

GIZI DAN PENYAKIT TROPIS**Laporan Akhir Hibah Penelitian Strategis Nasional
Tahun Anggaran 2010****ARTHROSPIRA (SPIRULINA) SEBAGAI FEED
IMMUNOMODULATORY PADA AYAM YANG DIVAKSIN
AVIAN INFLUENZA (H5N1)**

Widya Paramita Lokapirnasari, drh., MP
Yeni Dhamayanti, drh., MKes.
Dr. Suwarno, drh., MSi.

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga, sesuai dengan Surat Keputusan
Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional dan Penelitian Multi
Tahun Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2010 Nomor: 553/H3/KR/2010,
Tanggal 11 Maret 2010

UNIVERSITAS AIRLANGGA

Oktober 2010

**Laporan Akhir Hibah Penelitian Strategis Nasional
Tahun Anggaran 2010**



kk
kfc
LP-156/11
Lok
a

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

**ARTHROSPIRA (SPIRULINA) SEBAGAI FEED
IMMUNOMODULATORY PADA AYAM YANG DIVAKSIN
AVIAN INFLUENZA (H5N1)**

Widya Paramita Lokapirnasari, drh., MP
Yeni Dhamayanti, drh., MKes.
Dr. Suwarno, drh., MSi.

**Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga, sesuai dengan Surat Keputusan
Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional dan Penelitian Multi
Tahun Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2010 Nomor: 553/H3/KR/2010,
Tanggal 11 Maret 2010.**

UNIVERSITAS AIRLANGGA

Oktober 2010

HALAMAN PENGESAHAN

1. JUDUL : Arthrospira (Spirulina) sebagai *feed immunomodulatory* pada ayam yang divaksin Avian Influenza (H5N1)
2. Ketua Peneliti :
- Nama Lengkap : Widya Paramita Lokapirnasari, drh., MP
 - Jenis kelamin : Perempuan
 - NIP : 132176853
 - Pangkat/Golongan : Penata tk I/ III d
 - Jabatan : Lektor Kepala
 - Bidang Keahlian : Nutrisi Ternak
 - Fakultas/Puslit : Fakultas Kedokteran Hewan- LPPM Universitas Airlangga
 - Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tim Peneliti :


| No. | Nama Peneliti | Bidang Keahlian | Fakultas | Perguruan Tinggi |
|-----|-----------------------------|--------------------|--|-----------------------|
| 1. | Yeni Dhamayanti, drh., MKes | Biologi Kedokteran | FKH Unair dan Lab. Avian Influenza ITD | Universitas Airlangga |
| 2. | Dr. Suwarno, drh., MSi. | Imunovirologi | FKH Unair | Universitas Airlangga |

3. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian

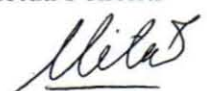
- Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 1 tahun
- Biaya yang diusulkan : Rp. 100.000.000
- Biaya yang disetujui tahun : Rp. 70.000.000

Surabaya, 29 Oktober 2010

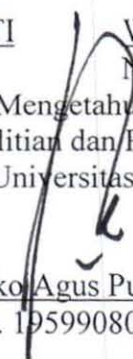
Mengetahui

Ketua Institute of Tropical Disease
Universitas Airlangga

 Prof. Dr. Nasronuddin, dr., SpPD-KPTI
NIP. 19561103 198403 1001

Ketua Peneliti


 Widya Paramita Lokapirnasari, MP., drh.
NIP. 132 176 853

Mengetahui

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Airlangga

 Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.Si
NIP. 1959908051987011001

RINGKASAN

Arthrospira (*Spirulina*) termasuk dalam *phylum Cyanobacteria*, diklasifikasikan sebagai *blue-green algae* atau *blue-green bacteria*. *Spirulina* merupakan sumber protein dengan kandungan antara 55-65%, selain itu juga mengandung Vitamin B-12, chlorophyll, carotenoid, mineral, *gamma-linolenic acid* (GLA) dan beberapa pigment, yaitu phycobilins, termasuk C-phycocyanin (C-PC), dan allophycocyanin. Kandungan protein yang tinggi tersebut berhubungan dengan kualitas asam amino, koefisien pencernaan serta nilai biologis.

Gut associated lymphoid tissue (GALT) terdiri dari organ-organ maupun sel-sel imun yang banyak dijumpai pada *epithelial layer* dan *lamina propria*. Sel-sel imun yang ada pada GALT bersifat sebagai *inducer*, *immunoregulator* dan *effector*. Pada ayam, GALT dan limpa merupakan organ utama untuk menginduksi terbentuknya respon imun. Antigen yang masuk melalui saluran pencernaan akan mengaktivasi sel Th dan sel B yang merupakan prekursor dari Ig A. Ig A banyak ditemukan di *payer patch's* dan akan bermigrasi ke *mucosal effector sites*, misal lamina propia intestine. Pada *mucosal effector sites* banyak dijumpai sel T dan sel B, serta sel plasma yang akan mensekresi Ig A. Struktur intra epithelial mukosa saluran cerna memungkinkan sekresi Ig A keluar dari sel menuju pembuluh darah atau jaringan.

Khusus infeksi virus, sel yang terpapar virus akan mengeluarkan interferon yang dapat menstimulus sekresi senyawa lain pada sel-sel yang tidak terpapar. Senyawa tersebut disekresi dengan tujuan untuk menghambat proses replikasi virus dalam sel yang terpapar berikutnya. Hal ini merupakan salah satu mekanisme penghambatan proses infeksi oleh virus. Pelepasan interferon akan memicu sel-sel yang tidak terinfeksi mensintesis "*anti viral protein (AVP)*" untuk menghalangi proses replikasi virus.

Tujuan penelitian ini antara lain mengetahui pengaruh pemberian crude *Spirulina* terhadap performan pertumbuhan dan imunitas pada ayam petelur yang divaksin Avian Influenza H5N1. Rancangan yang digunakan pada penelitian adalah rancangan acak lengkap dengan 4 perlakuan dan 9 ulangan. Perlakuan pertama adalah tanpa pemberian crude *Spirulina* (0%), dan bertindak sebagai kontrol (P0). Selanjutnya P1, P2 dan P3 adalah hewan coba yang diberi crude *Spirulina* dalam pakannya dengan

dosis 0.5, 1.0% dan 1.5%. Hewan coba masing-masing divaksinasi avian influenza strain H5N1 setelah diberi crude Spirulina. Variabel dependent pada penelitian ini adalah (1) *feed conversion ratio*, (2) *feed efficiency ratio*, (3) *protein efficiency ratio*, (4) konsumsi pakan, (5) limfosit, (6) Ig A, (7) interferon α . Variabel independent adalah (1) pemberian crude Spirulina [(-)/(+)].

Hasil analisis statistik menggunakan ANAVA dengan uji F menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0.05$) di antara perlakuan terhadap *Feed Conversion Ratio* (2,12 - 2,14), *feed efficiency ratio* (46,73 - 47,25), konsumsi pakan (75,76 - 83,67 g/ekor/hari), *optical density* λ 450 nm interferon alpha (0,18-0,30), persentase Interferon Alpha (8,86 - 14,18%), kadar Interferon Alpha (2,89 - 8,48 pg/ml), serta kadar Immunoglobulin A (911,111 - 1462,222ng/ml) pada ayam petelur.

Hasil analisis statistik menggunakan ANAVA dengan uji F menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0.05$) di antara perlakuan terhadap nilai *protein efficiency ratio* (27,72 - 38,89), jumlah limfosit (10,09 - 13,16 mm³), *optical density* immunoglobulin A (0,536 - 0,671), persentase Immunoglobulin A (49,115-61,406%) pada ayam petelur. Rerata nilai *protein efficiency ratio* menunjukkan bahwa nilai terendah terletak pada perlakuan P₀, yang berbeda nyata dengan perlakuan P₁, P₂ dan P₃. Rerata jumlah limfosit menunjukkan bahwa nilai terendah terletak pada perlakuan P₀ yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan P₁, namun berbeda dengan perlakuan P₂ dan P₃. Jumlah limfosit tertinggi terletak pada perlakuan P₂ dan P₃. Rerata *optical density* (OD) immunoglobulin A menunjukkan bahwa nilai tertinggi terletak pada perlakuan P₀, yang tidak berbeda dengan perlakuan P₁ tetapi berbeda nyata dengan P₂ dan P₃. Nilai OD terendah terletak pada perlakuan P₂ dan P₃ yang tidak berbeda nyata dengan P₁. Rerata persentase immunoglobulin A menunjukkan bahwa nilai tertinggi terletak pada perlakuan P₀, yang tidak berbeda dengan perlakuan P₁ tetapi berbeda nyata dengan P₂ dan P₃. Nilai persentase terendah terletak pada perlakuan P₂ dan P₃ yang tidak berbeda nyata dengan P₁.

Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa formula pakan perlakuan yang mengandung spirulina dapat digunakan sebagai feed imunomodulator karena dapat meningkatkan performan pertumbuhan serta sistem imunitas pada ayam petelur.

SUMMARY

Arthrospira (Spirulina), including the phylum Cyanobacteria, are classified as blue-green algae or blue-green bacteria. Spirulina is a source of protein content between 55-65%, but also contains Vitamin B-12, chlorophyll, carotenoids, minerals, gamma-linolenic acid (GLA) and some pigment, namely phycobilins, including C-phycocyanin (C-PC), and allophycocyanin. High levels of proteins associated with the quality of amino acids, digestibility coefficient and biological value.

Gut associated lymphoid tissue (GALT) consists of organs and immune cells are often found in the epithelium layer and lamina propria. Immune cells that exist in nature as a GALT immunoregulator inducer, and effector. In chicken, GALT and spleen are the main organs to induce the formation of an immune response. Antigen entering through the digestive tract will activate Th cells and B cells from Ig A. Prekursor Ig A is found in patches Peyer and will migrate to mucosal effector sites, such as intestinal lamina propria. In the mucosal effector sites are often found in T cells and B cells and plasma cells that will secretion of Ig A. Structure of intra-epithelial mucosa of the digestive tract allows the secretion of Ig A out of the cells into blood vessels or tissue.

Specific viral infection, the cells are exposed to the virus will release interferon that stimulates the secretion of other compounds to cells not exposed. These compounds are secreted in order to inhibit virus replication in cells exposed to the next. This is one mechanism of inhibition of the process of infection by the virus. Will trigger the release of interferon-cells to uninfected cells synthesize "anti-viral protein (AVP)" to inhibit virus replication process.

The purpose of this research to know the impact of crude Spirulina on growth performance and immunity in laying hens vaccinated with the H5N1 Avian Influenza. The design used in this research was completely randomized design with 4 treatments and 9 replications. The first treatment is without giving crude Spirulina (0%), as a control (P0). P1, P2 and P3 are the experimental animals fed crude Spirulina in their diet at doses 0.5 1.0% and 1.5%. Each animal vaccinated with the H5N1 strain of avian influenza after being fed crude Spirulina. The dependent variable in this study were (1) feed conversion ratio, (2) feed efficiency ratio, (3) protein efficiency ratio, (4) feed consumption, (5) lymphocytes, (6) Ig A, (7) interferon α . The independent variables are (1) provide crude Spirulina [(-)/(+)].

Statistical analysis using ANOVA with F test showed no significant difference ($p > 0.05$) among treatments of Feed Conversion Ratio (2.12 to 2.14), feed efficiency ratio (46.73 to 47.25), feed consumption (75.76 to 83.67 g / head / day), λ 450 nm optical density of interferon alpha (0.18 to 0.30), percentage of Interferon Alpha (8.86 to 14.18%), Levels of Interferon Alpha (2.89 to 8.48 pg / ml), and Level immunoglobulin A (911.111 to 1462.222 ng / ml) in laying hens.

Statistical analysis using ANOVA with F test showed a significant difference ($p < 0.05$) among treatments of protein efficiency ratio (27.72 to 38.89); the number of lymphocytes (10.09 to 13.16 mm³), the optical density of immunoglobulin A (0.536 -0.671), the percentage of immunoglobulin A (49.115 to 61.406%) in laying hens. The average value of protein efficiency ratio indicates that the lowest value in the P₀ treatment, which is significantly different from treatments P₁, P₂ and P₃. The average number of lymphocytes showed that the lowest value in the P₀ treatment were not significantly different from P₁ treatment, but significantly different with the P₂ and P₃. The highest number of lymphocytes in the treatment of P₂ and P₃. The average optical density of immunoglobulin A shows that the highest value in the P₀ treatment, which is not significantly different from P₁, but significantly different from P₂ and P₃. The lowest OD value in the treatment of P₂ and P₃ were not significantly different from P₁. The average percentage of immunoglobulin A shows that the highest value in the P₀ treatment, which is not significantly different from P₁ but significantly different from P₂ and P₃. The lowest percentage value lies in the treatment of P₂ and P₃ were not significantly different from P₁.

The conclusion is that the formula for the treatment of feed containing spirulina can be used as feed immunomodulator because it can improve growth performance and immune system in laying hens.

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini antara lain mengetahui pengaruh pemberian crude Spirulina terhadap performan pertumbuhan dan imunitas pada ayam petelur yang divaksin Avian Influenza H5N1. Rancangan yang digunakan pada penelitian adalah rancangan acak lengkap dengan 4 perlakuan dan 9 ulangan. Perlakuan pertama adalah tanpa pemberian crude Spirulina (0%), dan bertindak sebagai kontrol (P_0). Selanjutnya P_1 , P_2 dan P_3 adalah hewan coba yang diberi crude Spirulina dalam pakannya dengan dosis 0.5, 1.0% dan 1.5%. Hewan coba masing-masing divaksinasi avian influenza strain H5N1 setelah diberi crude Spirulina.

Hasil analisis statistik menggunakan ANAVA dengan uji F menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p>0.05$) di antara perlakuan terhadap *Feed Conversion Ratio* (2,12 - 2,14), *feed efficiency ratio* (46,73 - 47,25), konsumsi pakan (75,76 - 83,67 g/ekor/hari), *optical density* λ 450 nm interferon alpha (0,18-0,30), persentase Interferon Alpha (8,86 - 14,18%), kadar Interferon Alpha (2,89 - 8,48 pg/ml), serta kadar Immunoglobulin A (911,111 - 1462,222ng/ml) pada ayam petelur.

Hasil analisis statistik menggunakan ANAVA dengan uji F menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ($p<0.05$) di antara perlakuan terhadap nilai *protein efficiency ratio* (27,72 - 38,89), jumlah limfosit (10,09 - 13,16 mm^3), *optical density* immunoglobulin A (0,536 -0,671), persentase Immunoglobulin A (49,115-61,406%) pada ayam petelur.

Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa formula pakan perlakuan yang mengandung spirulina dapat digunakan sebagai feed imunomodulator karena dapat meningkatkan performan pertumbuhan serta sistem imunitas pada ayam petelur.

ABSTRACT

The purpose of this research to know the impact of crude Spirulina on growth performance and immunity in laying hens vaccinated with the H5N1 Avian Influenza. The design used in this research was completely randomized design with 4 treatments and 9 replications. The first treatment is without giving crude Spirulina (0%), as a control (P0). P1, P2 and P3 are the experimental animals fed crude Spirulina in their diet at doses 0.5 1.0% and 1.5%. Each animal vaccinated with the H5N1 strain of avian influenza after being fed crude Spirulina.

Statistical analysis using ANOVA with F test showed no significant difference ($p > 0.05$) among treatments of Feed Conversion Ratio (2.12 to 2.14), feed efficiency ratio (46.73 to 47.25), feed consumption (75.76 to 83.67 g / head / day) , λ 450 nm optical density of interferon alpha (0.18 to 0.30), percentage of Interferon Alpha (8.86 to 14.18%), Levels of Interferon Alpha (2.89 to 8.48 pg / ml), and Level immunoglobulin A (911.111 to 1462.222 ng / ml) in laying hens.

Statistical analysis using ANOVA with F test showed a significant difference ($p < 0.05$) among treatments of protein efficiency ratio (27.72 to 38.89), the number of lymphocytes (10.09 to 13.16 mm³), the optical density of immunoglobulin A (0.536 -0.671), the percentage of immunoglobulin A (49.115 to 61.406%) in laying hens.

The conclusion is that the formula for the treatment of feed containing spirulina can be used as feed immunomodulator because it can improve growth performance and immune system in laying hens.

PRAKATA

Alhamdulillah Robbil-'aalamiin. Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala Rahmat dan KaruniaNya yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan dan menyelesaikan penelitian Strategis Nasional yang berjudul *Arthrospira (Spirulina) sebagai feed immunomodulatory* pada ayam yang divaksin Avian Influenza (H5N1).

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat Rektor Unair, Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Unair, Pejabat Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Ditjen Dikti Depdiknas, Dekan dan Wakil Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Unair, Ketua Institute of Tropical Disease Universitas Airlangga atas kesempatan yang telah diberikan kepada kami untuk melaksanakan dan menyelesaikan penelitian ini. Peneliti juga mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada semua pihak yang telah membantu tim kami dalam menyelesaikan penelitian ini.

Akhirnya kami berharap semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat untuk pengembangan ilmu dan turut berperan dalam masyarakat.

DAFTAR ISI

Halaman

| | |
|--|------|
| LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN | i |
| RINGKASAN DAN SUMMARY | ii |
| ABSTRAK | vi |
| PRAKATA | viii |
| DAFTAR ISI | ix |
| DAFTAR TABEL | xi |
| DAFTAR GAMBAR | xii |
| DAFTAR LAMPIRAN | xiii |
| I. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1. Latar Belakang Penelitian | 1 |
| II. TINJAUAN PUSTAKA | 3 |
| 2.1. Arthrospira (Spirulina) | 3 |
| 2.2. Sistem Imunitas Mukosal Saluran Pencernaan Ayam | 6 |
| 2.3. Virus Avian Influenza | 7 |
| 2.4. Konsumsi Pakan | 8 |
| 2.5. Konversi Pakan | 9 |
| 2.6. Limfosit | 10 |
| 2.7. Interferon Alpha | 13 |

Surabaya
BARU

| | |
|-------------------------------------|----|
| III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN | 15 |
| 3.1. Tujuan umum | 15 |
| 3.2. Tujuan khusus | 15 |
| IV. METODE PENELITIAN | 17 |
| 4.1. Bahan dan Alat | 17 |
| 4.2. Hewan Coba | 18 |
| 4.3. Jenis dan Rancangan Penelitian | 19 |
| 4.4. Variabel Penelitian | 20 |
| 4.5. Analisis Data | 21 |
| V. HASIL DAN PEMBAHASAN | 24 |
| 5.1. Feed Conversion Ratio | 24 |
| 5.2. Feed Efficiency Ratio | 27 |
| 5.3. Protein Efficiency Ratio | 28 |
| 5.4. Konsumsi Pakan | 29 |
| 5.5. Limfosit | 30 |
| 5.6. Interferon Alpha | 33 |
| 5.7. Immunoglobulin A | 40 |
| VI. KESIMPULAN DAN SARAN | 45 |
| DAFTAR PUSTAKA | 46 |
| LAMPIRAN | |

DAFTAR TABEL

| | Halaman |
|--|---------|
| Tabel 2.1. Komposisi Nutrien <i>Spirulina Platensis</i> | 5 |
| Tabel 5.1. Rerata <i>Feed Conversion Ratio</i> | 24 |
| Tabel 5.2. Rerata <i>Feed Efficiency Ratio</i> | 27 |
| Tabel 5.3. Rerata <i>Protein Efficiency Ratio</i> | 28 |
| Tabel 5.4. Rerata Konsumsi Pakan | 29 |
| Tabel 5.5. Rerata Limfosit | 30 |
| Tabel 5.6.1. Rerata OD λ 450 nm Interferon Alpha | 33 |
| Tabel 5.6.2. Rerata Persentase Interferon Alpha | 34 |
| Tabel 5.6.3. Rerata Kadar Interferon Alpha | 35 |
| Tabel 5.7.1. Rerata OD λ 450 nm Immunoglobulin A | 40 |
| Tabel 5.7.2. Rerata Persentase Immunoglobulin A | 41 |
| Tabel 5.7.3. Rerata Kadar Immunoglobulin A | 42 |

DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|--|---------|
| Gambar 2.1. Arthrospira (Spirulina) | 4 |
| Gambar 5.1. Grafik <i>Feed Conversion Ratio</i> | 24 |
| Gambar 5.2. Grafik <i>Feed Efficiency Ratio</i> | 27 |
| Gambar 5.3. Grafik <i>Protein Efficiency Ratio</i> | 28 |
| Gambar 5.4. Grafik Konsumsi Pakan | 29 |
| Gambar 5.5. Grafik Jumlah Limfosit | 30 |
| Gambar 5.6.1. Grafik OD Interferon Alpha | 33 |
| Gambar 5.6.2. Grafik Persentase Interferon Alpha | 34 |
| Gambar 5.6.3. Grafik Kadar Interferon Alpha | 35 |
| Gambar 5.7.1. Grafik OD Immunoglobulin A | 41 |
| Gambar 5.7.2. Grafik Persentase Immunoglobulin A | 42 |
| Gambar 5.8.3. Grafik Kadar Immunoglobulin A | 43 |

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Penelitian

Spirulina sebagai bahan *feed immunomodulatory* mengandung *blue-polypeptida* yang disebut Phycocyanin yang mempengaruhi stem cells pada sumsum tulang, merupakan induk sel darah putih yang membentuk sistem immune cellular dan sel-sel darah merah. Spirulina meningkatkan produksi dari sistem humoral (antibodi dan cytokines) maupun sistem immune cellular termasuk *T-cells*, *B-cells*, *Macrophages*, dan anti-kanker *Natural Killer cells*. Studi pada mice, hamsters, ayam, kalkun, kucing dan ikan, menunjukkan bahwa spirulina memiliki kemampuan untuk meningkatkan fungsi sistem immune dan meningkatkan kemampuan tubuh untuk menghasilkan sel-sel darah baru (Richard and Ronald, 2007).

Dinding sel Spirulina mengandung molekul yang menyerupai *lipopolysaccharide* (LPS) pada dinding sel bakteri gram negatif dan dapat menginduksi respon imun. Pemberian molekul aLPS Cyanobacterial (CyP), yang diklasifikasikan sebagai ganggang biru, mampu menghambat endotoxin shock yang diinduksi oleh LPS bakteri patogen pada mencit. CyP menghalangi pembentukan ligand antara molekul LPS bakteri tersebut dengan *toll like receptor-4* (TLR-4).

Virus avian influenza dapat menginduksi sekresi sitokin proinflamasi dan proses apoptosis (Morris *et al.*, 2008). Infeksi virus avian influenza menyebabkan hiperinduksi sitokin proinflamasi, disebut *sitokine storm* (Asmara, 2008). Sekresi TNF- α yang meningkat saat terjadi infeksi virus avian influenza, dilaporkan, akan meningkatkan morbiditas. Di sisi lain, IL-1 bertindak sebagai faktor pemicu proses "*clearance*" virus

avian influenza (Ishikawa *et al.*, 2005; Szretter *et al.*, 2007). Kurang lebih 30% dari seluruh sel pulmo terinfeksi virus Avian Influenza memperlihatkan *apoptotic bodies* pada hari ke dua, dan meningkat secara signifikan pada hari ke lima (80% sel terinfeksi memperlihatkan *apoptotic bodies*). Terkait dengan kondisi ini, jumlah sel makrophage yang aktif mulai meningkat pada hari ke dua pasca infeksi dan jumlah itu mencapai puncaknya pada hari ke lima pasca infeksi virus Avian Influenza (Hashimoto *et al.*, 2007).

Pada dasarnya, saluran pencernaan unggas juga mempunyai sistem pertahanan. Di sepanjang mukosa saluran pencernaan unggas dijumpai *gut-associated lymphoid tissues* (GALT) yang mengandung jaringan-jaringan lymphoid. Adanya antigen memicu aktivitas sel T helper dan sel B precursor, Immunoglobulin (Ig) A yang tersebar pada GALT, khususnya *Payer's path* (PP). Selanjutnya, sel-sel tersebut bermigrasi ke *effector site* yang ada pada *lamina propia* (LP) intestinum (Skalan, 2005). Respon imun yang terbentuk di mukosa intestinum, pada akhirnya, dapat mereduksi pathogenesis suatu penyakit.

Dengan latar belakang tersebut, maka formulasi pakan yang mengandung kecukupan nutrien yang dibutuhkan ternak serta hubungannya dengan peningkatan sistem imunitas terhadap virus AI perlu dikembangkan dan dikaji lebih dalam.

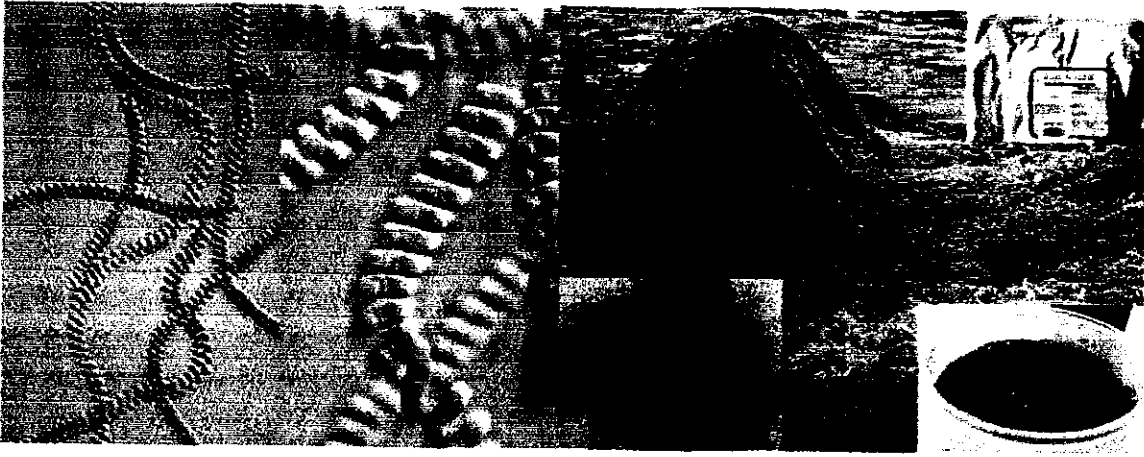
II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Arthrospira* (*Spirulina*)

Arthrospira (*Spirulina*) termasuk dalam phylum *Cyanobacteria*, diklasifikasikan sebagai *blue-green algae* atau *blue-green bacteria*. Spesies spirulina yang sering digunakan sebagai feed suplement adalah *Spirulina platensis* (juga disebut *Arthrospira platensis*) dan *Spirulina maxima*.

Spirulina merupakan sumber protein dengan kandungan antara 55-65%, selain itu juga mengandung Vitamin B-12, chlorophyll, carotenoids, minerals, gamma-linolenic acid (GLA) dan beberapa pigment, yaitu phycobilins, termasuk C-phycocyanin (C-PC), dan allophycocyanin (Reddy, *et al.* 2003 dan Li, *et al.* 2006). Kandungan protein yang tinggi tersebut berhubungan dengan kualitas asam amino, koefisien pencernaan serta nilai biologis. *Spirulina* mengandung asam-asam amino essential, antara lain: leucine (10.9% dari total asam amino), valine (7.5%) dan isoleucine (6.8%). *Spirulina platensis* mengandung karbohidrat sekitar 13.6%, antara lain: glucose, rhamnose, mannose, xylose and galactose (Shekharam, *et al.*, 1987). *Spirulina* tidak memiliki cellulose pada dinding selnya.

Kandungan lipid spirulina sekitar 4-7%, mengandung asam-asam lemak essential: linoleic acid (LA) ($C_{18:2}\Delta^{9,12}$) dan γ -linolenic acid ($C_{18:3}\Delta^{9,12,15}$) (GLA) (Othes and Pire, 2001). Keuntungan secara medis, nutrient ini dibutuhkan untuk sintesis arachidonic acid dan prostaglandin (Dubacq and Pham-Quoc, 1993). GLA merupakan low-density lipoprotein, 170 kali lebih efektif dibandingkan LA (Cohen, 1997).



Gambar 2.1. *Arthrospira* (*Spirulina*)

Studi ilmiah pada mice, hamsters, ayam, kalkun, kucing dan ikan, menunjukkan bahwa spirulina memiliki kemampuan untuk meningkatkan fungsi sistem immunitas serta dapat meningkatkan kemampuan tubuh untuk menghasilkan sel-sel darah baru. Bagian terpenting dari sistem immunitas, yaitu *Bone Marrow Stem Cells*, *Macrophages*, *T-cells*, *Natural Killer cells*, limpa dan kelenjar Thymus menunjukkan peningkatan aktivitas. Spirulina juga meningkatkan jumlah *macrophages* serta meningkatkan aktivitasnya (Richard and Ronald, 2007). Spirulina meningkatkan produksi dari sistem humoral (antibodi dan cytokines) maupun sistem immune cellular termasuk *T-cells*, *B-cells* *Macrophages*, dan anti-kanker *Natural Killer cells*. Sel-sel tersebut terdapat dalam sirkulasi dalam darah dan terutama kaya pada organ tubuh seperti hati, limpa, thymus, lymph nodes, adenoids, tonsils dan sumsum tulang serta berperan untuk mengatasi stress lingkungan, toksin serta agen infeksius (Qureshi and Ali, (1996), Qureshi *et al*, (1996)).

Spirulina mengandung *blue-polypeptida* yang disebut *Phycocyanin*. Studi menunjukkan bahwa *phycocianin* mempengaruhi stem cells pada sumsum tulang , merupakan induk sel darah putih yang membentuk sistem immune cellular dan sel-sel darah merah. Spirulina sebagai phytochemicals alami mengandung asam-asam amino essensial, kaya akan *chlorophyll*, *beta-carotene*. Spirulina juga kaya akan asam-asam lemak essensial GLA

(*gamma-linolenic acid*), yang menstimulasi pertumbuhan serta berperan sebagai anti inflamasi. Pemberian spirulina dapat menguntungkan dan meningkatkan flora intestinal, terutama *Lactobacillus* dan *Bifidus*, yang potensial dapat menurunkan permasalahan yang disebabkan oleh organisme patogen seperti *E. coli* dan *Candida albicans* (Richard and Ronald, 2007).

Tabel 2.1. Komposisi Nutrien *Spirulina Platensis*

| Nutrient | | | |
|---|----------|---------------------|----------|
| Protein | 55 - 70% | Fat (lipid) | 06 - 08% |
| Carbohydrates | 15 - 25% | Minerals | 07 - 13% |
| | | Crude fibres | 08 - 10% |
| Natural pigment phytonutrients per 10 gram | | | |
| Phycocyanin blue | 1400 mg. | Carotenoiden Orange | 37 mg. |
| Chlorophyl green | 100 mg. | | |
| Vitamins per 10 gram | | | |
| Vitamin A | 23000 IU | Inositol | 6,4 mg. |
| Beta caroten | 14 mg. | Thiamin B1 | 0,35 mg |
| Vitamin D | 1200 IU | Riboflavine B2 | 0,4 mg |
| Vitamin E | 1 mg. | Niacin B3 | 1,4 mg |
| Vitamin K | 200 µg | Pyridoxine B6 | 0,1 µg |
| Pantothenic acid | 10 µg | Folic acid | 1 µg |
| Biotin | 0,5 µg | Cobalamine B12 | 20 µg |
| Minerals per 10 gram | | | |
| Calcium | 70 mg | Copper | 120 µg |
| Iron | 15 mg | Mangan | 0,5 mg |
| Phosphor | 80 mg | Chrom | 25 µg |
| Magnesium | 40 mg. | Sodium | 90 mg |
| Zinc | 0,3 mg | Potassium | 140 mg |

| Natural carotenoiden per 10 gram. Pigments | | | |
|--|---------|---------------------|---------|
| Carotenoids | 25 mg. | Zeaxantin | 8 mg. |
| Beta caroten | 21 mg. | Cryptoxanthin | 1 mg |
| Xanthophylles | 22 mg | other Xanthophyllen | 3 mg. |
| Myxoxanthophyll | 9 mg | Echinenone | 1 mg |
| other caroteniden. | 4 mg | Total carotenoids | 47 mg. |
| Essential Amino acids per 10 gram | | | |
| Leucin | 540 mg | Threonin | 320 mg. |
| Valin | 400 mg | Phenylalanin | 280 mg. |
| Isoleucin | 350 mg | Methionin | 140 mg. |
| Lysin. | 290 mg | Tryptophan | 90 mg. |
| Non essential amino acids per 10 gram | | | |
| Glutaminic acid | 910 mg. | Glycin. | 320 mg |
| Aspartic acid | 610 mg. | Serin | 320 mg. |
| Alanin | 470 mg | Prolin | 270 mg. |
| Arginin. | 430 mg | Histidin. | 100 mg |
| Tyrosin | 300 mg | Cystin | 60 mg. |

(Sumber: Kiezebrink International)

2.2. Sistem Imunitas Mukosal Saluran Pencernaan Ayam

Mukosa hewan merupakan bagian dari organ yang kontak pertama kali dengan benda asing, termasuk antigen. Pada mukosa terbentuk suatu mekanisme untuk melawan antigen. Pada saluran cerna sistem imun mukosal disebut *gut associated lymphoid tissue* (GALT). GALT terdiri dari organ-organ maupun sel-sel imun yang banyak dijumpai pada *epithelial layer* dan *lamina propria*. Sel-sel imun yang ada pada GALT bersifat sebagai *inducer*.

immunoregulator dan *effector*. Pada ayam, GALT dan limpa merupakan organ utama untuk menginduksi terbentuknya respon imun (Shira and Frieman, 2005).

Antigen yang masuk melalui saluran pencernaan akan mengaktivasi sel Th dan sel B yang merupakan prekursor dari Ig A. Ig A banyak ditemukan di *payer patch's* dan akan bermigrasi ke *mucosal effector sites*, misal lamina propia intestine. Pada *mucosal effector sites* banyak dijumpai sel T dan sel B, serta sel plasma yang akan mensekresi Ig A. Struktur intraepithelial mukosa saluran cerna memungkinkan sekresi Ig A keluar dari sel menuju pembuluh darah atau jaringan yang lain (Lillehoj and Trout, 2008).

Khusus infeksi virus, sel yang terpapar virus akan mengeluarkan interferon yang dapat menstimulus sekresi senyawa lain pada sel-sel yang tidak terpapar. Senyawa tersebut disekresi dengan tujuan untuk menghambat proses replikasi virus dalam sel yang terpapar berikutnya. Hal ini merupakan salah satu mekanisme penghambatan proses infeksi oleh virus (Cummins *et al.*, 2005). Peneliti lain melaporkan bahwa pelepasan interferon akan memicu sel-sel yang tidak terinfeksi mensintesis “anti viral protein (AVP)” untuk menghalangi proses replikasi virus (Jensen *et al.*, 2001 dan Anonimus³, 2006).

2.3. Virus Avian Influenza

Avian Influenza (AI) merupakan penyakit zoonosis yang dapat menular ke manusia dan menyebabkan kematian. Sejauh ini, AI telah menyebar ke 15 negara dan menyebabkan jutaan burung dan ribuan manusia mati. *Mortality rate* yang disebabkan oleh AI sebesar $\pm 60\%$ (BBC News, 2008; Northoff, 2008).

AI disebabkan oleh virus RNA yang termasuk famili *Orthomyxoviridae* dan merupakan virus influenza tipe A. Pada unggas liar, infeksi virus AI tidak memperlihatkan tanda-tanda klinis, namun feses nya mengandung virus AI. Susanti dkk (2007) melaporkan bahwa unggas liar, khususnya unggas air mengandung banyak *viral sedding* dalam fecesnya.

Identifikasi dan klasifikasi virus AI sub tipe A berdasarkan tipe antigennya, yaitu hemaglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Ada 15 tipe HA dan 9 tipe NA yang telah teridentifikasi dari virus AI sub tipe A. Perbedaan kombinasi dari kedua antigen ini, tampaknya, yang menyebabkan adanya perbedaan kepekaan pada beberapa jenis unggas. Pada *waterfowl*, sebagai ilustrasi, virus AI yang menginfeksi mempunyai 14 antigen HA dan 9 NA, virus AI yang menginfeksi *shorebirds* dan *gulls* mengandung 10 HA dan 8 NA. Perbedaan kombinasi antigen mempengaruhi penyebaran virus AI. Virus AI yang menginfeksi *shorebirds* dan *gulls* lebih mudah menginfeksi *waterfowl* dibandingkan ayam. Pada dasarnya penyebaran virus AI dapat terjadi melalui mekanisme *fecal-oral routes of transmission* (Friend and Franson, 2007).

2.4. Konsumsi Pakan

Konsumsi pakan merupakan jumlah pakan yang dikonsumsi ternak atau kelompok ternak dalam periode waktu tertentu, biasanya dalam satuan waktu sehari, yaitu perhitungan dari jumlah pakan yang diberikan dikurangi pakan yang tersisa dan tercemar. Pengisian ransum pada bak makanan harus dilakukan dengan tepat, agar tidak banyak pakan yang tercecer. Pada pengisian bak makanan setengah penuh, maka makanan yang terbuang sekitar 2% (Samosir, 1983). Konsumsi pakan merupakan suatu parameter uji coba biologis untuk mengetahui apakah ransum yang telah disusun memenuhi syarat atau tidak. Penilaian konsumsi pakan dapat digunakan sebagai petunjuk untuk mengevaluasi respon pakan terhadap hasil produksi, serta petunjuk untuk menentukan penampilan ternak tersebut sehat atau tidak (Wahju, 1997).

Banyaknya pakan yang dapat dikonsumsi oleh ternak akan mempengaruhi produktivitas ternak, sedangkan untuk laju pertumbuhan juga tidak terlepas kaitannya dengan konsumsi

pakan. Kesempurnaan imbangannya gizi dalam konsumsi pakan sangat penting bagi pertumbuhan optimum (Soeharsono, 1977).

Banyak sedikitnya konsumsi pakan dipengaruhi beberapa faktor antara lain bentuk fisik pakan, imbangannya kandungan zat makanan dalam pakan, kualitas pakan, bobot badan ternak, tingkat produksi, kecepatan pertumbuhan, sistem pemeliharaan, keadaan lingkungan/suhu lingkungan, bangsa/jenis ternak, jenis kelamin, tingkat energi pakan (Srigandono, 1991).

Jumlah nutrisi yang berbeda pada pakan akan mempengaruhi tinggi rendahnya konsumsi pakan yang dapat mempengaruhi produktivitas telur yang dihasilkan (Soeparno, 1992). Kadar energi pakan sangat menentukan jumlah pakan yang dikonsumsi. Kadar energi yang tinggi menyebabkan jumlah pakan lebih sedikit, sedangkan jika kandungan energi pakan terlalu rendah, maka konsumsi akan ditingkatkan untuk memenuhi kebutuhannya (Parakkasi, 1983). Menurut Wahyu (1985) tingkat energi dalam pakan yang menentukan banyaknya pakan yang dikonsumsi. Ayam yang mengkonsumsi pakan lebih banyak belum tentu pertumbuhannya lebih baik karena pertumbuhan dipengaruhi oleh komposisi zat-zat makanan yang terkandung dalam ransum (Card dan Nesheim, 1972).

Faktor kesehatan bagi ternak sangat menentukan jumlah pakan yang dikonsumsi. Penyakit pada ternak secara langsung mempengaruhi fisiologi tubuh dan akan mengakibatkan stress atau cekaman sehingga nafsu makan cenderung menurun atau hilang (Hardjosworo dan Rukmiasih, 1995).

2.5. Konversi Pakan

Secara umum konversi pakan adalah jumlah ransum yang diberikan untuk menghasilkan produk dalam jumlah tertentu (Santoso, 1987). Semakin besar angka konversi pakan maka penggunaan pakan tersebut kurang ekonomis, sebaliknya jika angka konversi itu semakin

kecil berarti semakin ekonomis. Pakan menjadi tidak ekonomis bila nilai konversinya lebih dari dua (Sarlis dkk, 1976).

Angka konversi pakan tersebut merupakan salah satu kriteria seleksi dalam perbaikan mutu genetik ayam pedaging yang masih terus dilakukan. Hal ini disebabkan oleh tingginya biaya pakan yang dikonsumsi ayam untuk memperoleh berat badan tertentu (Abidin, 2002). Menurut Hardjosworo dan Rukmiasih (2000) nilai konversi pakan untuk jenis ayam broiler yang dipelihara dalam waktu lima sampai enam minggu berkisar antara 1,7 sampai 2,0. Davies (1982) berpendapat bahwa konversi pakan dapat dipengaruhi oleh bentuk fisik pakan, berat badan ayam, kandungan nutrisi dalam ransum, lingkungan pemeliharaan, stres dan jenis kelamin.

2.6. Limfosit

Limfosit adalah sel darah putih kecil yang bertanggung jawab untuk meningkatkan respon imun secara efektif terhadap antigen (Rantam, 2003). Limfosit merupakan sel utama pada sistem getah bening, memiliki ukuran yang relatif lebih kecil daripada makrofag dan neutrofil. Neutrofil memiliki umur tidak lebih dari 7-10 hari, tetapi limfosit bisa hidup selama bertahun-tahun bahkan sampai berpuluh-puluh tahun (Widyanto, 2008).

Presentase limfosit pada darah perifer tergantung pada spesiesnya. Pada anjing, kucing dan kuda, antara 20 sampai 40%; pada ruminansia antara 60 sampai 70%; dan pada babi antara 50 sampai 60%. Pada sediaan ulas dan diwarnai dapat dibedakan adanya limfosit besar dan kecil. Limfosit besar adalah bentuk belum dewasa, dan sering disebut *prolimfosit* (*prolymphocytes*) atau sel "blas" besar.

Limfosit menunjukkan ketidaksamaan dalam bentuk maupun fungsinya, karena sifatnya yang plastik dan mampu bergerak serta dapat mengubah bentuk dan ukurannya. Sifat limfosit

mampu menerobos jaringan atau tubuh lunak, karena menyediakan zat kebal untuk bertahan tubuh. Limfosit kecil berdiameter 6 sampai 9 μm , inti besar dan kuat mengambil zat warna, dikitari sedikit sitoplasma yang berwarna biru pucat. Lazimnya inti memiliki sedikit lekuk pada satu sisi. Pada sediaan ulas, inti begitu gelap sehingga nukleus tidak tampak; tetapi dengan mikroskop elektron, nukleus tampak. Sitoplasma yang sedikit mengandung banyak poliribosom dan sedikit mitokondria. Bila butir azurofil ada, lazimnya tampak didaerah lekuk ini.

Limfosit besar, berdiameter 12 sampai 15 μm , memiliki lebih banyak sitoplasma, dan inti lebih besar dan sedikit pucat dibandingkan dengan ukuran kecil. Butir azurofil tampak di daerah lekuk inti dan pengujian dengan mikroskop elektron menunjukkan sepasang sentriol yang dikitari dengan aparatus golgi. Limfosit besar memiliki aparatus golgi lebih jelas, nukleus serta mitokondria lebih besar, dan poliribosom lebih banyak dari limfosit kecil. Gambaran ini menunjukkan peningkatan aktivitas sintesis dan sekresi, sesuai dengan sel tipe "blas" (Dellman, 1988).

Limfosit dibagi ke dalam 3 kelompok utama: 1. Limfosit B berasal dari sel stem di dalam sumsum tulang dan tumbuh menjadi sel plasma, yang menghasilkan antibodi. 2. Limfosit T terbentuk jika sel stem dari sumsum tulang pindah ke kelenjar thymus, dimana mereka mengalami pembelahan dan pematangan. Di dalam kelenjar thymus, limfosit T belajar membedakan mana benda asing dan mana bukan benda asing. Limfosit T dewasa meninggalkan kelenjar thymus dan masuk ke dalam pembuluh getah bening dan berfungsi sebagai bagian dari sistem pengawasan kekebalan. 3. Sel-sel pemusnah alami, memiliki ukuran yang agak lebih besar daripada limfosit T dan B, dinamai sel pemusnah karena sel-sel ini membunuh mikroba dan sel-sel kanker tertentu.

Istilah alami digunakan karena mereka siap membunuh sejumlah sel target segera setelah mereka terbentuk, tidak perlu melewati pematangan dan proses belajar seperti pada limfosit T dan limfosit B. Sel pembunuh alami juga menghasilkan beberapa sitokinesis (zat-zat pembawa pesan yang mengatur sebagian fungsi limfosit T, limfosit B dan makrofag).

Jika dirangsang oleh suatu antigen, limfosit B akan mengalami pematangan menjadi sel-sel yang menghasilkan antibodi. Antibodi merupakan protein yang bereaksi dengan antigen yang sebelumnya merangsang limfosit B. Antibodi juga disebut immunoglobulin. Setiap molekul antibodi memiliki suatu bagian yang unik, yang terikat kepada suatu antigen khusus dan suatu bagian yang strukturnya menerangkan kelompok antibodi.

Terdapat 5 kelompok antibodi yaitu IgM, IgG, IgA, IgE, dan IgD. IgM adalah antibodi yang dihasilkan pada pemaparan awal oleh suatu antigen. Contohnya, jika seorang anak menerima vaksinasi tetanus I, maka 10-14 hari kemudian akan terbentuk antibodi antitetanus IgM (respon antibodi primer). IgM banyak terdapat di dalam darah tetapi dalam keadaan normal tidak ditemukan di dalam organ maupun jaringan. IgG merupakan jenis antibodi yang paling umum, yang dihasilkan pada pemaparan antigen berikutnya. Contohnya, setelah mendapatkan suntikan tetanus II (booster), maka 5-7 hari kemudian seorang anak akan membentuk antibodi IgG. Respon antibodi sekunder ini lebih cepat dan lebih berlimpah dibandingkan dengan respon antibodi primer. IgG ditemukan di dalam darah dan jaringan. IgG merupakan satu-satunya antibodi yang dipindahkan melalui plasenta dari ibu ke janin di dalam kandungannya. IgG ibu melindungi janin dan bayi baru lahir sampai sistem kekebalan bayi bisa menghasilkan antibodi sendiri. IgA adalah antibodi yang memegang peranan penting pada pertahanan tubuh terhadap masuknya mikroorganisme melalui permukaan yang dilapisi selaput lendir, yaitu hidung, mata, paru-paru dan usus. IgA ditemukan di dalam darah dan cairan tubuh (pada saluran pencernaan, hidung, mata, paru-paru, ASI). IgE adalah

antibodi yang menyebabkan reaksi alergi akut (reaksi alergi segera). IgE penting dalam melawan infeksi parasit (misalnya river blindness dan skistosomiasis), yang banyak ditemukan di negara berkembang. IgD adalah antibodi yang terdapat dalam jumlah yang sangat sedikit di dalam darah. Fungsinya belum sepenuhnya dimengerti. (Widyanto, 2008).

2.7. Interferon Alpha

Interferon adalah asam amino dengan aktivitas antiviral tidak khusus. Berat molekul interferon bervariasi menurut cara yang dipakai untuk merangsang pembentukannya dan umumnya terletak antara 20.000 dan 34.000 dalton (Tizard, 1987). Interferon memiliki beberapa efek yaitu sebagai antiviral dan antionkogenik, mengaktifasi makrofag dan sel *natural killer* (sel NK), meningkatkan kompleks glikoprotein kelas I dan II, serta mempresentasikan peptida asing (antigen) kepada sel T (Wikipedia, 2006). Sel yang terinfeksi oleh virus akan segera melepaskan interferon dan member pengaruh antivirus pada sel-sel yang belum terinfeksi dengan cara bereaksi dengan sel tersebut serta merangsang pembentukan protein kedua yang disebut protein antivirus (Fenner *et al.*, 1993; Bellanti, 1993).

Terdapat 3 macam interferon yaitu *interferon- α* (IFN- α), *interferon- β* (IFN- β) dan *interferon- γ* (IFN- γ). IFN- α dan IFN- β berperan dalam imunitas nonspesifik dini pada infeksi virus. IFN- γ merupakan sitokin utama *Macrophage Activating Cytokines* dan berperan terutama dalam imunitas non spesifik dan spesifik selular, serta pengatur imun seperti penambahan produksi dan aktivasi sel NK (Baratawidjaja, 2006; Bellanti, 1993). IFN- γ diproduksi oleh sel T (sel T sitotoksik dan Th), berperan merangsang MHC-I dan MHC-II dan kostimulator APC. IFN- γ meningkatkan deferensiasi sel CD4+ ke subset sel Th1 dan mencegah proliferasi sel Th2. IFN- γ merangsang makrofag untuk lebih bersifat fagosit,



dimana makrofag mampu membunuh antigen intraseluler dan menyajikan antigen tersebut (Baratawidjaja, 2006; Halifax, 2005).

III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan umum

Menjelaskan mekanisme kerja crude spirulina sebagai *feed immunomodulatory* untuk meningkatkan performan pertumbuhan dan sistem immunitas pada ayam yang divaksin avian influenza

3.2. Tujuan khusus

1. Membuktikan adanya peningkatan *feed conversion ratio*, *feed efficiency ratio*, *protein efficiency ratio*, dan konsumsi pakan karena pemberian crude Spirulina.
2. Membuktikan adanya peningkatan Ig A, interferon α , limfosit, karena pemberian crude Spirulina.

3.3. KEUTAMAAN RENCANA PENELITIAN

Infeksi alam atau imunisasi, baik aktif maupun pasif, selalu berkorelasi terhadap terbentuknya respon imun. Adanya virus AI dalam tubuh dikenali oleh *antigen presenting cell* (APC) yang akan berdampak pada sekresi interleukin-12 (IL-12). IL-12, selanjutnya, digunakan untuk proses pematangan sel T *helper-1* (Th 1). Aktivasi sel Th1 berdampak pada sekresi interferon gamma (IFN- γ) dan IL-2. Sekresi IL-2 berdampak pada peningkatan proliferasi sel T *cytotoxic* (Tc). Sementara itu, sel Th 2 akan mensekresi IL-4 dan IL-5 yang digunakan untuk menggertak sel B mensekresi antibodi. Antibodi yang dihasilkan akan melakukan proses netralisasi virus dengan cara mengikat virus bebas (Tamura and Kurata, 2004).

Respon imun yang terbentuk diperkuat oleh suatu senyawa yang disebut *toll-like receptor* (TLR). Inisiasi kaskade sinyal diperlukan untuk proses pembentukan respon imun. Pada infeksi virus, TLR-2 dan TLR-4 diperlukan untuk mengaktivasi sel limfosit Th 1, Th 2 maupun T regulasi (Treg) (Iwasaki dan Medzhitov, 2004). Saito (2004) melaporkan ligan virus – TLR2 dan virus – TLR4 menginduksi proses transkripsi dan translasi dari beberapa sitokin proinflamasi melalui kaskade sinyal biomolekuler.

Penyebaran virus AI sementara ini dilakukan dengan melakukan program vaksinasi, namun kenyataan di lapangan tindakan ini belum memberikan hasil yang optimal (FKH Unair, 2006). Pada bangsa unggas, penularan virus AI antar unggas dapat terjadi melalui saluran pencernaan. Terkait dengan hal ini, respon imun mukosal pada permukaan saluran pencernaan mempunyai peranan penting untuk mencegah terjadinya infeksi virus AI. Untuk itu perlu dicari alternatif pendukung dalam rangka mencegah penyebaran virus AI, satu diantaranya adalah dengan memberikan bahan pakan suplementasi yang bersifat *feed immunomodulatory*.

IV. METODE PENELITIAN

4.1. Bahan dan Alat

Bahan kimia dan alat yang digunakan untuk analisis proksimat protein kasar :

Bahan: Tablet Kjeldhal, H₂SO₄ pekat, NaOH 40 %, Asam Borat, indikator Metil-merah, Brom cresol green, H₂SO₄ 0,01 N dan aquadest. Alat yang digunakan : Labu Kjeldhal 100 cc, pemanas labu Kjeldhal, spatula, timbangan elektrik Sartorius, gelas ukur, labu ukur 250 cc, erlenmeyer 100 cc dan 1000 cc, serta seperangkat alat Marcam Steel.

Bahan kimia dan alat yang digunakan untuk analisis proksimat serat kasar :

Bahan : H₂SO₄ 0,3 N, NaOH 1,5 N, HCl 0,3 N, Aceton dan H₂O panas. Alat yang digunakan : Erlenmeyer 300 cc, erlenmeyer penghisap, corong Buchner, spatula, cawan porselen, gelas ukur, corong, timbangan analitik, oven, penangas air dan kompressor.

Alat yang digunakan untuk analisis proksimat bahan kering :

Cawan porselen (aluminium), cruss tang, timbangan analitik, oven, exicator yang berisi *silica gel*.

Bahan-bahan yang digunakan untuk pemeriksaan Elisa Ig A dan IFN- α) dalam penelitian ini antara lain: *Chicken Interferon Alpha (IFN- α)* Elisa Kit Catalog No. CSB-E10071Ch (96T) Cusabio, *Chicken Immunoglobulin A (Ig A)* Elisa Kit Catalog No. CSB-E11232Ch (96T) Cusabio, ayam petelur. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:, centrifuge, Elisa Reader, micropipete, Washer, Aqua steril, Blue tip, yellow tip, Eppendorf.

Alat-alat yang digunakan: timbangan digital, spuit, baskom, kantung plastik, Penelitian ini menggunakan ruangan berukuran 4 x 3 meter yang dilengkapi lampu neon berdaya 40 Watt., di dalamnya dibuat kandang baterai dari besi, bertingkat dengan ketinggian kurang lebih 50 cm dari permukaan lantai dan berukuran 50 x 30 cm untuk satu ekor hewan coba. Dasar kandang ayam dilapisi hard plek (esbes), kemudian bagian atasnya dilapisi kertas koran. Kandang tersebut dilengkapi dengan tempat pakan dan minum tersendiri yang terbuat dari plastik.

4.2. Hewan Coba

Ayam petelur *Gallus sp* strain Isa Brown, umur 15 minggu yang berasal dari kabupaten blitar dengan berat rata-rata 1,7 kg, sebanyak 36 ekor digunakan sebagai hewan coba dan terbagi secara acak ke dalam 4 perlakuan. Setiap perlakuan ada 9 ekor hewan coba yang bertindak sebagai ulangan. Penempatan dan penentuan perlakuan yang diterima oleh setiap hewan coba dilakukan dengan metode acak menggunakan "tabel bilangan acak".

Ayam yang baru datang diberi air gula, kemudian dipelihara untuk adaptasi selama satu minggu. Pada hari ke delapan hingga akhir penelitian, hewan coba diberi perlakuan. Pemberian pakan dan minum secara *ad libitum*. Tindakan vaksinasi menggunakan vaksin *Avian Influenza* inaktif tipe H5N1 dilakukan pada minggu pertama setelah perlakuan pakan, kemudian dilakukan booster pada minggu ketiga. Dosis penyuntikan yaitu 0,5 ml/ekor ayam dan disuntikan secara *sub cutaneous* (per-sc). Pengujian titer antibodi dilakukan pada saat 2 minggu setelah vaksinasi pertama dan 2-3 minggu setelah vaksinasi booster.

Pakan

Pakan yang diberikan berupa Bekatul 20%, bungkil jagung 50%, bungkil kedelai 10%, tepung ikan 10%, pollard 5%, methionin 0,4%, lysin 0,6%, vitamin 2%, mineral 2%, DCP 1%, dan minyak 2%. Pemberian air minum pada ayam petelur secara ad libitum.

Spirulina yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis *Spirulina platensis* dalam bentuk serbuk kering yang diperoleh dari kabupaten Situbondo Jawa timur. Perlakuan spirulina akan diberikan dalam persentase 0%, 0.5%, 1.0%, 1.5%.

Pemberian pakan dilakukan sebanyak 2 kali sehari dengan sebelumnya menimbang jumlah pakan yang diberikan. Sisa pakan yang tercecer dihitung pula setiap hari.

Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan untuk fumigasi kandang adalah $KMnO_4$ dan formalin dengan perbandingan 2:1, Lysol untuk desinfektan

4.3. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk penelitian *true experimental*. Rancangan yang digunakan pada penelitian adalah rancangan acak lengkap dengan 4 perlakuan dan 9 ulangan. Perlakuan pertama adalah tanpa pemberian crude Spirulina, dan bertindak sebagai kontrol (P0). P1, P2 dan P3 adalah hewan coba yang diberi crude Spirulina dalam pakannya dengan dosis 0%, 0.5, 1.0% dan 1.5%. Hewan coba masing-masing divaksinasi avian influenza strain H5N1 setelah diberi crude Spirulina.

4.4. Varibel Penelitian

Variabel dependent pada penelitian ini adalah (1) *feed conversion ratio*, (2) *feed efficiency ratio*, (3) *protein efficiency ratio*, (4) konsumsi pakan, (5) limfosit, (6) Ig A, (7) interferon α . Variabel independent adalah (1) pemberian crude Spirulina [(-)/(+)]. Umur, strain DOC ayam petelur yang digunakan pada penelitian ini bertindak sebagai variabel kendali.

Variabel:

Feed Conversion Ratio (FCR), *Feed Efficiency Ratio* (FER), *Protein Efficiency Ratio* (PER), konsumsi pakan, limfosit, interferon alpha, Ig A.

Untuk mengetahui jumlah konsumsi pakan pada ayam petelur perlakuan, dilakukan pengukuran setiap minggu mulai masa perlakuan sampai akhir masa perlakuan berdasarkan penjumlahan konsumsi pakan harian (pakan yang diberikan setiap hari secara *ad libitum* dikurangi dengan pakan yang tersisa selama 24 jam. Hasil selisih tersebut merupakan jumlah pakan yang dikonsumsi setiap hari).

Untuk mengetahui pertambahan berat badan ayam percobaan dapat dilakukan dengan menghitung jumlah pertambahan berat badan pada akhir penelitian.

Penghitungan FCR, FER dan PER digunakan rumus sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{Feed Conversion Ratio (FCR)} &= \frac{\text{Total Konsumsi Pakan (g)}}{\text{Total Pertambahan berat badan (g)}} \\ \text{Feed Efficiency Ratio (FER)} &= \frac{\text{Pertambahan Berat Badan (g)}}{\text{Pakan yang diberikan (g)}} \times 100 \\ \text{Protein Efficiency Ratio (PER)} &= \frac{\text{Pertambahan Berat Badan (g)}}{\text{Jumlah protein yang dikonsumsi (g)}} \\ \text{Konsumsi Pakan (g)} &= \text{Pakan yang diberikan (g)} - \text{Pakan sisa (g)} \end{aligned}$$

$$\text{Konversi Pakan} = \frac{\text{Konsumsi Pakan (g)}}{\text{Pertambahan BB (g)}}$$
$$\text{Pertambahan Berat Badan (PBB)} = \text{BB akhir} - \text{BB awal}$$

4.5. Analisis Data

Data yang diperoleh pada masing-masing variabel diuji secara statistik dengan uji Anova Faktorial. Jika terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$), uji statistik dilanjutkan dengan uji Duncan (Singgih, 2002). Analisis data pada penelitian ini menggunakan fasilitas program *SPSS (17)*

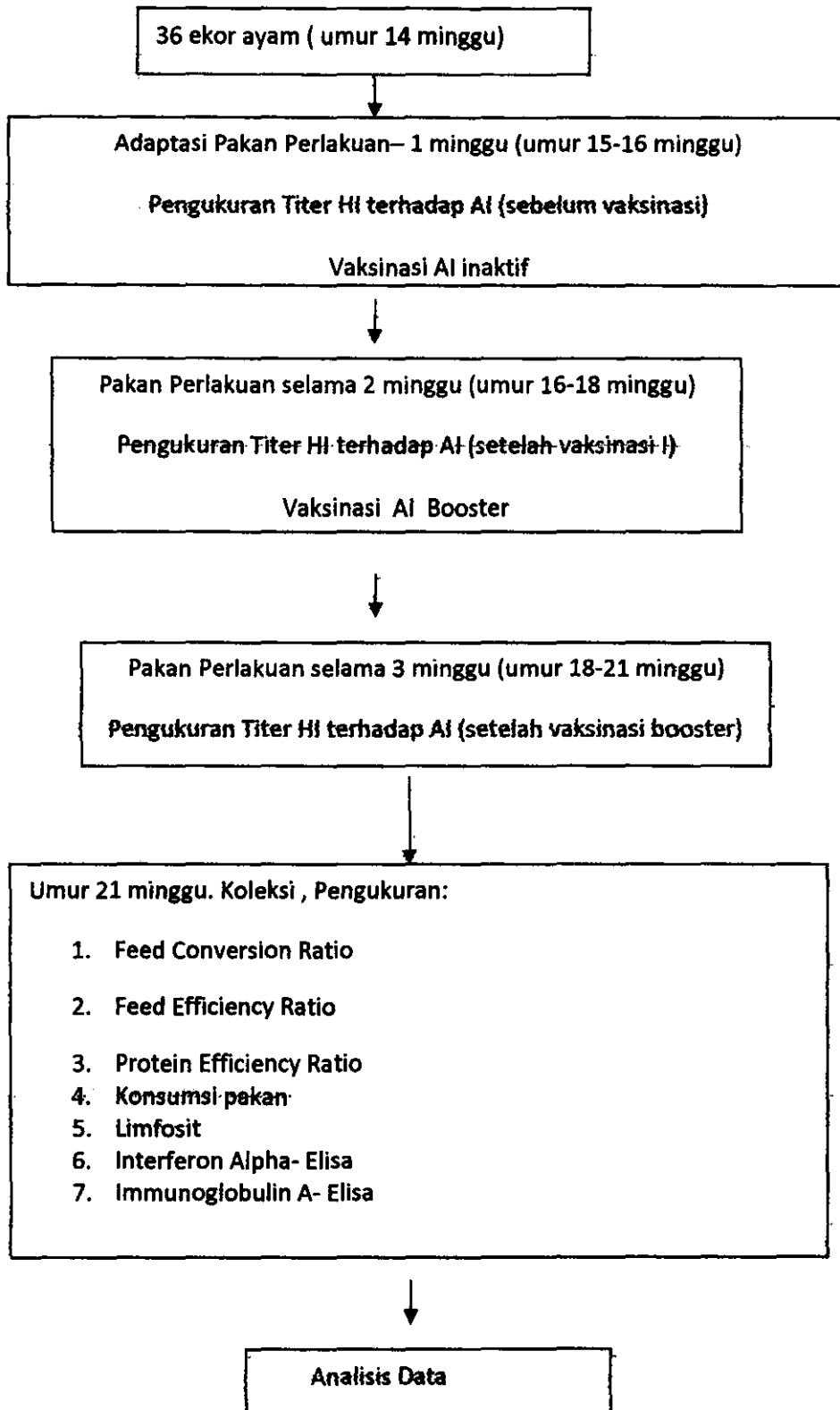
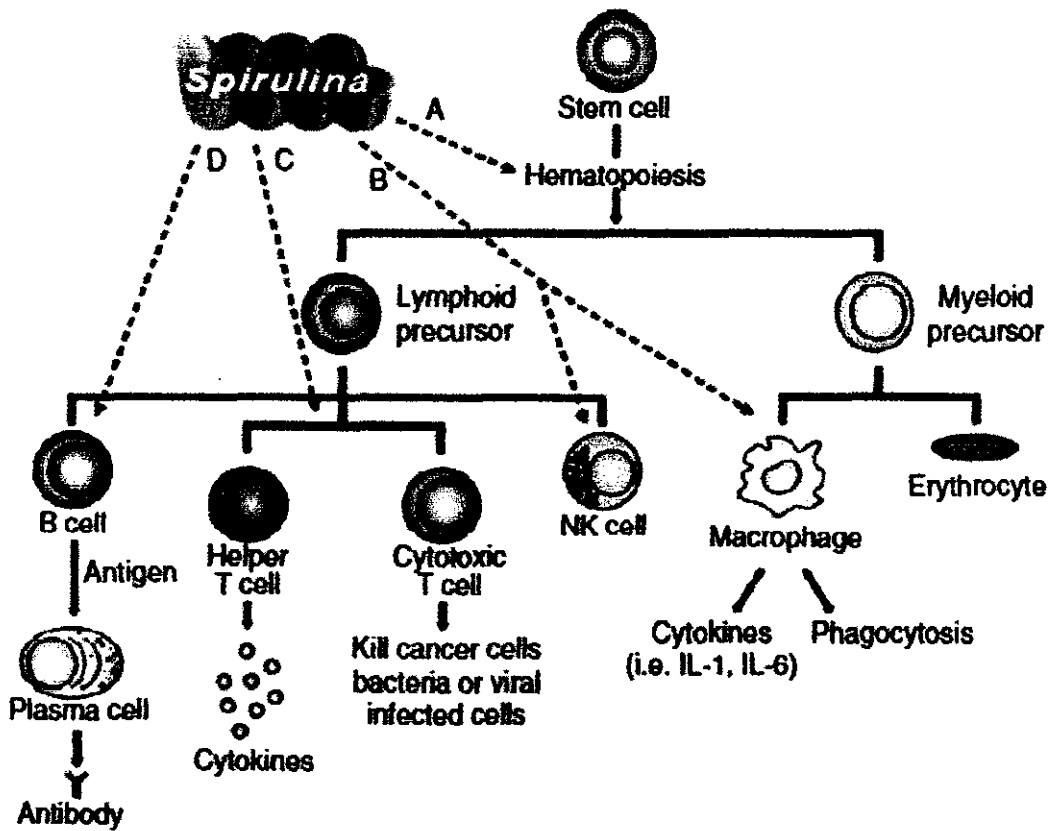


Diagram Alir Penelitian

Diagram Alir Kerangka Konseptual Penelitian



- A. *Spirulina* enhances hematopoiesis to produce more erythrocytes and lymphocytes
- B. *Spirulina* shows direct effect on innate immunity by activating macrophages and NK cells
- C. *Spirulina* activates T-helper cells and T-cytotoxic cells
- D. *Spirulina* induces the maturity of B-cells for the production of antibodies

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Feed Conversion Ratio

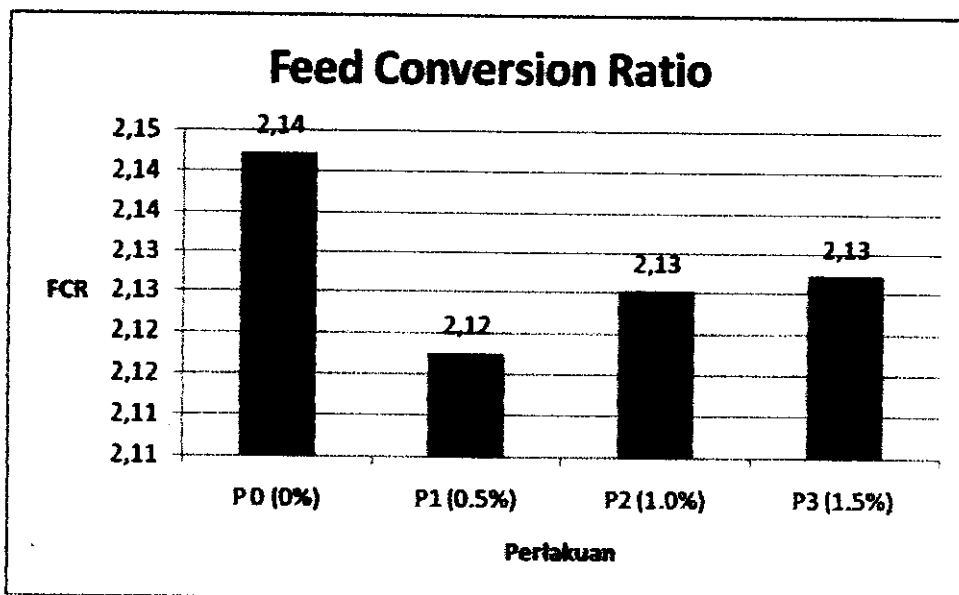
Tabel dibawah ini menunjukkan rerata *Feed Conversion Ratio* pada ayam percobaan

Tabel 5.1. Rerata *Feed Conversion Ratio*

| Perlakuan | Rerata <i>Feed Conversion Ratio</i> |
|----------------|-------------------------------------|
| P ₀ | 2,14 ^a |
| P ₁ | 2,12 ^a |
| P ₂ | 2,13 ^a |
| P ₃ | 2,13 ^a |

Keterangan: Superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0.05$)

Hasil analisis statistik menggunakan ANAVA dengan uji F terhadap *Feed Conversion Ratio* pada ayam petelur menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0.05$) di antara perlakuan. Rerata nilai *Feed Conversion Ratio* menunjukkan bahwa nilai terendah terletak pada perlakuan P₀ yang tidak berbeda dengan perlakuan P₁, P₂ dan P₃.



Gambar 5.1. Grafik *Feed Conversion Ratio*

Penggunaan Spirulina sebagai salah satu bahan *feed additive* dalam formulasi ransum perlakuan pada ayam petelur bertujuan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap pertambahan berat badan, konsumsi pakan dan konversi pakan. Selanjutnya untuk mengetahui efek perlakuan terhadap pertambahan berat badan dilakukan penimbangan berat badan ayam setiap minggunya, sedangkan untuk mengetahui efek perlakuan terhadap konsumsi pakan yaitu dengan menghitung selisih antara pakan yang dikonsumsi dan pakan sisa maupun tercemar setiap hari. Efek perlakuan terhadap konversi pakan dapat diketahui dari pembagian antara konsumsi pakan dengan pertambahan berat badan selama masa perlakuan.

Konversi pakan yang tinggi disebabkan adanya pertambahan berat badan yang dihasilkan pada perlakuan sangat rendah, sedangkan konsumsi pakannya tinggi. Pemanfaatan unsur-unsur nutrisi pakan yang kurang efisien dapat meningkatkan nilai konversi pakan (Rasyaf, 1992). Hal ini akan menimbulkan kerugian, karena ayam mengkonsumsi pakan yang banyak tetapi tidak menghasilkan pertambahan berat badan yang optimal dan ini akan semakin membebani biaya produksi pakan.

Nilai konversi pakan yang rendah disebabkan perlakuan-perlakuan tersebut menghasilkan pertambahan berat badan yang optimal dengan konsumsi pakan yang cukup tinggi. Hal ini dapat disebabkan kandungan gizi dalam ransum sudah seimbang sehingga dapat meningkatkan pertambahan berat badan dengan konsumsi pakan yang cukup baik, sehingga akan mempengaruhi konversi pakan, dan hal ini menguntungkan bagi peternakan. Dapat dilihat bahwa kemampuan ternak dalam mengubah pakan yang dikonsumsi menjadi daging cukup tinggi.

Konversi pakan dapat digunakan untuk menduga keuntungan. Semakin rendah konversi pakan, maka hasil yang diperoleh akan semakin menguntungkan. Rasyaf (1992)

menyatakan bahwa pada unggas pedaging yang terpenting adalah bagaimana unggas pedaging itu mampu mengubah ransum yang dimakan menjadi daging seefisien mungkin, artinya dengan ransum yang sedikit atau sesuai dengan kebutuhan nutrisinya, akan diperoleh pertambahan daging yang besar. Perhitungan konversi pakan dimaksudkan untuk mengetahui kemampuan ayam yang diteliti dalam mengubah pakan yang dikonsumsi menjadi daging, selain itu juga untuk melihat respon ternak terhadap kualitas pakan yang diberikan.

Formula pakan perlakuan mengandung *Spirulina* dengan kandungan protein 58% dengan kandungan asam amino yang cukup seimbang. Penambahan *Spirulina* 0.5%, 1%, dan 1.5% dalam formula ransum perlakuan memberikan nilai peningkatan kandungan protein pakan. Pada umumnya, kekurangan protein nabati dalam tumbuhan disebabkan protein ini biasanya terikat dengan senyawa lain seperti lignoselulosa yang sulit dicerna atau senyawa toksik seperti tanin, yang akan menurunkan nilai pencernaan protein tersebut. Pada *Spirulina*, dinding selnya terbuat dari senyawa mukoprotein dan bukan dari lignoselulosa. Pada ganggang ini juga tidak dijumpai senyawa lainnya yang menyulitkan pencernaan (Angka dan Suhartono 2000).

5.2. Feed Efficiency Ratio

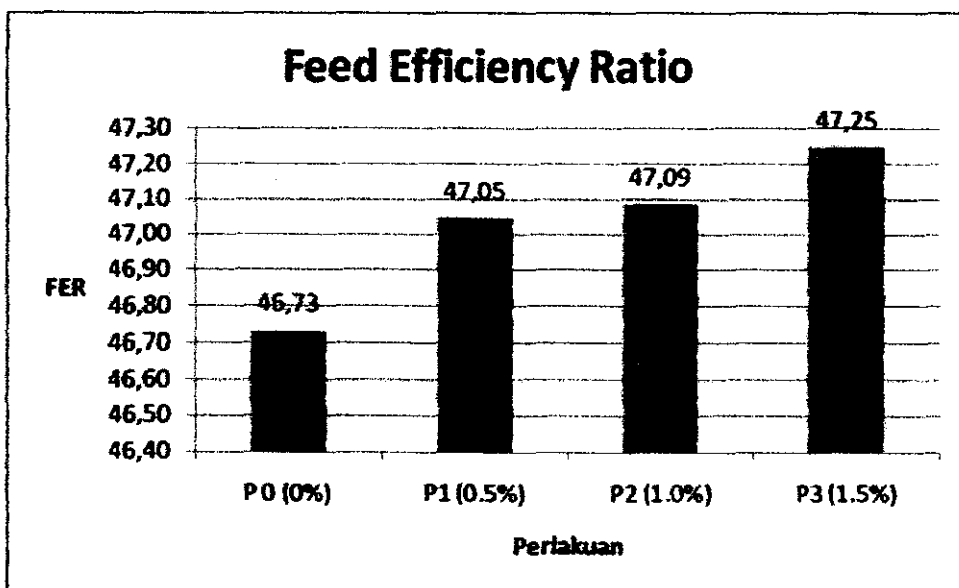
Tabel dibawah ini menunjukkan rerata *Feed Efficiency Ratio* pada ayam percobaan

Tabel 5.2. Rerata *Feed Efficiency Ratio*

| Perlakuan | Rerata <i>Feed Efficiency Ratio</i> |
|----------------|-------------------------------------|
| P ₀ | 46,73 ^a |
| P ₁ | 47,05 ^a |
| P ₂ | 47,09 ^a |
| P ₃ | 47,25 ^a |

Keterangan: Superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0.05$)

Hasil analisis statistik menggunakan ANAVA dengan uji F terhadap nilai *feed efficiency ratio* pada ayam petelur menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0.05$) di antara perlakuan. Rerata nilai *feed efficiency ratio* menunjukkan bahwa nilai terendah terletak pada perlakuan P₀, yang tidak berbeda dengan perlakuan P₁, P₂ dan P₃



Gambar 5.2. Grafik *Feed Efficiency Ratio*

5.3. Protein Efficiency Ratio

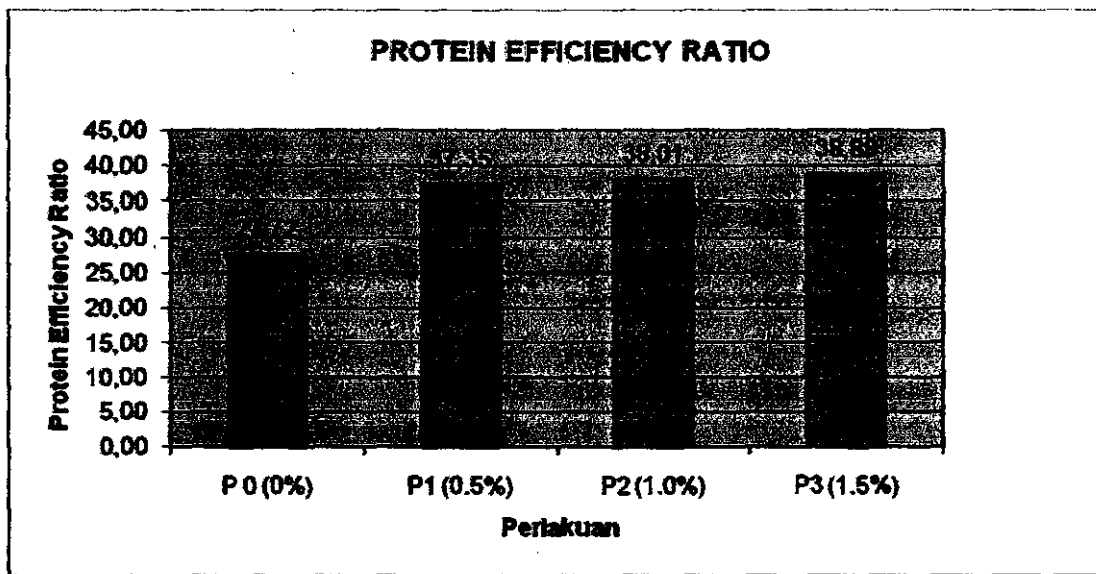
Tabel dibawah ini menunjukkan rerata *Protein Efficiency Ratio* pada ayam percobaan

Tabel 5.3. Rerata *Protein Efficiency Ratio*

| Perlakuan | Rerata <i>Protein Efficiency Ratio</i> |
|----------------|--|
| P ₀ | 27,72 ^a |
| P ₁ | 37,35 ^b |
| P ₂ | 38,01 ^b |
| P ₃ | 38,89 ^b |

Keterangan: Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ($P < 0.05$).

Hasil analisis statistik menggunakan ANAVA dengan uji F terhadap nilai *protein efficiency ratio* pada ayam petelur menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0.05$) di antara perlakuan. Rerata nilai *protein efficiency ratio* menunjukkan bahwa nilai terendah terletak pada perlakuan P₀, yang berbeda nyata dengan perlakuan P₁, P₂ dan P₃



Gambar 5.3. Grafik *Protein Efficiency Ratio*

5.4. Konsumsi Pakan

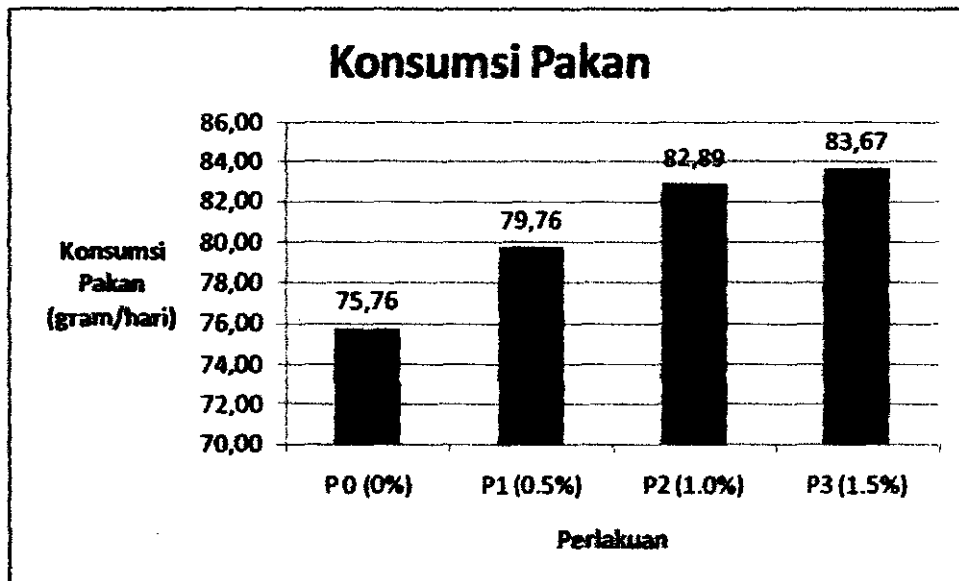
Tabel dibawah ini menunjukkan nilai konsumsi pakan pada ayam percobaan

Tabel 5.4. Rerata Konsumsi Pakan

| Perlakuan | Rerata Konsumsi pakan (gram/hari) |
|----------------|-----------------------------------|
| P ₀ | 75,76 ^a |
| P ₁ | 79,76 ^a |
| P ₂ | 82,89 ^a |
| P ₃ | 83,67 ^a |

Keterangan: Superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0.05$)

Hasil analisis statistik menggunakan ANAVA dengan uji F terhadap nilai konsumsi pakan pada ayam petelur menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0.05$) di antara perlakuan. Rerata nilai konsumsi pakan menunjukkan bahwa nilai terendah terletak pada perlakuan P₀, yang tidak berbeda dengan perlakuan P₁, P₂ dan P₃



Gambar 5.3. Grafik Konsumsi Pakan

5.5. Limfosit

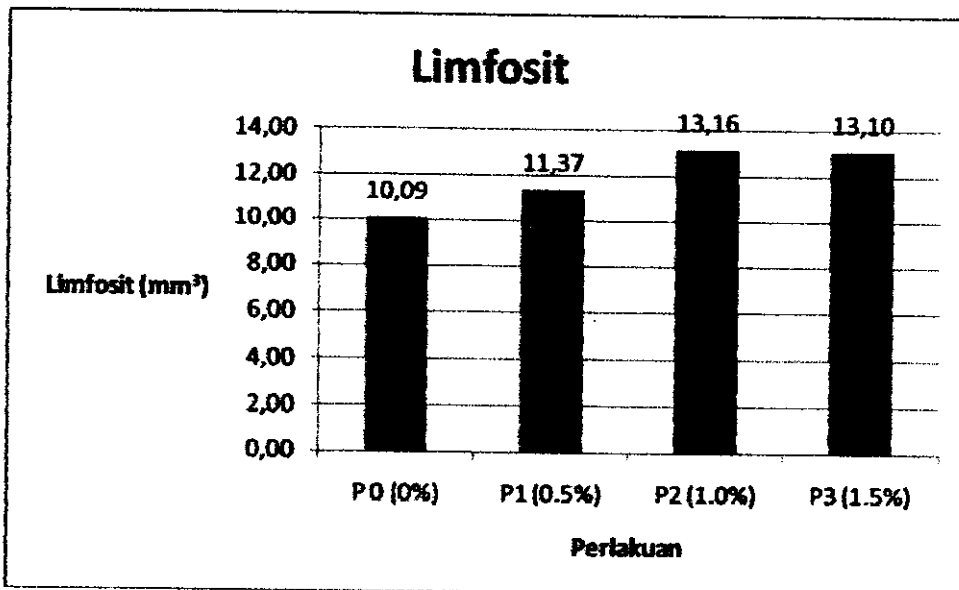
Hasil yang diperoleh dari penelitian tentang jumlah limfosit dalam darah ayam petelur tercantum dalam tabel 5.5.

Tabel 5.5. Rerata Limfosit

| Perlakuan | Rerata Limfosit |
|----------------|--------------------|
| P ₀ | 10,09 ^a |
| P ₁ | 11,37 ^a |
| P ₂ | 13,16 ^b |
| P ₃ | 13,10 ^b |

Keterangan: Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ($P < 0.05$)

Hasil analisis statistik menggunakan ANAVA dengan uji F terhadap jumlah limfosit pada ayam petelur menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0.05$) di antara perlakuan. Rerata jumlah limfosit menunjukkan bahwa nilai terendah terletak pada perlakuan P₀ yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan P₁, namun berbeda dengan perlakuan P₂ dan P₃. Jumlah limfosit tertinggi terletak pada perlakuan P₂ dan P₃.



Gambar 5.5. Grafik Jumlah Limfosit

Formula pakan perlakuan mengandung Spirulina yang berperan sebagai imunomodulator. Mekanisme Spirulina diantaranya meningkatkan produksi dari sistem humoral (antibodi dan cytokines) maupun sistem immune cellular termasuk T-cells, B-cells Macrophages. Sel-sel tersebut terdapat dalam sirkulasi dalam darah dan terutama kaya pada organ tubuh seperti hati, limpa, thymus, lymph nodes, adenoids, tonsils dan sumsum tulang serta berperanan untuk mengatasi stress lingkungan, toksin serta agen infeksius (Qureshi and Ali, (1996), Qureshi *et al*, (1996)). Komponen yang berperan antara lain dinding sel dan beta karoten yang berfungsi untuk merangsang aktifitas kekebalan tubuh yaitu makrofag yang akan merangsang interleukin I dan interleukin II untuk merangsang limfosit B membentuk antibodi.

Spirulina mengandung asam amino essensial maupun non essensial, diantaranya adalah Arginin (kandungan dalam Spirulina 430 mg per 10 gram). Asam amino non-esensial, berarti dapat dibentuk oleh tubuh, dan tidak perlu diperoleh secara langsung dari sumber diet. Namun demikian arginin dibentuk dalam jumlah terbatas, sehingga kadang-kadang masih dibutuhkan dari sumber diet. Peranan arginin yang sangat penting adalah dalam hal meningkatkan imunitas selular. Arginin memberikan dampak yang positif terhadap sistem imunitas tubuh (Brittenden, 1994). Pada studi-studi terdahulu pada binatang percobaan, pemberian arginin akan meningkatkan kemampuan fagositosis dari sel-sel makrofag di dalam alveolus, memberikan balans nitrogen yang positif, dan menekan pertumbuhan sel tumor dengan mengaktifkan sistem imun (Tachibana, 1985). Selanjutnya menurut Keith et al (1997), sel target dari zat nutrien ini adalah sel limfosit T dan makrofag.

Perlakuan P₂ dan P₃ menunjukkan jumlah limfosit tertinggi yang berbeda dengan semua perlakuan. Hal ini dapat disebabkan karena adanya komponen penting yang ditemukan sepanjang fraksi gula, dalam bentuk rantai panjang polisakarida dan berfungsi sebagai imunomodulator yang memiliki kemampuan untuk meningkatkan atau menurunkan respon

immun. Fraksi gula dalam bentuk rantai panjang polisakarida ini memiliki peran dalam peningkatan jumlah limfosit.

Sebuah penelitian yang dilakukan oleh Leung dkk (2003) menyebutkan bahwa residu gula terbesar dalam fraksi polisakarida adalah manosa. Fraksi polisakarida menstimulasi makrofag peritoneal, proliferasi sel T dan sel B, serta mengaktifkan sel-sel tersebut untuk mensekresi TNF- α (*tumor necrosis factor α*), IL-1 β (*interleukin -1 β*), IFN γ (*interferon γ*), IL-2 (*interleukin -2*) dan IL-6 (*interleukin -6*). Fraksi polisakarida cukup berpotensi untuk menstimulasi sel B dan memiliki sedikit potensi dalam menstimulasi proliferasi sel T. Polisakarida spirulina kemungkinan terikat oleh reseptor manosa (MR) dari sel dendrit dan makrofag yang kemudian memulai aktivasi dari immunitas. Stimulasi sel B oleh polisakarida tidak melalui jalur reseptor manosa karena pada sel B tidak ditemukan adanya reseptor manosa. Potensi sel B untuk distimulasi oleh APC (*antigen presenting cells*) kemungkinan berhubungan dengan tingginya pengulangan struktur, yang menghubungkan secara silang dengan permukaan Ig M (Immunoglobulin M) dari polisakarida yang menanggapi sel B dalam mode multivalen.

5.6. Interferon Alpha

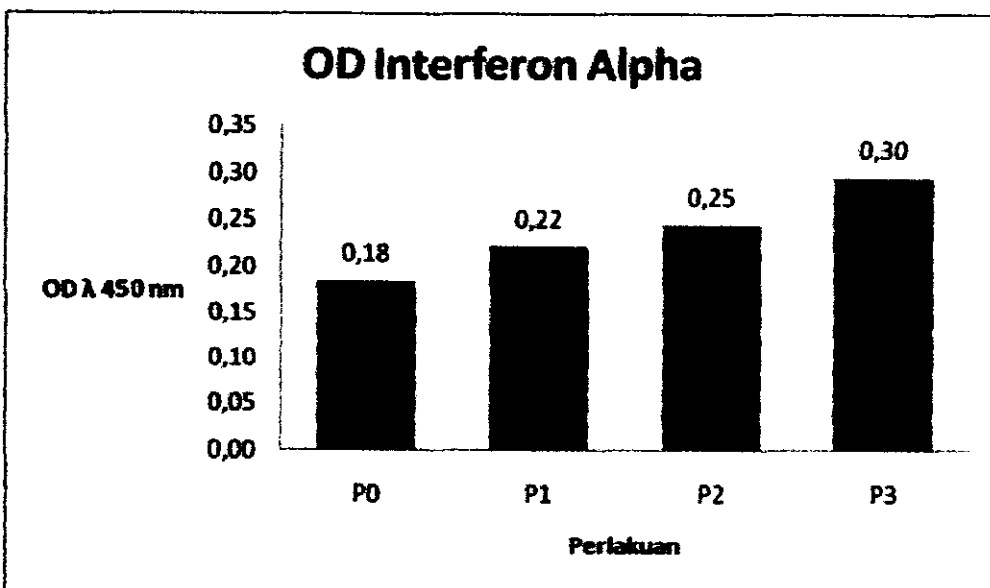
Hasil yang diperoleh dari penelitian tentang kadar interferon alpha pada serum ayam petelur tercantum dalam tabel 5.7.

Tabel 5.6.1. Rerata OD λ 450 nm Interferon Alpha

| Perlakuan | Rerata OD λ 450 nm Interferon Alpha |
|----------------|---|
| P ₀ | 0,18 ^a |
| P ₁ | 0,22 ^a |
| P ₂ | 0,25 ^a |
| P ₃ | 0,30 ^a |

Keterangan: Superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0.05$)

Hasil analisis statistik menggunakan ANAVA dengan uji F terhadap nilai *optical density* interferon alpha pada ayam petelur menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0.05$) di antara perlakuan. Rerata nilai *optical density* interferon alpha menunjukkan bahwa nilai terendah terletak pada perlakuan P₀, yang tidak berbeda dengan perlakuan P₁, P₂ dan P₃



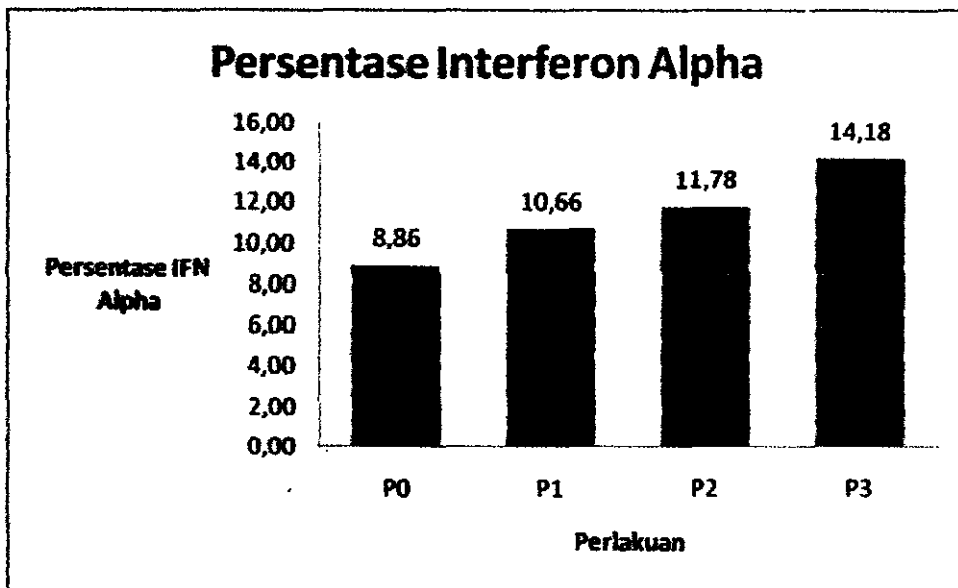
Gambar 5.6.1. Grafik OD Interferon Alpha

Tabel 5.6.2. Rerata Persentase Interferon Alpha

| Perlakuan | Rerata Persentase Interferon Alpha (%) |
|----------------|--|
| P ₀ | 8,86 ^a |
| P ₁ | 10,66 ^a |
| P ₂ | 11,78 ^a |
| P ₃ | 14,18 ^a |

Keterangan: Superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0.05$)

Hasil analisis statistik menggunakan ANAVA dengan uji F terhadap nilai persentase interferon alpha pada ayam petelur menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0.05$) di antara perlakuan. Rerata persentase interferon alpha menunjukkan bahwa nilai terendah terletak pada perlakuan P₀, yang tidak berbeda dengan perlakuan P₁, P₂ dan P₃



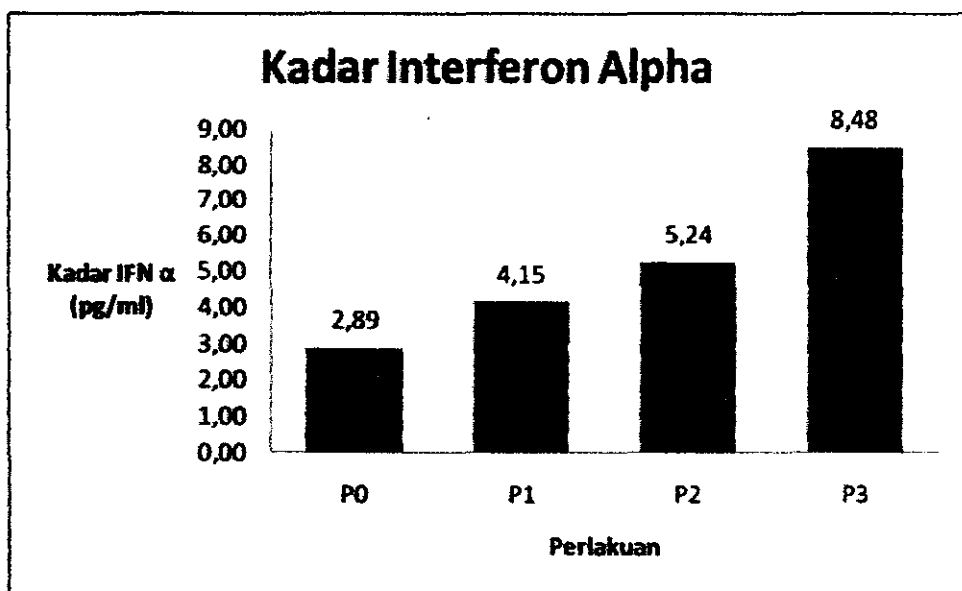
Gambar 5.6.2. Grafik Persentase Interferon Alpha

Tabel 5.6.3. Rerata Kadar Interferon Alpha

| Perlakuan | Rerata Kadar Interferon Alpha (pg/ml) |
|----------------|---------------------------------------|
| P ₀ | 2,89 ^a |
| P ₁ | 4,15 ^a |
| P ₂ | 5,24 ^a |
| P ₃ | 8,48 ^a |

Keterangan: Superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P>0.05$)

Hasil analisis statistik menggunakan ANAVA dengan uji F terhadap kadar interferon alpha pada ayam petelur menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p>0.05$) di antara perlakuan. Rerata kadar interferon alpha menunjukkan bahwa nilai terendah terletak pada perlakuan P₀, yang tidak berbeda dengan perlakuan P₁, P₂ dan P₃



Gambar 5.6.3. Grafik Kadar Interferon Alpha

Kandungan Vitamin A dalam Spirulina sangat tinggi (23000 IU per 10 gram Spirulina). Karotenoid mempunyai fungsi imunoregulator limfosit T dan limfosit B, sel *Natural Killer* dan makrofag. Vitamin A merupakan mikronutrien penting yang diperlukan untuk fungsi kekebalan tubuh spesifik maupun nonspesifik. Defisiensi vitamin A dilaporkan dapat menyebabkan gangguan kekebalan humoral serta selular. Efek antioksidan karotenoid ini secara tidak langsung dapat meningkatkan fungsi kekebalan tubuh dengan jalan menurunkan konsentrasi partikel bebas beserta produknya yang bersifat immunosupresif. Dengan pencegahan oksidasi leukosit, dapat menurunkan kadar prostaglandin yang bersifat immunosupresif. Peningkatan asupan diet antioksidan dapat menurunkan konsentrasi peroksidase lipid, konsentrasi prostaglandin yang diproduksi oleh makrofag yang selanjutnya meningkatkan respons hipersensitivitas tipe lambat dan proliferasi limfosit.

Vitamin A juga bersifat sebagai ajuvan dengan jalan merusak membran lisosom yang dapat merangsang pembelahan sel pada saat antigen berada dalam sel. Lisosom ini mempunyai peranan dalam memulai terjadinya pembelahan sel. Kerusakan lisosom ini akan merangsang sistim imun. Pembelahan sel akibat pemberian ajuvan terjadi hanya sebatas pada sel imunokompeten yang dirangsang oleh ajuvan. Vitamin A berperan pada proses epitelisasi. Dengan peningkatan proses ini, maka akan terjadi perbaikan fungsi pertahanan fisik nonspesifik terhadap antigen yang masuk ke dalam tubuh. Defisiensi vitamin A mengakibatkan berat kelenjar timus sedikit berkurang, respons proliferasi limfosit terhadap mitogen menurun, produksi antibodi spesifik dan proliferasi limfosit T invitro juga menurun serta peningkatan aderen bakteri pada sel epitel saluran napas.

Selain vitamin A, Spirulina juga mengandung vitamin B6. Defisiensi vitamin B6 dapat mempengaruhi respons imun pada binatang percobaan. Kelenjar timus mengecil dan aktivitas hormon timus menurun. Gangguan imunitas selular dibuktikan dengan adanya kegagalan reaksi hipersensitivitas tipe lambat, penurunan sitotoksisitas sel limfosit T dan

rejeksi lambat *alograf*. Terdapat penurunan respons limfosit terhadap mitogen dan antigen. Pembentukan antibodi setelah imunisasi primer dan sekunder juga menurun.

Nutrisi lain yang memegang peranan penting yaitu asam amino yang dikandung *Spirulina* cukup lengkap. Asam amino berperan memodulasi respons imun melalui berbagai cara. Defisiensi beberapa jenis asam amino dapat menurunkan respons antibodi. Didapatkan juga penurunan klirens makromolekul oleh sel fagosit dari darah. Bukti akhir menunjukkan efek imunostimulan dan antiinfeksi yang diperani oleh asam amino glutamin dan arginin.

Kandungan lipid *spirulina* sekitar 4-7%, mengandung asam-asam lemak essential: *Linoleic acid* (LA) ($C_{18:2}\Delta^{9,12}$) dan *Gamma Linolenic Acid* (GLA) (γ -linolenic acid) ($C_{18:3}\Delta^{9,12,15}$) (GLA) (Othes and Pire, 2001). Keuntungan secara medis, nutrient ini dibutuhkan untuk sintesis arachidonic acid dan prostaglandin (Dubacq and Pham-Quoc, 1993). GLA merupakan low-density lipoprotein, 170 kali lebih efektif dibandingkan LA (Cohen, 1997). Banyak bukti menunjukkan bahwa lipid mempunyai peran imunoregulator. Mekanismenya melalui modulasi sistem eikosanoid, perubahan membran sel, perubahan jumlah dan kepadatan reseptor, perubahan jumlah dan fungsi beberapa subpopulasi sel serta produksi dan kinerja sitokin. Defisiensi asam lemak esensial akan menurunkan berbagai respons imun. Sebaliknya, kelebihan lipid misalnya pada obesitas juga dapat menyebabkan gangguan respons imun.

Spirulina sebagai bahan pengaktif sistem imunitas bawaan manusia, dimanfaatkan untuk mencegah pertumbuhan sel kanker dan infeksi virus. Dalam suatu penelitian disebutkan bahwa ternyata efek penambahan *Spirulina* mengakibatkan pertambahan produksi Interferon γ (IFN γ) dan cytotoxicity yang meningkat pada lebih dari 50% subjek penelitian. IFN gamma berperan menimbulkan pertumbuhan produksi yang signifikan pada sel Natural Killer (NK cell) (Hirahashi, 2002). Selain itu *Spirulina* dapat mengatasi sel kanker karena mampu

menghasilkan faktor alfa, merupakan zat kimia yang paling baik menggempur sel tumor. Mekanisme lain, tumbuhan itu mengandung polisakarida yang mampu memperbaiki sintesis kode gen DNA. Spirulina juga meningkatkan aktivitas enzim inti sel sehingga membuat DNA dalam kondisi baik dan sehat (Mushtofa, 2009).

Interferon adalah asam amino dengan aktivitas antiviral tidak khusus. Berat molekul interferon bervariasi menurut cara yang dipakai untuk merangsang pembentukannya dan umumnya terletak antara 20.000 dan 34.000 dalton (Tizard, 1987). Interferon memiliki beberapa efek yaitu sebagai antiviral dan antionkogenik, mengaktifasi makrofag dan sel *natural killer* (sel NK), meningkatkan kompleks glikoprotein kelas I dan II, serta mempresentasikan peptida asing (antigen) kepada sel T (Wikipedia, 2006). Sel yang terinfeksi oleh virus akan segera melepaskan interferon dan memberi pengaruh antivirus pada sel-sel yang belum terinfeksi dengan cara bereaksi dengan sel tersebut serta merangsang pembentukan protein kedua yang disebut protein antivirus (Fenner *et al.*, 1993; Bellanti, 1993). Terdapat 3 macam interferon yaitu *interferon- α* (IFN- α), *interferon- β* (IFN- β) dan *interferon- γ* (IFN- γ). IFN- α dan IFN- β berperan dalam imunitas nonspesifik dini pada infeksi virus. IFN- γ merupakan sitokin utama *Macrophage Activating Cytokines* dan berperan terutama dalam imunitas non spesifik dan spesifik selular, serta pengatur imun seperti penambahan produksi dan aktivasi sel NK (Baratawidjaja, 2006; Bellanti, 1993). IFN- γ diproduksi oleh sel T (sel T sitotoksik dan Th), berperan merangsang MHC-I dan MHC-II dan kostimulator APC. IFN- γ meningkatkan diferensiasi sel CD4+ ke subset sel Th1 dan mencegah proliferasi sel Th2. IFN- γ merangsang makrofag untuk lebih bersifat fagosit, dimana makrofag mampu membunuh antigen intraseluler dan menyajikan antigen tersebut (Baratawidjaja, 2006; Halifax, 2005).

Dalam penelitian ini terdapat empat perlakuan yaitu perlakuan kontrol (tanpa penambahan *crude Spirulina*), *crude Spirulina* 0,5% , 1,0% dan 1,5% . Hasil analisis statistik

menunjukkan bahwa rata-rata OD, persentase dan kadar Interferon alpha pada pemberian *crude Spirulina* menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) antara perlakuan 0% , 0,5% , 1,0% dan 1,5% . Walaupun tidak terdapat perbedaan antara perlakuan, penambahan *crude Spirulina* menunjukkan adanya kecenderungan peningkatan rata-rata OD, persentase maupun kadar Interferon alpha seiring dengan peningkatan dosis pemberian *crude Spirulina* seperti tampak pada gambar 5.1.1-5.1.3. Hal ini kemungkinan dapat disebabkan karena rendahnya dosis yang diberikan sehingga peningkatan tidak tampak nyata. *Crude Spirulina* 1,5% memiliki kadar yang lebih tinggi daripada perlakuan lainnya berdasarkan jumlah dari vitamin A yang berpengaruh terhadap peningkatan interferon. Hal ini sesuai dengan pernyataan McDonald *et al.* (1994), Steenblock (2006) dan Vitahealth (2004), bahwa vitamin A sebagai vitamin antioksidan yang berfungsi sebagai antioksidan sel dan jaringan seluruh tubuh. Kekurangan vitamin antioksidan akan menekan sistem imun dan tubuh mudah terkena infeksi penyakit, namun bila vitamin antioksidan tersebut dapat tercukupi di dalam tubuh maka dapat membantu merangsang dan memperkuat daya tahan tubuh dalam meningkatkan aktivitas sel *natural killer* (sel NK) dan memproduksi limfosit. *Spirulina* merupakan imun booster bagi tubuh, dinding sel *Spirulina* mampu merangsang pembentukan interferon dan meningkatkan jumlah serta aktivitas makrofag dan polimorfonuklear leukosit (Crayhon, 2007; Tuberoze, 2007).

Kadar vitamin dan mineral pada *chlorella* sangat tinggi, terdiri dari vitamin B kompleks, vitamin E, vitamin C dan mineral berupa magnesium, potasium, besi serta kalsium (Organic living food, 2006). Beta-karoten yang merupakan provitamin A berfungsi menguatkan sistem imun, dimana kadarnya dalam *Spirulina* cukup tinggi yaitu sebesar 250 mg/100gram. Kandungan Vitamin A sebesar 23.000 IU dan vitamin E merupakan vitamin antioksidan yang mampu melindungi limfosit dan monosit dari gangguan radikal bebas pada DNA, vitamin E juga memberikan efek perlindungan terhadap vitamin A dari oksidasi

didalam saluran pencernaan (Vitahealth, 2004). Kadar *crude Spirulina* 0,5, 1,0 dan 1,5% dapat memberikan kandungan vitamin, mineral, asam amino serta zat-zat yang lain yang sangat dibutuhkan oleh tubuh dalam pemenuhan gizi terutama dalam peningkatan sistem imun. Steenblock (1995) dan Vitahealth (2004) menyatakan bahwa *Spirulina* mengandung arginin, asam amino esensial yang diperlukan tubuh dalam memperkuat sistem imun. Asam amino arginin di dalam sel menghasilkan gas nitrogen oksida dengan stimulator enzim *nitric oxide synthase*, nitrogen oksida ini berperan dalam sistem imunitas tubuh (Silalahi, 2005).

5.7. Immunoglobulin A

Hasil yang diperoleh dari penelitian tentang immunoglobulin A pada serum ayam petelur tercantum dalam tabel di bawah ini

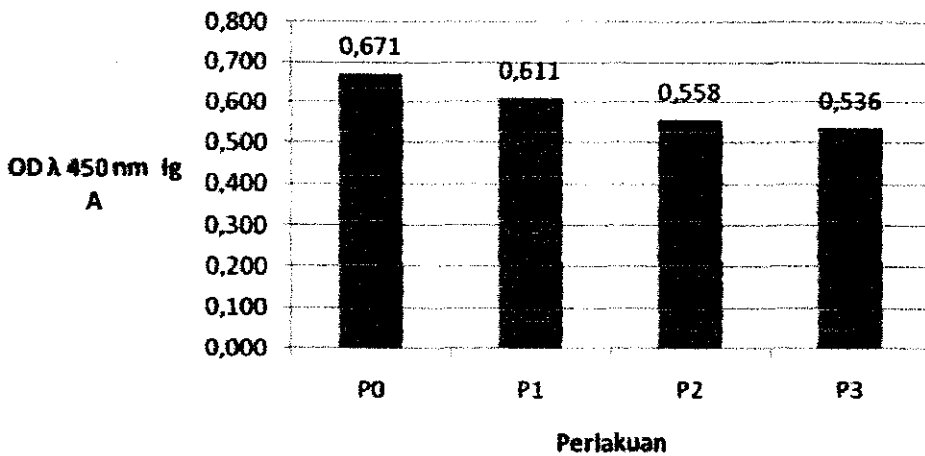
Tabel 5.7.1. Rerata OD λ 450 nm Immunoglobulin A

| Perlakuan | Rerata OD λ 450 nm Immunoglobulin A |
|----------------|---|
| P ₀ | 0,671 ^a |
| P ₁ | 0,611 ^{ab} |
| P ₂ | 0,558 ^b |
| P ₃ | 0,536 ^b |

Keterangan: Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ($P < 0.05$).

Hasil analisis statistik menggunakan ANAVA dengan uji F terhadap *optical density* immunoglobulin A pada ayam petelur menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0.05$) di antara perlakuan. Rerata *optical density* immunoglobulin A menunjukkan bahwa nilai tertinggi terletak pada perlakuan P₀, yang tidak berbeda dengan perlakuan P₁. Nilai OD terendah terletak pada perlakuan P₂ dan P₃ yang tidak berbeda nyata dengan P₁. Pada kit elisa Ig A yang digunakan menunjukkan bahwa semakin tinggi nilai OD atau absorbancy maka semakin rendah kadar immunoglobulin A

OD Immunoglobulin A



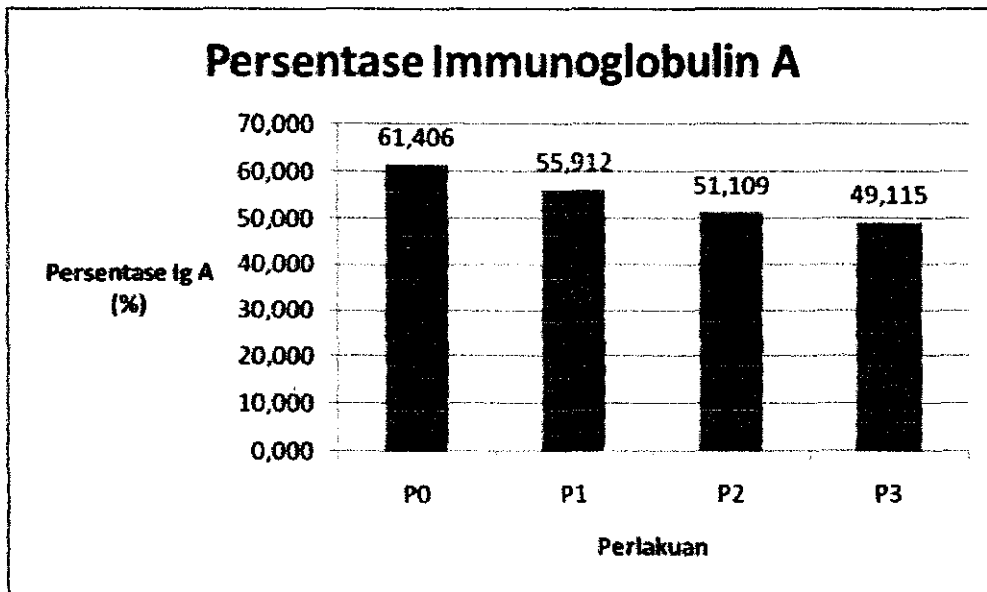
Gambar 5.7.1. Grafik OD Immunoglobulin A

Tabel 5.7.2. Rerata Persentase Immunoglobulin A

| Perlakuan | Rerata Persentase Immunoglobulin A (%) |
|----------------|--|
| P ₀ | 61,406 ^a |
| P ₁ | 55,912 ^{ab} |
| P ₂ | 51,109 ^b |
| P ₃ | 49,115 ^b |

Keterangan: Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ($P < 0.05$)

Hasil analisis statistik menggunakan ANAVA dengan uji F terhadap persentase immunoglobulin A pada ayam petelur menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0.05$) di antara perlakuan. Rerata persentase immunoglobulin A menunjukkan bahwa nilai tertinggi terletak pada perlakuan P₀, yang tidak berbeda dengan perlakuan P₁. Nilai persentase terendah terletak pada perlakuan P₂ dan P₃ yang tidak berbeda nyata dengan P₁. Pada kit elisa Ig A yang digunakan menunjukkan bahwa semakin tinggi persentase Ig A maka semakin rendah kadar immunoglobulin A



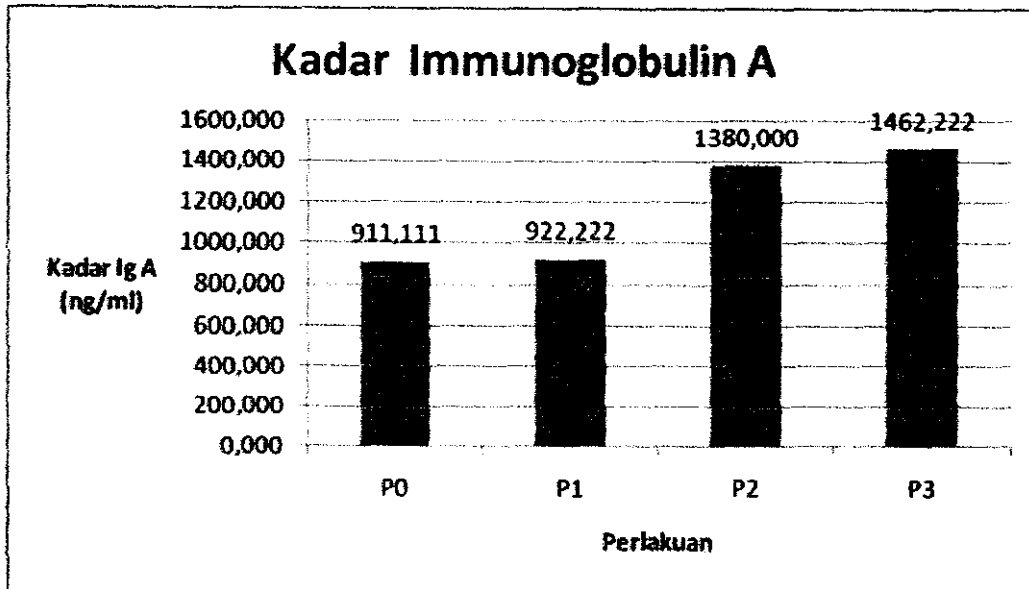
Gambar 5.7.2. Grafik Persentase Immunoglobulin A

Tabel 5.7.3. Rerata Kadar Immunoglobulin A

| Perlakuan | Rerata Kadar Immunoglobulin A (ng/ml) |
|----------------|---------------------------------------|
| P ₀ | 911,111 ^a |
| P ₁ | 922,222 ^a |
| P ₂ | 1380,000 ^a |
| P ₃ | 1462,222 ^a |

Keterangan: Superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0.05$)

Hasil analisis statistik menggunakan ANAVA dengan uji F terhadap kadar Ig A pada ayam petelur menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0.05$) di antara perlakuan. Rerata kadar Ig A menunjukkan bahwa nilai terendah terletak pada perlakuan P₀, yang tidak berbeda dengan perlakuan P₁, P₂ dan P₃



Gambar 5.8.3. Grafik Kadar Immunoglobulin A

Permukaan mukosa merupakan daerah paparan tubuh terbesar terhadap patogen eksternal. Immunoglobulin A (IgA), dalam bentuk sekretornya, adalah efektor utama dari sistem kekebalan mukosa dan merupakan garis awal yang penting bagi pertahanan terhadap patogen yang menyerang tubuh pada permukaan mukosa (Woof & Mestecky, 2005). Sekretori IgA (sIgA) adalah imunoglobulin yang paling melimpah pada sekresi tubuh seperti air liur, air mata, kolostrum, dan sekresi gastrointestinal.

IgA memiliki dua fungsi pertahanan lainnya: netralisasi intraseluler, dan ekskresi virus. IgA juga ditemukan sebagai monomer dalam serum di mana ia dapat berfungsi sebagai garis kedua pertahanan untuk menghilangkan patogen yang ada pada permukaan mukosa. Serum IgA berinteraksi dengan Fc reseptor disebut FcαR1. memicu antibody-dependent-cell-mediated cytotoxicity (ADCC). IgA memiliki potensi terhadap perlindungan mukosal melawan virus dan bakteri (Yan, *et al.*, 2002)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0.05$) di antara perlakuan, dapat disebabkan karena masih rendahnya dosis Spirulina yang diberikan.

Hal ini dapat dijelaskan bahwa walaupun tidak berbeda nyata diantara perlakuan namun terdapat kecenderungan peningkatan kadar Ig A dengan semakin meningkatnya persentase pemberian Spirulina.

BAB VI**KESIMPULAN DAN SARAN**

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penggunaan Spirulina, memberikan efek yang baik dengan pengaruh nyata terhadap *protein efficiency ratio* ,jumlah limfosit, sedangkan terhadap *feed conversion ratio*, *feed efficiency ratio*, konsumsi pakan, interferon alpha, immunoglobulin A, tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dengan formula pakan kontrol tanpa perlakuan. Penggunaan Spirulina sampai dengan dosis 1.5% pada total formula pakan perlakuan menunjukkan adanya perbaikan kualitas nutrien dengan adanya peningkatan kandungan protein kasar serta penurunan kandungan serat kasar sehingga meningkatkan proses pencernaan dalam tubuh ternak untuk digunakan dalam proses metabolisme tubuh dengan menghasilkan performan produksi yang lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Z. 2002. Meningkatkan Produktifitas Ayam Ras Pedaging. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Anonimus¹. 2004. The Spirulina Cell. <http://www.Spirulinaeurope.com/Spirulinacomp.html>.
- Anonimus². 2006. SPIRULINA. <http://tuberoze.com/Spirulina.html>.
- Anonimus³. 2006. Interferon. <http://www.eccs.edu/~rmelamed/microfall2002.chapter%2016/interferon.html>.
- Armstrong, P.B.; M.T. Armstrong, R.L. Pardy, A. Child and N. Wainwright. 2002. Immunohistochemical Demonstration of a Lipopolysaccharide in the Cell Wall of a Eukaryote, the Green Alga, *Spirulina*. Biol. Bull. 203 : 203 – 204.
- Asmara, W. 2007. Peran Biologi Molekuler Dalam Pengendalian avian Influenza dan Flu Burung. Pidato pengukuhan jabatan Guru Besar pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Aviaire, G. 2008. Highly Pathogenic Avian Influenza. The Center for Food Security & Public Health. www.cfsps.iastate.edu.
- Baratawidjaja, G.K. 2006. *Imunologi Dasar*. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Indonesia. Jakarta.
- BBC News. 2008. how bird flus has spread ? http://news.bbc.co.uk/2/hi/in_depth/world/2005/bird_flu/default.stm
- Bedick, J.C.; A. Shynra, D.W. Stanley and R.L. Pardy. 2001. Innate reactions stimulated by a lipopolysaccharide-like component of the alga *Prototheca* (strain 289). *Naturwissenschaften*. 88 : 482 – 485.
- Bellanti, J.A. 1993. *Imunologi III*. Gadjah Mada University press. Yogyakarta.
- Biron, C. A. 1994. Cytokines in the generation of immune responses to, and resolution of, virus infection. *Curr. Opin. Immunol.* 6:530–538.
- Biron, C. A. 1998. Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-a/b), in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Semin. Immunol.* 10:383–390.
- Cella, M., M. Salio, Y. Sakakibara, H. Langen, I. Julkunen, and A. Lanzavecchia 1999. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J. Exp. Med.* 189:821–829.
- Cohen, Z. 1997. The chemicals of *Spirulina*. In: Vonshak, A., Ed. *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*. Taylor and Francis. London. pp. 175 – 204.

- Dubacq, J.P and Pham-Quoc, K. 1993. Biotechnology of *Spirulina* lipids: a source of gamma-linolenic acid. In: Doumengué, F., Durand-Chastel, H., Toulemont, A., Eds. *Spiruline algue de vie*. Musée Océanographique. Bulletin de l'Institut Océanographique Monaco. Numéro spécial 12:59-64.
- Crayhon, R. 2007. *Nutrition in Depth Chlorella a Powerful health food*. http://www.evolutionhealth.com/free_report_chlorella.htm [12 November 2007].
- Crowe, J. E., Jr. 1996. The role of antibodies in respiratory viral immunity. *Semin. Virol.* 7:273-283.
- Cummins, J.M.; GS. Krakowka and CG. Thompson. 2005. Systemic effects of interferon after oral administration in animals and humans. *AJVR*. Vol. 66 (1) : 164 – 176.
- Dandoy, F., K. A. Kelley, J. DeMaeyer-Guignard, E. DeMaeyer, and P. M. Pitha. 1984. Linkage analysis of the murine interferon-alpha locus on chromosome 4. *J. Exp. Med.* 160: 294-302.
- Davies, D.L. 1982. *A Course Manual in Nutrition and Growth*. The Australian University International Development Program, Melbourne.
- Di'az-Guerra, M., C. Rivas, and M. Esteban. 1997. Activation of the IFN-inducible enzyme RNase L causes apoptosis of animal cells. *Virology* 236: 354-363.
- Doherty, P. C., D. J. Topham, R. A. Tripp, R. D. Cardin, J. W. Brooks, and P. G. Stevenson. 1997. Effector CD41 and CD81 T-cell mechanisms in the control of respiratory virus infections. *Immunol. Rev.* 159:105-117.
- Ernawati, R., A.P. Raharjo, N.Sianita, J.Rahmahani, F.A.Rantam, W.Tjahyaningsih dan Suwarno. 1994. *Petunjuk Praktikum Penyakit Viral*. Laboratorium Virologi dan Imunologi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Fenner, J. Frank. Gibbs J., Paul E., Murphy A. Frederick, Rott Rudolf., Studdert J. Michael, White O. David. 1993. *Virologi Veteriner*. Academic Press, Inc. California.
- FKH Unair. 2006. Model vaksinasi virus avian influenza pada ayam, unggas air dan burung merpati. Laporan Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Gale, M., Jr., and M. G. Katze. 1997. What happens inside lentivirus or influenza virus infected cells: insights into regulation of cellular and viral protein synthesis. *Methods* 11:383-401.
- GRAEME E. PRICE, ANNA GASZEWSKA-MASTARLARZ, AND DEMETRIUS MOSKOPHIDIS. 2000. The Role of Alpha/Beta and Gamma Interferons in Development of Immunity to Influenza A Virus in Mice. *JOURNAL OF VIROLOGY*. Vol. 74, No. 9. American Society for Microbiology
- Hardjosworo, P.S. dan Rukmiasih. 2000. *Meningkatkan Produksi Daging Unggas*. Penebar Swadaya. Jakarta.

- Hardy, M. P., C. M. Owczarek, L. S. Jermini, M. Ejdeback, and P. J. Hertzog. 2004. Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes. *Genomics* 84: 331–345.
- Hashimoto Y.; T. Moki, T. Takizawa, A. Shiratsuchi, and Y. Nakanishi. 2007. Evidence for Phagocytosis of Influenza Virus-Infected, Apoptotic Cells by Neutrophils and Macrophages in Mice. *The Journal of Immunology*. 178 : 2448 – 2457.
- Hirahashi T, M. Matsumoto, K. Hazeki, Y. Saeki, Ui M, T. Seya. 2002. Activation of the human innate immune system by Spirulina: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. Department of Immunology, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases, Japan. *Int Immunopharmacol*. Mar;2(4):423-34.
- Hiscott, J., H. Nguyen, and R. Lin. 1995. Molecular mechanisms of interferon beta gene induction. *Semin. Virol.* 6:161–173.
- Huang Y.; A. Misior and L. Li. 2005. Novel Role and Regulation of the Interleukin-1 Receptor Associated Kinase (IRAK) Family Proteins. *Cellular & Molecular Immunology*. 2 (1) : 36 – 39.
- Ishikawa E.; M. Nakazawa, M. Yoshinari, and M. Minami. 2005. Role of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand in Immune Response to Influenza Virus Infection in Mice. *JOURNAL OF VIROLOGY*. 79 (12) : 7658 – 7663.
- Isaacs, A., and J. Lindenmann. 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 147: 258–267.
- Isaacs, A. 1963. Interferon. *Adv. Virus Res.* 10:1–38.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune response. *Nature immunol.* 5 (10) : 987 – 995.
- Jacobs, B. L., and J. O. Langland. 1996. When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to doublestranded RNA. *Virology* 219:339–349.
- Jensen, B. 2006. Spirulina, Jewel of the Far East. <http://www.watershed.net/immune.htm>.
- Jensen, GS.; DL Ginsberg and C. Drapeu. 2001. Blue-Green Algae as immuno-enhancer and biomodulator. *JANA VOL 3 (4)* : 24 – 30.
- Kačergius, T.; Y. Deng, N. S. Kuhn, A. Ambrozaitis, and S. Gravenstein. 2007. Interferon-gamma does not restrict influenza virus replication in RAW 264.7 and AMJ2-C11 macrophages through the mechanism involving activation of inducible nitric oxide synthase expression. *BIOLOGIJA*. 53 (3) : 51 – 55.
- Kačergius, T.; A. Ambrozaitis, Y. Deng, N. S. Kuhn, and S. Gravenstein. 2008. Interferon-gamma augments cytotoxicity in influenza virus infected RAW 264.7 and AMJ2-C11 macrophages by upregulating the expression of inducible nitric oxide synthase. *ACTA MEDICA LITUANICA*. 15 (2) : 76 – 80.

- Kalvakolanu, D. V. 1999. Virus interception of cytokine-regulated pathways. *Trends Microbiol.* 7:166–171.
- Karzon, D. T. 1996. Cytotoxic T cells in influenza immunity. *Semin. Virol.* 7:265–271.
- Kawagoe T.; S. Sato, K. Matsu-shita, H. Kato, K. Matsui, Y. Kumagai, T. Saitoh, T. Kawai, O. Takeuchi and S. Akira. 2008. Sequential control of Toll-like receptor–dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nature Immunology.* 9 (6) : 684 – 691.
- Keith, M.E., Jeejeebhoy, K.N. “Immunonutrition”. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 11(4):709-38, 1997.
- Kiezebrink.2009. Nutrient *Spirulina platensis*. www.kiezebrink.eu
- Klassing and Korver. S. 1992. Dietarry Effect of Omega 3 PUFA on laying Hens. *Poult.Sci.* 8 (213-7645)
- Koenen, M.E, J. Kramer, R. VanDer Hulst, L. Heres, S.H. Zulkifli. 2000. Post Avian Influenza (H9) Virus Challenge Mortality and Meat-Type Chicken. *Br. Poultry Sci.*, 45: 355-366.
- Kristy J. Szretter, K.J.;S. Gangappa, X. Lu, C. Smith, W. Shieh, S.R. Zaki, S. Sambhara, T.M. Tumpey, and J.M. Katz. 2007. Role of Host Cytokine Responses in the Pathogenesis of Avian H5N1 Influenza Viruses in Mice. *JOURNAL OF VIROLOGY.* 81 (6) : 2736–2744.
- Lillehoj, H.S. and JM. Trout. 2008. Avian gut-associated lymphoid tissue and intestinal tissue and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. *Cmr. Asm. Org.* 349 – 360.
- Lee,C.W, D.L. Suarez. 2005. Avian Influenza Virus: prospects for prevention and control by vaccination animal health Res Rev. <http://amedeo.com/lit.php?id=16164006>
- Leung,M.Y.K, C. Liu, L.F.Zhu, Y.Z. Hui, B.Yu, K.P.Fung. 2003. Chemical and Biological Response Modifier from *Aloe Vera L. var. chinensis*. *Glycobiology* vol 14 no.6 © Oxford University Press 2004.
- Lund, J., A. Sato, S. Akira, R. Medzhitov, and A. Iwasaki. 2003. Toll-like receptor 9-mediated recognition of herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 198: 513–520.
- Lund, J. M., L. Alexopoulou, A. Sato, M. Karow, N. C. Adams, N. W. Gale, A. Iwasaki, and R. A. Flavell. 2004. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 5598–5603.
- Macagno A.; M. Molteni, A. Rinaldi, F. Bertoni, A. Lanzavecchia, C. Rossetti, and F. Sallusto. 2006. A cyanobacterial LPS antagonist prevents endotoxin shock and blocks sustained TLR4 stimulation required for cytokine expression. *The Journal of Experimental Medicine.* 203 : 1481 – 1492.

- Marrack, P., J. Kappler, and T. Mitchell. 1999. Type I interferons keep activated T cells alive. *J. Exp. Med.* 189:521–529.
- McDonald, A., Natow, Annette. and Heslin, Jo-Ann., 1994. *Complete Book of Vitamins and Minerals*. Publications International Ltd. USA.
- Miguel R.N.; J. Wong, J.F. Westoll, H.J. Brooks, L.A.J. O'Neill, N.J. Gay, C.E. Bryant, and T.P. Monie. 2008. A Dimer of the Toll-Like Receptor 4 Cytoplasmic Domain Provides a Specific Scaffold for the Recruitment of Signalling Adaptor Proteins. *Plos ONE* 2 (8) : 1 – 12. www.plosone.org.
- Mikheyskaya, L.V.; R.G. Ovodova and Y.U.S. Ovodov. 1977. Isolation and Characterization of Lipopolysaccharides from Cell Walls of Blue-Green Algae of the Genus *Phormidium*. *Journal of Bacteriology*. 130 (1) : 1 – 3.
- Mohamad, K. 2008. Flu Burung. www.influenza_report.com
- Moris, S.J.; A. Brydon, E. William, and S. Clive. 2008. Role of Apoptosis and Proinflammatory Cytokines in Influenza Virus Morbidity and Mortality. *Current Medicinal Chemistry – Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents*. 7 (2) : 59 – 70.
- Mosmann, T. R., and R. L. Coffman. 1989. Th1-cell and Th2-cell—different patterns of lymphokine secretion lead to different functional-properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7:145–173.
- Mushtofa, J. 2009. About Spirulina. <http://ulfana.multiply.com/journal/item/6/aboutSpirulina>
- Northoff, E. 2008. New avian influenza flare-ups. Virus remains a global threat – disease control strongly improved. FAO News room.
- Pardy, R.L. and P.B. Armstrong. 2001. Response of the Blood Cell of the American Horseshoe Crab, *Limulus polyphemus*, to a Lipopolysaccharide-like Molecule from the Green Alga *Spirulina*. *Biol. Bull.* 201: 246 – 247.
- Potter, C. W. 1992. Unique features of influenza viruses, and their implications. *Semin. Respir. Infect.* 7:2–10.
- Quereshi MA, Ali RA. 1996. Spirulina platensis exposure enhances macrophage phagocytic function in cats. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 18:457-463.
- Quereshi MA, Garlich JD, Kidd MT. 1996. Dietary Spirulina platensis enhances humoral and cell-mediated functions in chickens. *Immunopharmacol Immunotoxicol.*; 18:465-476.
- Ramshaw, I. A., A. J. Ramsay, G. Karupiah, M. S. Rolph, S. Mahalingam, and J. C. Ruby. 1997. Cytokines and immunity to viral infections. *Immunol. Rev.* 159:119–135.
- Rantam, F. A. 2003. *Metode Immunologi*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Richard, K and H. H. Ronald. 2007. *Effects on the AIDS Virus, Cancer and the Immune System*. Energyfix.com Inc.

- Rimmelzwaan G.F.; D. Riel, M. Baars, T.M. Bestebroer, G. Amerongen, R.A.M. Fouchier, A.D.M.E. Osterhaus, and T. Kuiken. 2006. *Influenza A Virus (H5N1) Infection in Cats Causes Systemic Disease with Potential Novel Routes of Virus Spread within and between Hosts*. *American Journal of Pathology*. 168 (1) : 176 – 183.
- Saito, T. 2004. Selection of usefull probiotic lactic acid bacteria from the *Lactobacillus acidophilus* group and their applications to functional foods. *Animal Science Journal*. 75 : 1 – 13.
- Samuel, C. E. 1991. Antiviral actions of interferon: interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral actions. *Virology* 183:1–11.
- Sargowo dan Ratnawati. 2006. Pengaruh pemberian zat aktif ganggang hijau (*Green Alagae*) terhadap produk radikal bebas dan fraksi lipid pada penderita dislipidemia usia lanjut. <http://www.tempo.co.id/medika/arsip/112002/art-1.htm>
- Sarlis, E., B. Suyoto dan S.Budiyanto. 1976. *Pemeliharaan Ayam Potong*. Dirjen Peternakan, Jakarta.
- Shekharam,K ., L.Ventarakaraman and P. Salimath. 1987. Carbohydrate composition and characterization of two unusual sugars from the blue-green algae *Spirulina platensis*. *Phytochem*. 26:2267-2269. Spiridonov ,N.A. and D.B. Wilson. 1998. Regulation of Biosynthesis of Individual Cellulases in *Thermonospora fusca*. *J. Bacteriol*. 180(14):3529-3532.
- Shira, BE. and A. Friedman. 2005. Ontogeny of gut associated immune competence in the chick. *Israel Journal of Veterinary Medicine*. 60 (92) : 42 – 50.
- Singgih, S. 2002. *SPSS Versi 10 – Mengolah Data Statistik Secara Profesional*. Penerbit PT Elex Media Komputindo. Kelompok Gramedia. Jakarta.
- Skalan, D. 2005. Development of Devense Mechanism in the Digestive Tract of the Chick. *Journal Appl. Poult. Res*. 14 : 437 – 443.
- Stark, G. R., I. M. Kerr, B. R. G. Williams, R. H. Silverman, and R. D. Schreiber. 1998. How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem*.67:227–264.
- Steenblock, D. 2006. *What Does Chorella Do For The Human Body?*. <http://www.bio-sources.com/page/1020222> [12 November 2007].
- Susanti, R.; R.D. Soejoedono, I-G N.K. Mahardika, I-W.T. Wirawan dan M.T. Suhartono. 2007. Potensi Unggas Air Sebagai Reservoir Virus *High Pathogenic Avian Influenza* Subtipe H5N1. *JITV* 12 (2) : 160 – 166.
- Tizard, I. 1987. *Pengantar Immunologi Veteriner*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Tough, D. F., P. Borrow, and J. Sprent. 1996. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science* 272:1947–1950.
- Tuberose. 2007. *Chlorella*. <http://tuberose.com/Chlorella.html> [12 November 2007].

- Trent, J. M., S. Olson, and R. M. Lawn. 1982. Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7809–7813.
- Vascellari, M.; A. Granato, L. Trevisan, L. Basilicata, A. Toffan, A. Milani and F. Mutinelli. 2007. Pathologic Findings of High Pathogenic Avian Influenza Virus A/Duck/Vietnam/12/05 (H5N1) in Experimentally Infected Pekin Ducks, Based on Immunohistochemistry and In Situ Hybridization. *Vet Pathol* 44 : 635 – 642.
- Vitahealth. 2004. *Seluk Beluk Food Suplemen*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Widya P.L., H.Setyono., M.Lamid. 2009. Laporan Penelitian Hibah Strategis Nasional Cluster Gizi dan Kesehatan. Lembaga Penelitian Unair. Dana Dikti
- Wikipedia. 2006. *The Free Encyclopedia : Interferon*.<http://en.wikipedia.org/wiki/Interferon> [28 Maret 2007]
- Welsh, R. M., C. H. Tay, S. M. Varga, C. L. O'Donnell, K. L. Vergilis, and L. K. Selin. 1996. Lymphocyte-dependent 'natural' immunity to virus infections mediated by both natural killer cells and memory T cells. *Semin. Virol.* 7:92–105.
- Woof JM. & Mestecky J., 2005. Mucosal-immunoglobulins. *Immunol Rev.* 64–82. Review.
- Yan H. et al., 2002. Multiple functions of immunoglobulin A in mucosal defense against viruses: an in vitro measles virus model. *J. Virol.* 76:10972
- Yen H.L., A.S. Lipatov, N.A. Ilyushina, E.A. Govorkova, J. Franks, N. Yilmaz, A. Douglas, A. Hay, S. Krauss, J.E. Rehg, E. Hoffmann, and R.G. Webster. 2007. Inefficient Transmission of H5N1 Influenza Viruses in a Ferret Contact Model. *JOURNAL OF VIROLOGY.* 81 (13) : 6890–6898.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira, and T. Fujita. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* 5: 730–737.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, K. Matsumoto, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, E. Foy, Y. M. Loo, M. Gale, Jr., S. Akira, et al. 2005. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J. Immunol.* 175: 2851–2858.
- Young, H. A. 1995. Regulation of interferon-g gene transcription. *Semin.Virol.* 6:175–179.

LAMPIRAN**I. Lampiran****II. Dukungan pada pelaksanaan penelitian**

- 2.1. Dukungan aktif yang sedang berjalan : tidak ada
- 2.2. Dukungan yang sedang dalam tahap pertimbangan : tidak ada
- 2.3. Proposal yang sedang direncanakan atau dalam taraf persiapan : tidak ada

III. Sarana

Sarana dan fasilitas laboratorium yang diperlukan lengkap dan menunjang seratus persen kegiatan penelitian ini.

3.1. Laboratorium :

Laboratorium Departemen Peternakan, Tropical Disease Center, Universitas Airlangga, Surabaya.

3.2. Peralatan Utama yang dimiliki :

1. Ultra Centrifuge
2. Centrifuge
3. Inkubator
4. Deep Freezer -80°C dan -20°C
5. Mikropipet
6. Elisa Reader

IV. Biodata peneliti**4.1. Ketua peneliti****DAFTAR RIWAYAT HIDUP**

1. Nama lengkap dan Gelar :Widya Paramita Lokapirnasari, MP., Drh
2. Tempat tanggal lahir : Surabaya, 10 Nopember 1969
3. Umur/Kelamin/Agama : 39 tahun / Perempuan / Islam
4. Pangkat/Gol./NIP : Lektor Kepala / III d / 132176853
5. Bidang Keahlian : Nutrisi Makanan Ternak
6. Alamat Kantor : Kampus C - Jl. Mulyorejo - Surabaya
- Telp. : 031-5992785
7. Alamat Rumah : Jl. Asem Bagus IV No. 11 - Surabaya
- Telp. : 031-5353241
- E-mail : wp_lokapirnasari@yahoo.com

8. Riwayat Pendidikan

| No | Macam Pendidikan | Tempat | Tahun | Bidang Spesialis | Titel/Ijazah |
|----|-------------------------------------|--------------------|---------------|-------------------------------|-----------------------|
| 1. | Kedokteran Hewan | Univ. Airlangga | 1988-1994 | Nutrisi dan Makanan Ternak | Dokter Hewan |
| 2. | Pasca Sarjana | Univ. Brawijaya | 2002-2004 | Nutrisi dan Makanan Ternak | Magister Pertanian |
| 3. | Pasca Sarjana (Program Doktorat) | Univ. Airlangga | 2009-sekarang | Ilmu Kedokteran | |

9. Pengalaman Penelitian

| No | Tahun | JUDUL | Peran | Keterangan |
|----|-------|---|-----------|------------|
| 1 | 1998 | Pengaruh Antikoksidosis Terhadap Pertambahan Berat Badan, Konsumsi Pakan dan Konversi Pakan pada Ayam Petelur | Author | Mandiri |
| | | Pengaruh Probiotik Terhadap Konsumsi Pakan, Berat Badan, Kecernaan Protein dan Kecernaan | Co-Author | |

| | | | | |
|----|------|---|-----------|---|
| 2 | 2000 | Bahan Kering pada Ayam Petelur | | Mandiri |
| 3 | 2000 | Prospek Pemanfaatan Daun Pepaya Untuk Meningkatkan Produksi Telur, Warna Kuning Telur dan Konsumsi Pakan pada Ayam Buras | Author | DIK Rutin |
| 4. | 2001 | Prospek Penggunaan <i>Effective Microorganism</i> Sebagai Pakan Tambahan Pada Ayam Petelur | Author | Depdiknas |
| 5 | 2004 | Pengaruh Penggunaan Tingkat <i>Manure</i> Ayam pada <i>Haylase Complete Feed</i> Terhadap Konsumsi, Kecernaan, Retensi Nitrogen dan Perubahan Bobot Badan Sapi Peranakan Ongole | Author | Mandiri |
| 6 | 2005 | Effektivitas batang jagung dan <i>Manure</i> Ayam dalam <i>Complete Feed</i> Ditinjau Dari Kinetika Degradasi Di Dalam Rumen | Author | Depdiknas |
| 7 | 2006 | Biofermentasi Dengan Inokulasi Isolat Bakteri Asam Laktat Pada Proses Silase Rumpun Raja | Co-Author | Dik Rutin |
| 8 | 2007 | Pengaruh Penggunaan Enzim <i>Xilanase</i> Asal Mikroba Rumen Sebagai <i>Biokatalis</i> Terhadap Kecernaan Bekatul Secara <i>In-Vitro</i> | Co-Author | Dik Rutin |
| 9 | 2007 | Isolasi dan Identifikasi Jamur <i>Selulolitik Aerob</i> asal Limbah Rumen Sapi di Rumah Potong Hewan Surabaya | Author | Mandiri |
| 10 | 2008 | Metode Aplikasi Lidah Buaya Untuk Meningkatkan Sistem Immunitas Pada Ayam Petelur | Co-Author | DIPA |
| 11 | 2009 | Rekayasa nutrisi High Quality Feed (HQF) untuk meningkatkan efisiensi pakan, kualitas produksi, dan sistem imunitas pada ayam yang divaksin Avian Influenza (AI) | Author | Hibah Kompetitif Sesuai Prioritas Nasional, Dikti |

10. Daftar Penelitian dan Publikasi

| No | Thn | Judul Karya Ilmiah | Peran | Keterangan |
|----|------|--|--------|--|
| 1. | 2001 | Prospek Pemanfaatan Daun Pepaya Untuk Meningkatkan Produksi Telur, Warna Kuning Telur dan Konsumsi Pakan pada Ayam Buras | Author | Jurnal Penelitian Medika Eksakta. Vol 2(1) |

| | | | | |
|----|------|---|-----------|--|
| 2. | 2002 | Penggunaan <i>Effective Microorganism</i> Terhadap Kecernaan Protein pada Ayam Petelur | Co-Author | Media Kedokteran Hewan, Vol 18 No. 2. |
| 3. | 2004 | Efektivitas Suplemen Probiotik dalam Air Minum terhadap Konversi Pakan Ayam Petelur Jantan. Januari | Co-Author | Media Kedokteran Hewan, Vol. 20 No. 1. |
| 4 | 2005 | Pengaruh Penggunaan Tingkat Manure Ayam pada Haylase <i>Complete Feed</i> Terhadap Retensi Nitrogen pada sapi Peranakan Ongole | Author | MKH Vol 21 No.3. September 2005 (159-163) |
| 5 | 2007 | Penggunaan " <i>Effective Microorganism</i> " Terhadap Konsumsi dan Berat Badan pada Ayam Petelur | Author | Jurnal Ilmiah Ilmu Peternakan dan Perikanan. Protein. Vol. 14, No.1. |
| 6 | 2007 | Kinetika Degradasi Bahan Kering dan Bahan Organik dari Manure Ayam Dalam Haylase <i>Complete Feed</i> | Author | MKH Vol.23 No.2. Mei 2007 |
| 7 | 2007 | Prospek pemberian haylase terhadap perubahan berat badan sapi PO | Author | Jurnal Ilmiah Cendekia Vol. 5 NO.3 |
| 8 | 2008 | Identifikasi Jamur Selulolitik Aerob dari Limbah Cairan Rumen Sapi di Rumah Potong Hewan Pegirian Surabaya | Author | Jurnal Veterinaria Medika Vol. 1 No. 1, |
| 9 | 2008 | <i>The Prospect of Effective Microorganism As Fecal Pollution Reductor in Broiler farm</i> | Co-Author | Proceeding International Seminar : management Strategy of Animal health and Production Control on Anticipation Global Warming for Achievement of Millenium Development Goals |
| 10 | 2008 | <i>The Addition of Xylanase Enzyme of Rumen Bacteria Production to Increase In Vitro Digestibility of Rice Straw Dry Matter and Crude Fiber</i> | Co-Author | Proceeding International Seminar : management Strategy of Animal health and Production Control on Anticipation Global Warming for Achievement of Millenium Development Goals |
| 11 | 2008 | <i>Kinetics Degradation of Crude Protein and Dry Matter of Maize Stalk and Chicken Manure in Haylage Complete Feed</i> | Author | Proceeding International Seminar : management Strategy of Animal health and Production Control on Anticipation Global Warming |

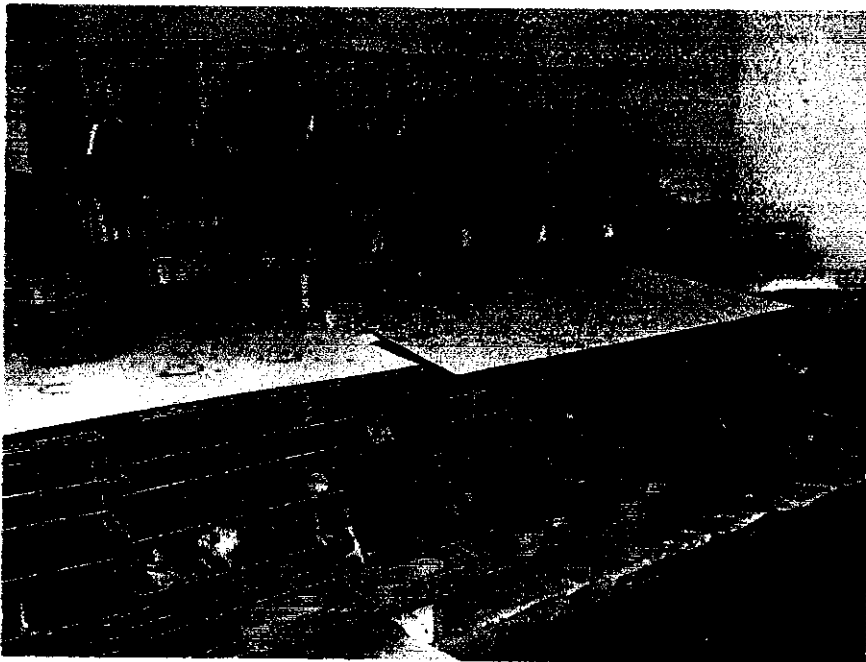
| | | | | |
|----|------|---|--------|---|
| | | | | for Achievement of Millenium Development Goals |
| 12 | 2009 | <i>Degradation Kinetics of Organic Matter of Chicken Manure in Haylage Complete Feed</i> | Author | Proceeding International Seminar : Universitas Airlangga-Universiti Sains Malaysia. Second Collaborative Conference. Life Sciences Synergy for Enhancement of Quality of life |
| 13 | 2010 | The Influence of <i>Spirulina</i> on Feed Efficiency Ratio of H5N1 Vaccinated in Layer Hen | | |
| 13 | 2010 | The Influence of Probiotic (<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> and <i>Streptococcus thermophilus</i>) on the Crude Protein Digestibility of Broiler Chicken | Author | International Symposium on Probiotic and Prebiotic as Functional Food for human Health promotion: health benefits, local knowledge, technical and Regulatory issues |

Surabaya, 1 Oktober 2010

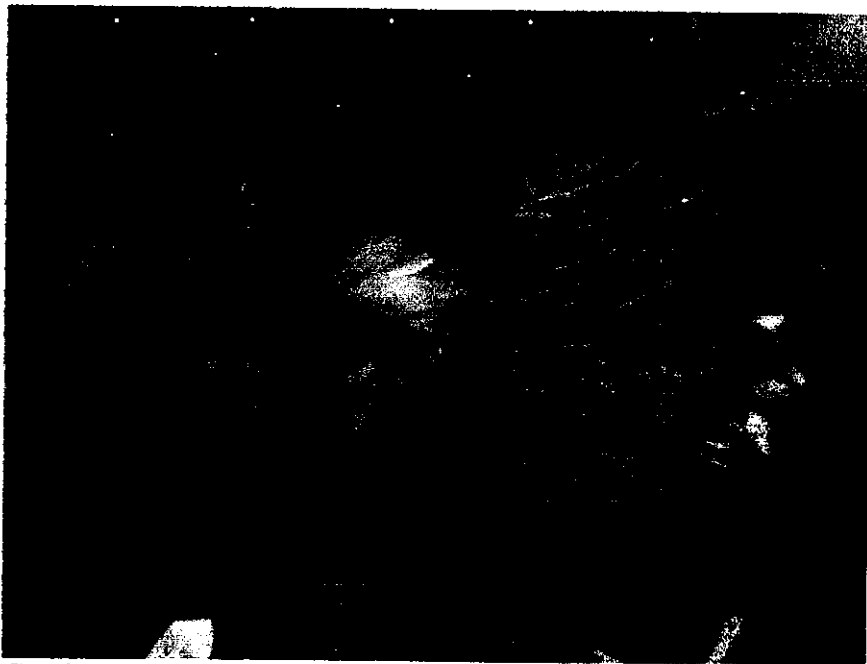
Widya Paramita L., MP., Drh

NIP 132 176 853

Lampiran 1. Dokumentasi Penelitian



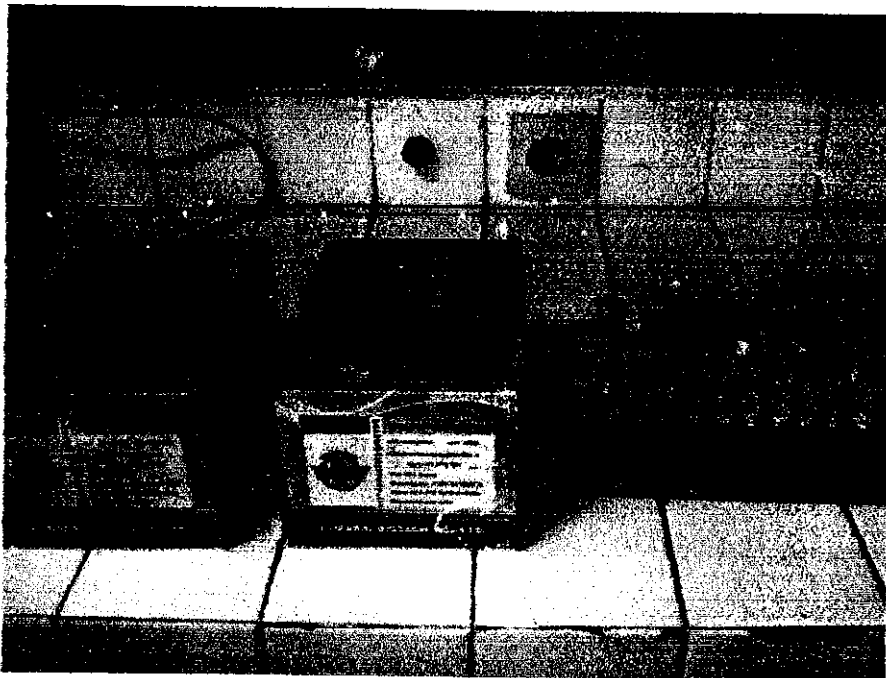
Gambar 1. Ayam Penelitian



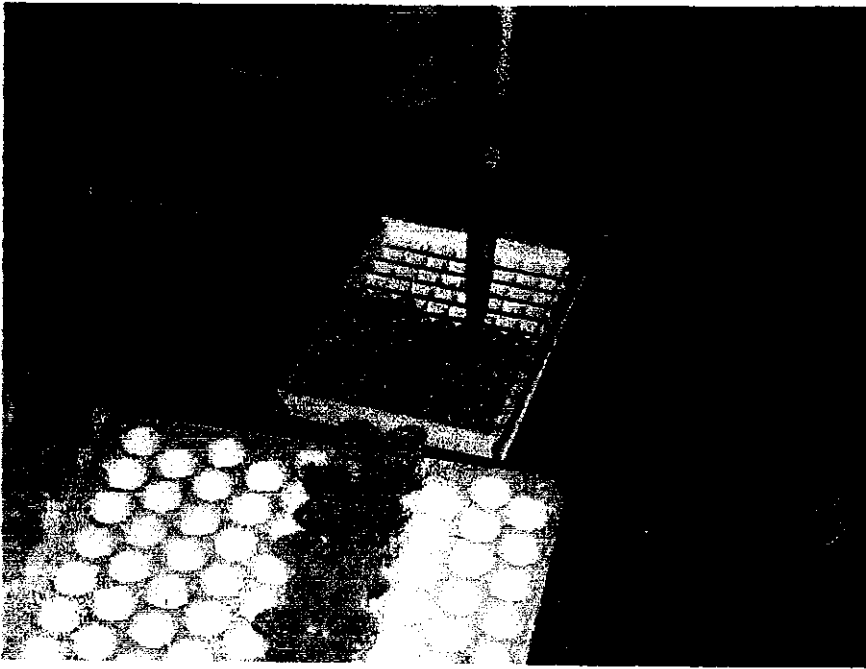
Gambar 2. Perlakuan Vaksinasi H5N1 pada ayam perlakuan (sub cutaneous)



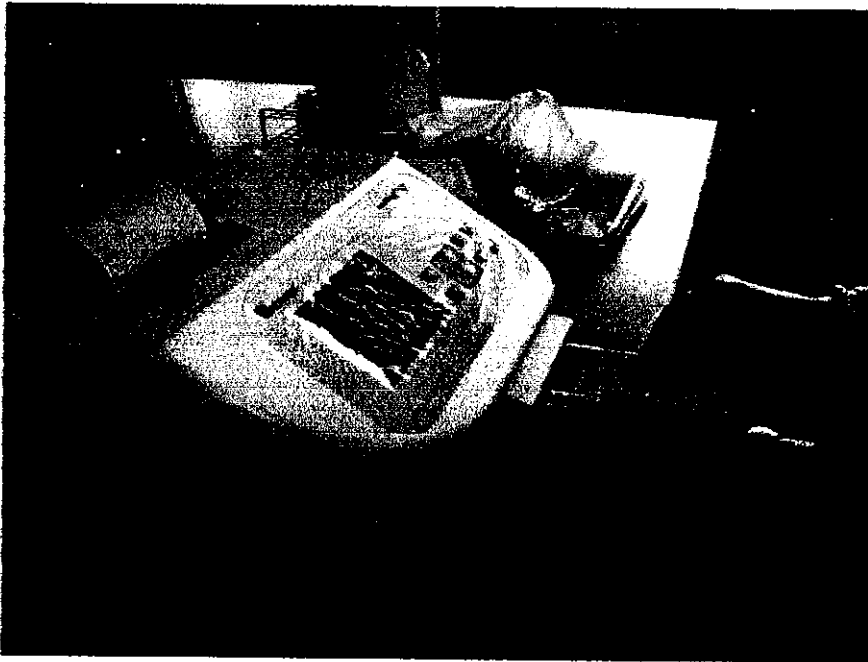
Gambar 3. Pengambilan sampel darah ayam perlakuan



Gambar 4. Elisa Kit dan Sampel Penelitian



Gambar 5. Prosedur Elisa pada Sampel Penelitian



Gambar 5. Elisa reader

Lampiran 2. ANALISIS PROTEIN KASAR

Bahan kimia yang digunakan :

Tablet Kjeldhal, H₂SO₄ pekat, NaOH 40 %, Asam Borat, indikator Metil-merah, Brom cresol green, H₂SO₄ 0,01 N dan aquadest.

Alat yang digunakan :

Labu Kjeldhal 100 cc, pemanas labu Kjeldhal, spatula, timbangan elektrik Sartorius, gelas ukur, labu ukur 250 cc, erlenmeyer 100 cc dan 1000 cc, serta seperangkat alat Marcam Steel.

Cara kerja :

1. Menimbang sampel seberat $\pm 0,5$ gram di atas kertas yang telah diketahui beratnya, kemudian masukkan sampel ke dalam labu Kjeldhal. Tambahkan ke dalamnya tablet Kjeldhal (katalisator) sebanyak $\frac{1}{4}$ bagian kemudian 10 cc H₂SO₄ pekat.
2. Memanaskan labu tersebut di atas pemanas Kjeldhal dalam almari asam. Pemanasan baru dihentikan jika sudah tidak berasap dan warna larutan menjadi hijau/kuning jernih (butuh waktu $\pm 1,5$ jam). Biarkan beberapa saat sampai labu menjadi dingin.
3. Memasukkan larutan yang ada dalam labu tersebut ke dalam labu ukur dan encerkan dengan aquadest sehingga volumenya menjadi 250 cc. Tuangkan larutan tersebut ke dalam erlenmeyer 300 cc dan kocoklah sampai homogen.
4. Menyiapkan erlenmeyer 100 cc yang diisi dengan 10 cc larutan Asam Borat dan 2 tetes indikator metil merah serta 3 tetes Brom cresol green untuk menampung hasil penguapan.
5. Menyiapkan alat Marcam Steel. Labu destilasi 2000 cc diisi dengan air 1000 cc dan diisi dengan beberapa butir batu didih. Taruh erlenmeyer 100 cc yang sudah disiapkan tadi pada rangkaian alat Marcam Steel.
6. Mengambil sebanyak 10 cc larutan (no. 3) dan masukkan ke dalam corong alat Marcam Steel. Tambahkan NaOH 40 % sebanyak 5 cc.

7. Memanaskan labu destilasi dan tampunglah uap yang keluar dari alat Marcam Steel ke dalam erlenmeyer. Pemanasan dilakukan selama ± 5 menit terhitung setelah air mendidih atau sampai volume erlenmeyer telah mencapai 50 cc.
8. Menitrasi larutan yang telah bercampur uap tersebut dengan H_2SO_4 0,01 N sampai warna biru muda berubah menjadi hijau jernih.
9. Kadar protein kasar dapat dihitung dengan rumus sbb. :

$$\text{Hasil titrasi} \times N \times 0,014 \times 6,25 \times p$$

$$\text{Protein kasar} = \frac{\text{Hasil titrasi} \times N \times 0,014 \times 6,25 \times p}{\text{Berat sampel}} \times 100 \%$$

Berat sampel

% protein kasar

$$\text{Protein kasar berdasar BK} = \frac{\text{Protein kasar}}{\text{\% BK bebas air}} \times 100 \%$$

% BK bebas air

Keterangan :

N : Normalitas H_2SO_4 = 0,01 N

p : Pengenceran = $250/10 = 25$

Lampiran 3. ANALISIS SERAT KASAR

Bahan kimia yang digunakan :

H₂SO₄ 0,3 N, NaOH 1,5 N, HCl 0,3 N, Aceton dan H₂O panas.

Alat yang digunakan :

Erlenmeyer 300 cc, erlenmeyer penghisap, corong Buchner, spatula, cawan porselen, gelas ukur, corong, timbangan analitik, oven, penangas air dan kompressor.

Cara kerja :

1. Menimbang ± 1 gram sampel (= A gram) dan masukkan ke dalam erlenmeyer 300 cc. Tambahkan 50 cc H₂SO₄ 0,3 N dan didihkan di atas penangas air selama 30 menit.
2. Menambahkan 25 cc NaOH 1,5 N dan didihkan kembali selama 30 menit.
3. Memberi alas corong Buchner dengan kertas saring yang telah diketahui beratnya (= B gram). Saring larutan dalam erlenmeyer dengan menggunakan corong Buchner, bilas erlenmeyer dengan 50 cc air panas dan saring kembali.
4. Memasukkan 50 cc HCl 0,3 N ke dalam corong Buchner dan biarkan selama 1 menit kemudian hisap dengan kompressor melalui lubang yang ada pada erlenmeyer hisap.
5. Membilas residu dalam corong Buchner dengan air panas beberapa kali (5 kali), kemudian tuangkan 5 cc aceton ke dalamnya. Biarkan selama 1 menit lalu hisap dengan kompressor.
6. Memanaskan cawan porselen selama 1 jam dalam oven 105 °C, dinginkan dalam exicator 10-15 menit kemudian ditimbang (= C gram). Angkat kertas saring yang berisi residu dan letakkan dalam cawan porselen tersebut kemudian dikeringkan dalam oven 105 °C selama 1,5 jam dan dinginkan dalam exicator selama ± 30 menit lalu ditimbang (= D gram).
7. Memasukkan cawan tersebut dalam tanur listrik 550 °C selama 2 jam. Matikan tanur listrik dan tunggu sampai suhu menunjukkan angka 0 °F, barulah cawan dikeluarkan

dari tanur kemudian masukkan dalam exicator selama ± 15 menit dan ditimbang (= **E gram**).

8. Menghitung kadar serat kasar dengan rumus sbb.:

$$D - E - B$$

$$\text{Kadar serat kasar} = \frac{\quad}{A} \times 100 \%$$

A

% Serat kasar

$$\text{Kadar serat kasar berdasarkan BK} = \frac{\quad}{\quad} \times 100 \%$$

% BK bebas air

Lampiran 4. ANALISIS BAHAN KERING BEBAS AIR

Alat yang digunakan :

Cawan porselen (aluminium), cruss tang, timbangan analitik, oven, exicator yang berisi *silica gel*.

Cara kerja :

1. Cawan porselen/ aluminium yang bersih dimasukkan ke dalam oven 105 °C selama 1 jam.
2. Cawan dikeluarkan dari oven dan secepatnya dimasukkan ke dalam exicator. Tunggu sampai 10-15 menit, lalu ditimbang (= **A** gram).
3. Cawan diisi dengan sampel ± 5 gram (berat cawan + sampel = **B** gram). Masukkan cawan yang berisi sampel ke dalam oven 105 °C selama 1 malam.
4. Mengeluarkan dari dalam oven dan secepatnya dimasukkan ke dalam exicator selama 10-15 menit. Setelah dingin lalu ditimbang (= **C** gram).
5. Kadar bahan kering bebas air dapat dihitung dengan rumus sbb. :

$$\text{Kadar bahan kering bebas air} = \frac{\mathbf{C} - \mathbf{A}}{\mathbf{B} - \mathbf{A}} \times 100 \%$$

Lampiran 5. Penghitungan Jumlah Leukosit

Dalam melakukan penghitungan jumlah leukosit ini dipergunakan pipet pengencer Thoma yang untuk leukosit. Pipet ini mempunyai skala 0,5 dan 11, sedangkan larutan pengencernya adalah larutan Reesecker.

Komposisi larutan Reesecker terdiri dari: natrium sitrat 3,8 g, brilliant cresyl blue 0,1 g, larutan formal dehidat 40% 2 ml, aquadest ad 100 ml.

Cara Kerja :

A. Mengisi pipet leukosit

Darah kapiler atau darah vena dengan antikoagulan dihisap sampai tanda '0,5' lalu disusul dengan larutan Reesecker atau amonium oksalat 1% sampai tanda '11'. Jadi pengenceran 20 kali.

B. Mengisi kamar hitung

1. Isaplah kamar hitung yang bersih dengan kaca penutup terpasang mendatar di atas meja.
2. Kocoklah pipet yang diisi tadi selama 3 menit terus-menerus, jagalah jangan sampai ada cairan terbuang dari dalam pipet sewaktu mengocok.
3. Buanglah semua cairan yang ada di dalam batang kapiler pipet (3 atau 4 tetes) dan segeralah sentuhkan ujung pipet dengan sudut 30 derajat pada permukaan kamar penghitung dengan menyinggung pinggir kaca penutup. Biarkan kamar hitung terisi cairan perlahan-lahan dengan daya kapilaritasnya sendiri.
4. Biarkan kamar penghitung selama 2 atau 3 menit (segera mencari garis-garis bagi bidang tengah) supaya leukosit dapat mengendap.

C. Menghitung Jumlah Sel

1. Pakailah lensa obyektif kecil, yaitu dengan pembesaran 10 kali. Turunkan lensa kondensator atau kecilkan diafragma.
2. Kamar hitung dengan bidang bergarisnya dilatakan di bawah obyektif dan fokus mikroskop diarahkan kepada garis-garis bagi. Dengan sendirinya leukosit jelas terlihat.
3. Hitunglah semua leukosit yang terdapat dalam ke empat "bidang besar" pada sudut-sudut.

- a. Mulailah menghitung dari sudut kiri atas, terus ke kanan, kemudian turun ke bawah dan dari kanan ke kiri dst. Cara seperti ini dilakukan pada ke empat "bidang besar".
- b. Untuk sel yang letaknya menyinggung garis batas sesuatu bidang, sel yang letaknya menyinggung garis batas sebelah kiri tau garis atas haruslah dihitung. Sebaliknya sel yang menyinggung garis batas sebelah kanan atau bawah tidak boleh dihitung.

D. Penghitungan

Pengenceran yang terjadi dalam pipet adalah 20 kali. Jumlah semua sel yang dihitung dalam ke empat bidang itu dibagi empat menunjukkan jumlah leukosit dalam 0,1 μ l.

Kalikan angka itu dengan 10 (untuk tinggi) dan 20 (untuk pengenceran) untuk mendapatkan jumlah leukosit dalam 1 μ l darah. Singkat: Jumlah sel leukosit yang di hitung $(N) \times 50 =$ Jumlah leukosit per μ l darah.

Lampiran 6. Pemeriksaan Hitung Jenis Leukosit

Sebelum dilakukan pemeriksaan hitung jenis leukosit, terlebih dahulu dilakukan pembuatan hapusan darah dilanjutkan dengan pemeriksaan kualitas hapusan darah. Hal-hal yang harus diperhatikan dalam pemeriksaan ini adalah: lapisan darah yang dibuat harus cukup tipis sehingga tampak jelas eritrosit dan leukosit akan terpisah satu dengan lainnya, hapusan darah tidak boleh mengandung endapan cat yang terlalu tebal, leukosit harus tercatat dengan baik dan tidak bergerombol pada bagian akhir hapusan.

Pembuatan Hapusan Darah

Setetes darah yang mengandung antikoagulan diteteskan dekat salah satu ujung dari gelas obyek. Gelas penghapus dipegang sedemikian rupa sehingga membentuk sudut 30 derajat dengan gelas objek, sedangkan tetesan darah tadi terletak dalam sudut tersebut. Dengan cepat gelas penghapus digeserkan ke arah yang berlawanan dengan arah yang pertama, sehingga darah akan merata di atasnya sebagai lapisan tipis. Hapusan ini segera dikeringkan dengan menggerak-gerakkan di udara, setelah itu baru dapat dilakukan pengecatan.

Pengecatan Hapusan Darah

Hapusan darah yang sudah kering difiksasi dengan meneteskan cat Wright ini di atas lapisan darah tersebut sehingga tertutup seluruhnya. Setelah dua menit ditambahkan larutan Buffer Phosphate. Larutan Buffer Phosphate dan cat Wright ini akan segera tercampur dengan jalan meniupkan hapusan darah beberapa kali, ditunggu dalam waktu 20 menit sehingga sel-selnya tercatat dengan baik. Kemudian hapusan darah tersebut dicuci dengan air yang dialirkan di atasnya sehingga semua cat hapusan darah ini terletak pada sisinya dan ditunggu sampai kering.

Pemeriksaan Hitung Jenis Leukosit

Setelah didapatkan hasil dengan kualitas yang baik pada hapusan darah, langkah selanjutnya melakukan pemeriksaan hitung jenis leukosit. Pada mulanya dilakukan pemeriksaan menggunakan mikroskop dengan lensa obyektif 100 X yang dimulai dari satu sisi, kemudian bergerak menuju sisi yang lain, lalu pindah sejauh dua sampai tiga lapangan pandang ke kiri atau ke kanan, kembali menuju sisi semula dan seterusnya. Pada setiap lapangan pandang, dihitung jumlahnya, jenis leukosit dengan menggunakan alat penghitung sel darah (Blood Cell Counter) sampai didapatkan jumlah 100 sel. Nilai yang diperoleh merupakan jumlah masing-masing sel tersebut per 100 sel leukosit (Lab. Patologi Klinik Vet., 2009)