di daerah *os metacarpal*. Pada elang brontok fase intermediat di WRC Jogja, segmen *vena ulnaris* di daerah ini terlihat lebih kecil sehingga pengambilan darah biasa dilakukan pada *vena ulnaris* yang terletak mendekati diafisis *os ulnaris* atau pada *vena basilica*.

Hematoma sering terjadi akibat pecahnya pembuluh darah karena ukuran jarum yang terlalu besar atau karena

gerakan mendadak burung akibat *restraint* yang tidak sempurna. Hematoma dapat dihindari dengan penerapan *restraint* yang tepat sehingga burung tidak banyak bergerak saat dilakukan prosedur. *Restraint* dengan dua personel yang masing-masing memegang kedua kaki elang dan badan elang sangat direkomendasikan. Hematoma juga dapat dicegah dengan menekan titik tusukan jarum menggunakan kapas selama 1-2 menit dimulai bersamaan dengan penarikan jarum dari dalam vena. Hawkins *et al.* (2001) merekomendasikan penggunaan jarum 25-27 G untuk mencegah terjadinya hematoma. *Wildlife Ethics Committee of South Australia* (2017) juga menganjurkan penggunaan jarum 23-27 G untuk koleksi darah menyesuaikan dengan ukuran *raptor*.

Metode Pengenceran dan Estimasi Nilai Total

Secara umum, pengenceran eritrosit dilakukan dengan faktor dilusi 200 kali dan pengenceran leukosit dilakukan dengan faktor dilusi 20 kali (Ochei and Kolhatkar, 2000) untuk mendapatkan populasi sel darah yang dapat dihitung. Kenyataannya, pemeriksaan darah elang-elang di WRC Jogja memperlihatkan populasi sel darah yang sangat padat di bawah kamar hitung dengan pengenceran standar. Karena itu, perlu dilakukan modifikasi pengenceran sehingga sel darah dapat dihitung.

Pada dasarnya, pipet Thoma eritrosit dan leukosit didesain untuk dapat digunakan pada pengenceran dengan berbagai faktor dilusi (**Gambar 6**). Tanda 101 pada pipet eritrosit dan tanda 11 pada pipet leukosit menunjukkan volume total pipa kapiler dan ruang bohlam pipet, yaitu berturut-turut 101 unit dan 11 unit. Ruang bohlam pipet (*bulb*) eritrosit memiliki volume 100 unit

sedangkan ruang bohlam pipet leukosit memiliki volume 10 unit. Pipa kapiler masing-masing pipet memiliki volume 1

unit dengan skala 0.1 – 1.0 unit sebagai penanda volume darah yang dihisap.

Gambar 6. Modifikasi faktor dilusi

Faktor dilusi dihitung dengan membagi volume ruang bohlam pipet dengan volume darah yang dimasukkan dalam pipa kapiler (**Gambar 6**). Karena pipa kapiler memiliki skala, manipulasi volume darah yang dihisap dapat dilakukan. Sebagai contoh, jika dalam penghitungan eritrosit, darah dengan volume 0.5 unit masih terlalu padat populasinya di bawah kamar hitung, maka volume darah dapat diturunkan hingga 0.2 unit. Karena volume ruang bohlam pipet eritrosit adalah 100 unit dan volume darah yang dihisap adalah 0.2 unit, maka faktor dilusinya adalah 500.

Kamar hitung Neubauer memiliki ukuran 3 x 3 mm dengan jarak antara permukaan kamar hitung dengan kaca penutup (*coverslip*) adalah 0,1 mm. Volume cairan yang berada di atas kamar hitung eritrosit adalah $0,1 \text{ mm}^3$ ($1 \times 1 \times$

0,1 mm) sehingga lima kotak yang lebih kecil sebagai area hitung sel eritrosit memiliki total volume $0,02 \text{ mm}^3$. Jumlah leukosit total dihitung pada keempat kamar hitung leukosit yang masing-masing memiliki volume $0,1 \text{ mm}^3$ ($1 \times 1 \times 0,1 \text{ mm}$).

Hasil Penghitungan Eritrosit dan Leukosit Total

Seluruh penghitungan eritrosit dan leukosit total dengan pengenceran standar menunjukkan kepadatan sel yang tinggi di bawah kamar hitung. Setelah dilakukan pengenceran, hasil penghitungan eritrosit dan leukosit total dapat dilihat pada **Tabel 1. Gambar 7** menunjukkan kepadatan populasi sel sebelum dan setelah modifikasi pengenceran standar dengan larutan Rees-Ecker.

Hasil ini menunjukkan bahwa pengenceran darah pada faktor dilusi tertentu bisa dilakukan jika didapatkan populasi sel darah yang terlalu padat pada metode pengenceran standar. Yadav *et al.* (2018) juga melakukan manipulasi faktor pengenceran untuk menghitung jumlah leukosit total pada

ayam-ayam eksotik. Observasi pascapengambilan darah menunjukkan bahwa seluruh elang yang diambil darahnya tidak memperlihatkan tanda-tanda *hypovolemic shock* sehingga pengambilan darah sebanyak 1-2,5 ml cukup aman dengan berat badan elang di atas 800 gram.

Tabel 1. Hasil penghitungan eritrosit dan leukosit total pada elang brontok dan elang ular bido (arsip data kesehatan WRC Jogja).

Jenis <i>raptor</i>	Elang brontok			Elang ular bido		
Kode	G-2	G-4	G-15	G-10	G-11	G-24
Berat badan (gram)	1300	900	800	900	900	1050
PCV (%)	40	40,5	38,5	37,5	35,6	37,7
Eritrosit total ($10^6/\text{mm}^3$)	1,8	1,47	2,21	1,47	1,64	1,6
Leukosit total ($/\text{mm}^3$)	8750	8625	8125	8500	9375	6750

Gambar 7. Populasi darah di bawah kamar hitung dengan pengenceran standar dan modifikasi.

KESIMPULAN

Metode *restraint raptor* di WRC Jogja dilakukan dengan metode fisik yaitu imobilisasi kelima ekstremitas: kepala, dua sayap, dan dua kaki. Penghitungan eritrosit dan leukosit total dilakukan dengan metode dilusi dan

dihitung dalam kamar hitung Neubauer. Pengenceran dengan memanipulasi faktor dilusi dapat dilakukan jika pada pengenceran standar menggunakan pipet Thoma memperlihatkan populasi sel yang padat dan tidak dapat dihitung dengan metode hitung manual menggunakan kamar hitung.

DAFTAR PUSTAKA

- Campbell, T. & Ellis, C. K. 2013. *Avian and exotic animal hematology and cytology*, John Wiley & Sons.
- Carisch, L., Stirn, M., Hatt, J. M., Federer, K., Hofmann-Lehmann, R. & Riond, B. 2019. White blood cell count in birds: evaluation of a commercially available method. *BMC Vet. Res.*, 15, 93.
- Dixon, J. & Torbert, B. J. 1959. A dilution-stain for direct enumeration of avian blood cells. *Poult. Sci.*, 38, 222-223.
- Hawkins, P., Morton, D., Cameron, D., Cuthill, I., Francis, R., Freire, R., Gosler, A., Healy, S., Hudson, A. & Inglis, I. 2001. Laboratory birds: refinements in husbandry and procedures. *Lab. Anim.*, 35, 1-163.
- Maechtle, T. L. 1998. The Aba: A Device for Restraining Raptors and Other Large Birds (El Aba: Un Aparato para Restrangir Rapaces y Otras Aves Grandes). *J. Field Ornithol.*, 66-70.
- Mcguill, M. W. & Rowan, A. N. 1989. Biological effects of blood loss: implications for sampling volumes and techniques. *ILAR Journal*, 31, 5-20.
- Ochei, J. O. & Kolhatkar, A. A. 2000. *Medical laboratory science: theory and practice*, McGraw Hill Education.
- Payne, S. 2007. *The Handling of Sick and Injured Large Wild Birds of Prey. National Wildlife Rehabilitation Conference Proceedings.*
- Santosa, E. B., Aswan, M., Fitrianiingsih, N. & Mulyani, S. 2003. Studi Gambaran Darah Burung Elang Yang Dipelihara Di Kebun Binatang Gembira Loka YOGYAKARTA. *Jurnal Sain Veteriner*, 21.
- Sulaiman, M., Aduta, D. & Salami, S. 2010. The Comparative study of the blood cellular composition in Muscovy ducks in Nigeria. *Int. J. Poult. Sci.*, 9, 836-841.
- Walberg, J. White blood cell counting techniques in birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 2001. 72-76.
- Wildlife Ethics Committee of South Australian Museum*. Collection of blood from wildlife policy, 2017. 1-11.
- Whitworth, D., Newman, S., Mundkur, T. & Harris, P. 2007. *Wild birds and avian influenza: an introduction to applied field research and disease sampling techniques*, Food & Agriculture Org.
- Yadav, S. P., Kannaki, T., Mahapatra, R., Paswan, C., Bhattacharya, T., Sarkar, S. K. & Chatterjee, R. 2018. In vivo cell-mediated immune, hemagglutination inhibition response, hematological and biochemical values in native vs. exotic chicken breeds. *Poult. Sci.*, 97, 3063-3071.