

SKRIPSI

EFEK SUPLEMENTASI CRUDE CHLORELLA PADA PAKAN RENDAH PROTEIN TERHADAP EKSPRESI IgA DI ILEUM AYAM PETELUR YANG DIVAKSIN AVIAN INFLUENZA



Oleh :

LUFTI BASKORO TIMUR

060313138

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2007**

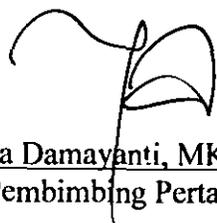
**EFEK SUPLEMENTASI *CRUDE CHLORELLA* PADA PAKAN RENDAH PROTEIN
TERHADAP EKSPRESI IgA
DI ILEUM AYAM PETELUR YANG DIVAKSIN *AVIAN INFLUENZA***

Skripsi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan
pada
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

oleh

LUFTI BASKORO TIMUR
NIM 060313138

Menyetujui
Komisi Pembimbing,



(Ratna Damayanti, MKes., drh.)
Pembimbing Pertama



(E. Djoko Poetranto, MS., drh.)
Pembimbing Kedua

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

**EFEK SUPLEMENTASI *CRUDE CHLORELLA* PADA PAKAN RENDAH PROTEIN
TERHADAP EKSPRESI IgA DI *ILEUM* AYAM PETELUR YANG DIVAKSIN
*AVIAN INFLUENZA***

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 23 Oktober 2007



Lufti Baskoro Timur
NIM. 060313138

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 23 Oktober 2007

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua	: Dr. Mustikoweni, M.A., Ir.
Sekretaris	: Jola Rahmahani, MKes., drh.
Anggota	: Djoko Legowo, MKes, drh.
Pembimbing I	: Ratna Damayanti, MKes, drh.
Pembimbing II	: E. Djoko Poetranto, M.S., drh.

**THE INFLUENCE OF *CRUDE CHLORELLA* SUPPLEMENTATION IN
LOW PROTEIN FEED AGAINST
THE EXPRESSIONS OF *ILEUM'S* IgA OF THE *AVIAN INFLUENZA*
VACCINATED LAYER**

Lufti Baskoro Timur

ABSTRACT

The purpose of this study was to find out the influence of *crude chlorella* supplementation to the expressions of IgA of layer's *ileum* that vaccinated by *Avian Influenza* and treated with low protein feed. This research used factorial completely random design. Sixteen weeks old layer were divided randomly into six groups: 0% *crude chlorella* supplementation in basal feed; 2,5% *crude chlorella* supplementation in basal feed; 5% *crude chlorella* supplementation in basal feed; 0% *crude chlorella* supplementation in low protein feed; 2,5% *crude chlorella* supplementation in low protein feed; 5% *crude chlorella* supplementation in low protein feed. When the layer were twenty four weeks old, they were sacrificed and the *ileum* were collected. The expression of IgA were explored by immunositochemical technique. The data were analyzed by Univariate ANOVA using SPSS for windows 13.00. The result show that supplementation with 2,5% *crude chlorella* in low protein feed can better increase the IgA expressions in the mucosal of *ileum* of layer vaccinated by *Avian Influenza* than IgA expression in the mucosal of *ileum* of layer vaccinated by *Avian Influenza* using 5% *crude chlorella* supplementation in low protein feed.

Keywords : *crude chlorella*, *ileum*, mucosal immunity, low protein feed.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kami panjatkan kepada Allah SWT atas segala nikmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul **Efek Suplementasi *Crude Chlorella* Pada Pakan Rendah Protein Terhadap Ekspresi IgA di *Ileum* Ayam Petelur yang Divaksin *Avian Influenza*.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Dr. Hj. Romziah Sidik.,Ph.D.,drh yang telah memberi kesempatan pada penulis untuk menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Ratna Damayanti, MKes., drh. selaku dosen pembimbing pertama dan E. Djoko Poetranto, M.S., drh. selaku dosen pembimbing kedua yang telah memberikan bimbingan, bantuan, petunjuk dan saran kepada penulis sampai dengan selesainya skripsi ini.

Penguji skripsi, yaitu : Dr. Mustikoweni P., M.A., Ir., Jola Rahmahani, MKes., drh., Djoko Legowo, MKes., drh. atas kesediaannya meluangkan waktu untuk menguji dan menilai skripsi ini.

Bapak Budi Utomo, M.Si., drh. selaku dosen wali saya yang telah membimbing dengan penuh perhatian, memberi masukan-masukan yang berharga serta motivasi kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan kuliah ini.

Ibu Yeni Dhamayanti, M.S., drh. selaku dosen pembimbing penelitian yang memberikan bimbingan, bantuan, petunjuk, doa dan saran kepada penulis sampai dengan selesainya skripsi ini.

Seluruh staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Seluruh staf Laboratorium Anatomi, staf Laboratorium Patologi, staf Laboratorium Makanan Ternak Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas bantuannya selama proses penelitian berlangsung.

Kepada ayahanda Sularno, Ir. dan ibunda Budi Wahyuni, adik-adikku tercinta, Azhar Bayu Sembodo dan Izma Kartika Willis serta Jamilatul 'Athia Farikha yang telah memberikan cinta, doa dan dukungannya. Kepada teman-teman satu penelitian, Radhitya Wahyu Nugraha, Retno Wulan Handayani, Linda Kurniadewi, Riestyarta Adi, Dimas Wicaksana, Suryo Kuncoro Jakti, Diana Susanti, Linawati, Novita, Aprilya Hadi A., Rosetta I., Andes Seno, Dhanang D.J. dan seluruh teman-teman angkatan 2003 Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, serta pihak-pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu.

Akhirnya penulis menyadari bahwa tulisan ini jauh dari sempurna. Semoga skripsi ini dapat menjadi informasi yang berharga bagi dunia veteriner.

Surabaya, 23 Oktober 2007

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PERNYATAAN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar belakang penelitian	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Landasan Teori	4
1.4. Tujuan Penelitian	6
1.5. Manfaat Penelitian	7
1.6. Hipotesis	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1. <i>Chlorella</i>	8
2.1.1. Klasifikasi <i>Chlorella</i>	8
2.1.2. Morfologi <i>Chlorella</i>	8
2.1.3. Kandungan gizi umum <i>Chlorella</i>	9
2.1.4. Kandungan protein <i>Chlorella</i>	10
2.1.5. Hubungan <i>Chlorella</i> dan kekebalan tubuh	11
2.2. Ayam petelur	11
2.3. Sistem pencernaan ayam	13
2.3.1. Proses metabolisme protein pakan.....	14
2.4. Pakan ayam petelur	15
2.5. <i>Avian Influenza</i>	17
2.5.1. Virus <i>Avian Influenza</i>	17
2.5.2. Vaksinasi <i>Avian Influenza</i>	17
2.6. Kekebalan tubuh ayam	19
2.6.1. Kekebalan humoral dan sintesis antibodi.....	19
2.6.2. Kekebalan mukosal pada saluran pencernaan.....	22
2.6.3. Struktur dan fungsi IgA.....	23
2.6.4. Transport IgA.....	25
2.6.5. Sel M (Microfold cell).....	26
2.7. <i>Ileum</i>	27
BAB 3 MATERI DAN METODE	29
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	29
3.2. Bahan dan Materi Penelitian	29
3.2.1. Bahan penelitian	29
3.2.2. Alat penelitian	31

3.3. Metode Penelitian	31
3.3.1. Perlakuan hewan coba	31
3.3.2. Metode perlakuan hewan coba	32
3.3.3. Panen dan pengambilan sampel	33
3.3.4. Metode Imunositokimia.....	33
3.3.5. Metode penghitungan IgA	34
3.4. Rancangan Penelitian	35
3.5. Peubah Yang Diamati	35
3.6. Analisis Data	35
 BAB 4 HASIL PENELITIAN.....	 37
4.1. Jumlah ekspresi IgA di <i>ileum</i>	37
 BAB 5 PEMBAHASAN	 41
 BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....	 46
6.1. Kesimpulan.....	46
6.2. Saran.....	46
 RINGKASAN	 47
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN	53

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Analisis umum kandungan zat gizi <i>Chlorella</i>	9
2.2. Susunan Asam Amino <i>Chlorella</i>	10
3.1. Jadwal Vaksinasi AI	32
3.2. Metode perlakuan hewan coba	32
4.1. Rata-rata dan simpangan baku jumlah sel yang mengekspresikan IgA di <i>ileum</i> dari enam perlakuan ayam petelur	37
4.2. Total rata-rata dan simpangan baku jumlah sel yang mengekspresikan IgA di <i>ileum</i> dari perlakuan perbedaan persentase protein pakan	38
4.3. Total rata-rata dan simpangan baku jumlah sel yang mengekspresikan IgA di <i>ileum</i> dari perlakuan perbedaan persentase suplementasi <i>crude chlorella</i>	39

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Proses induksi respon imun intestinal	26
2.2. Struktur histologis <i>ileum</i>	28
4.1. Rata-rata dan simpangan baku jumlah sel yang mengekspresikan IgA di <i>ileum</i> dari enam perlakuan ayam petelur	40

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kandungan nutrisi pada pakan jadi CP 524-2 untuk ayam petelur	53
2. Perhitungan jumlah komposisi pakan	54
3. Hasil analisis proksimat pakan rendah protein	55
4. Hasil analisis dengan <i>Univariate</i> ANOVA terhadap jumlah ekspresi IgA di <i>ileum</i> ayam petelur yang diberi suplementasi <i>crude chlorella</i> dan divaksinasi <i>Avian Influenza</i>	56
5. Prosedur pembuatan sediaan Imunositokimia	61
6. Foto-foto preparat Imunositokimia	65
7. Skema preparat Imunositokimia	67
8. Mikroskop dan counter untuk penghitungan jumlah ekspresi IgA di <i>ileum</i>	68

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Penelitian

Avian Influenza (AI) merupakan salah satu penyakit viral yang sangat merugikan pada peternakan ayam petelur. Virus H5N1 yang merupakan penyebab terjangkitnya AI berdampak pada kematian ternak, bahkan dapat menular ke manusia (WHO, 2006). Usaha pengendalian dengan vaksinasi AI tetap diyakini sebagai cara yang cukup efektif mencegah serangan penyakit AI di peternakan unggas, tetapi vaksinasi juga mempunyai efek negatif, yaitu menimbulkan stress bagi unggas yang divaksinasi.

Peranan peternakan unggas, khususnya ayam petelur, selayaknya mendapatkan perhatian khusus, mengingat fungsinya sebagai penyedia kebutuhan telur. Usaha ini perlu menerapkan sistem pemeliharaan yang tepat karena ayam petelur mudah terkena stress. Sudarmono (2003) mengemukakan ayam jenis ini sangat peka terhadap perubahan lingkungan, kondisi ini memungkinkan terbentuknya stress. Stress dapat mengakibatkan penurunan pertumbuhan, konversi pakan, fertilitas, daya tetas telur, respon imun dan daya hidupnya (Bains, 1996).

Defisiensi salah satu zat makanan sangat berdampak pada kelangsungan produktivitas ayam petelur. Anggorodi (1985) mengemukakan bahwa proses metabolisme, termasuk penyusunan enzim dan hormon memiliki korelasi positif dengan defisiensi protein. Protein pun diperlukan dalam perkembangan organ yang berperan pada sistem kekebalan, baik

kekebalan seluler maupun humoral. Hal ini dimungkinkan karena protein merupakan bahan penyusun sel dan antibodi (Tillman dkk., 1991).

Peternak unggas pasti merasa cemas apabila peliharaannya mengalami stress. stress yang berkepanjangan dapat berdampak pada inkoordinasi aktivitas metabolisme tubuh, termasuk defisiensi protein yang dapat menyebabkan penurunan kekebalan tubuh. Stress dalam segala bentuk selalu menimbulkan banyak kesulitan pada peternakan unggas (Wahyu, 1985).

Pakan basal adalah pakan ternak yang memiliki kandungan nutrisi yang sesuai dengan kebutuhan nutrisi ternak dan fase hidup ternak. Pada ayam petelur fase layer, kandungan protein yang diberikan pada pakan ternak 18-19%, sedangkan pakan rendah protein adalah pakan ternak yang memiliki kandungan protein < 18%, yang dapat menyebabkan defisiensi protein pada ternak. Defisiensi protein pada dasarnya dapat diatasi dengan pemberian suplementasi yang tepat dalam pakan ayam petelur. Pemberian suplementasi pada hewan adalah pemberian zat-zat yang secara alami sudah terkandung dalam pakan, tetapi jumlahnya perlu ditingkatkan dan diberikan bersama pakan, misalnya vitamin, mineral, maupun asam amino (Kromo, 2007).

Akhir-akhir ini, banyak peneliti yang berupaya menggali potensi sejenis ganggang hijau sebagai pakan suplementasi yang diberikan bersama dengan pakan ternak. *Chlorella* adalah ganggang hijau bersel tunggal yang hidup berkoloni, bahan ini dapat digunakan sebagai suplementasi pada ternak karena disinyalir mengandung protein, karbohidrat dan lemak masing-masing adalah 60,5%, 20,1%, dan 11,0%, *chlorella* pun mengandung multivitamin

dan mineral (Steenblock, 2000). Pada akhir tahun 1800, peneliti Jerman mengemukakan bahwa *chlorella* mengandung klorofil dalam konsentrasi yang tinggi. Senyawa-senyawa inilah yang pada awalnya diyakini dapat bertindak sebagai *immunostimulant* (Tse, 2000). Oleh sebab itu diasumsikan pemberian *chlorella* dalam pakan sebagai suplementasi pada ternak ayam petelur mampu meningkatkan terbentuknya imunitas seiring dengan program vaksinasi, terutama vaksinasi AI dan pada keadaan defisiensi protein.

Hal ini sangat terkait dengan aktivitas imunitas yang ada pada mukosa *ileum* ayam. Ayam memiliki aktivitas imunitas mukosa yang dapat mengekspresikan antibodi atau imunoglobulin. Aktivitas imunitas mukosa memiliki peranan penting sebagai benteng pertahanan pertama melawan virus, bakteri maupun mikroba patogen yang lain. Imunoglobulin A dapat ditemukan pada permukaan mukosa dari paru-paru dan saluran pencernaan. Imunoglobulin A adalah imunoglobulin yang dominan diproduksi oleh sel B di *Peyer's patch*, tonsil, dan jaringan limfoid submukosal lainnya (Parslow T.G. et al., 2001). Tonsil dan *Peyer Patch* terdiri dari jaringan limfe yang relatif terorganisasi, mempunyai semua komponen yang dibutuhkan untuk menyusun tanggap kebal, yaitu sel T, sel B dan makrofag. IgA banyak dibentuk di dalam simpul limfe yang tersebar dan di dalam sel plasma yang terisolasi yang dapat ditemukan pada dinding usus, di dalam kelenjar ludah dan di dalam kantung empedu (Tizard, 1987). *Peyer's Patch* ditemukan berlokasi di mukosa dan meluas hingga submukosa dari usus halus terutama *ileum* (Bowen, 2004).

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, rumusan masalah yang dikemukakan dalam penelitian ini adalah :

1. Apakah suplementasi *crude chlorella* yang diberikan bersama pakan rendah protein mampu meningkatkan jumlah sel yang mengekspresikan IgA di *ileum* ayam petelur yang divaksin AI ?
2. Apakah suplementasi *crude chlorella* mampu meningkatkan jumlah sel yang mengekspresikan IgA di *ileum* ayam petelur yang divaksin AI ?
3. Apakah pakan rendah protein dapat menurunkan jumlah sel yang mengekspresikan IgA di *ileum* ayam petelur yang divaksin AI ?

1.3. Landasan Teori

Protein adalah zat makanan yang sangat mendapat perhatian khusus dalam penyusunan pakan. Bersama-sama dengan karbohidrat, lemak, vitamin, dan mineral, protein sangat dibutuhkan untuk proses pertumbuhan maupun pemeliharaan tubuh. Adanya perubahan secara kuantitatif dan kualitatif terhadap komponen unsur gizi, terutama protein, secara nyata berpengaruh terhadap sistem imun. Keadaan defisiensi atau kelebihan unsur gizi dapat mempengaruhi sintesis molekul yang berfungsi mengatur imunitas (Dubey and Yunis, 1996).

Protein yang jumlahnya terus berkurang akan mengakibatkan melemahnya mekanisme pertahanan seluler dan pada akhirnya berdampak

pada penurunan produksi antibodi (Maynard *et al.*, 1979 ; Woodward, 1998). Pada kondisi ini jumlah limfosit T, limfosit B, sel plasma dan antibodi akan menurun (Keith and Jeejebhoy, 1997). Pada penderita yang mengalami defisiensi protein dapat pula terjadi penurunan jumlah immunoglobulin (IgG, IgA, IgM), maupun komplemen C3 dan C4 serta limfosit (Valbuena *et al.*, 1996).

Chlorella adalah termasuk tumbuhan air bersel satu yang memiliki kandungan 19 macam asam amino, yaitu : lisin, leusin, isoleusin, treonin, valin, metionin, fenilalanin, triptofan, histidin, arginin, asam aspartat, serin, asam glutamat, prolin, glisin, alanin, sistein, tirosin dan ornitin. Kandungan protein secara umum dalam *chlorella* adalah 60,5% (Steenblock, 2000). *Arginin* yang terkandung dalam *chlorella* sebesar 3.64% (Steenblock, 2000), mampu memicu aktivitas sel T helper. Lebih lanjut, adanya sel T helper akan menstimulus sekresi sitokin yang berdampak pada proliferasi dan diferensiasi sel B. Kondisi ini pada akhirnya mampu meningkatkan titer antibodi (Abdulakalykova dan Ruiz, 2006).

Kastono (1992) yang dikutip dari Wirosaputro (1998) mengemukakan bahwa dinding sel tumbuhan yang utuh diperlukan sebagai salah satu perangsang sistem kekebalan tubuh, menyerap kolesterol, menyerap racun dan merangsang aktivitas limfosit di dinding usus. Tebal dinding sel *chlorella* sekitar 14 nm ($1\text{nm} = 10^{-9}\text{ m}$). Dinding sel *chlorella* mengandung protein, lemak, alfa selulosa, hemi selulosa, glukosamin dan abu. Masing-masing sebesar 27%, 9,2%, 15,4%, 31%, 3,3% dan 5,2% (Northcote, dkk., 1958

dikutip dari Wirosaputro, 1998). Aktivitas limfosit yang berada di dinding usus akan mampu menginduksi proliferasi dan diferensiasi sel B yang kemudian memproduksi Immunoglobulin A.

Imunoglobulin A adalah imunoglobulin yang banyak mengandung karbohidrat berstruktur konvensional. Zat itu cenderung untuk membentuk polimer sedemikian sehingga terdapat dimer 11 S, trimer 13 S atau polimer yang lebih tinggi di samping molekul dasar 7 S. Komponen yang paling sering terdapat yaitu dimer yang terdiri dari dua unit 7 S yang dihubungkan oleh rantai J. Immunoglobulin A adalah imunoglobulin yang dominan diproduksi oleh sel B di *Peyer's patch*, tonsil, dan jaringan limfoid submukosal lainnya (Parslow T.G. *et al.*, 2001). Tonsil dan *Peyer Patch* terdiri dari jaringan limfe yang relatif terorganisasi, mempunyai semua komponen yang dibutuhkan untuk menyusun tanggapan kebal, yaitu sel T, sel B dan makrofag. IgA banyak dibentuk di dalam simpul limfe yang tersebar dan di dalam sel plasma yang terisolasi yang dapat ditemukan pada dinding usus, di dalam kelenjar ludah dan di dalam kantung empedu (Tizard, 1987).

1.4. Tujuan Penelitian

- a. Membuktikan bahwa suplementasi *crude chlorella* yang diberikan bersama pakan rendah protein mampu meningkatkan jumlah sel yang mengekspresikan IgA di *ileum* ayam petelur yang divaksin AI

- b. Membuktikan bahwa suplementasi *crude chlorella* mampu meningkatkan jumlah sel yang mengekspresikan IgA di *ileum* ayam petelur yang divaksin AI
- c. Membuktikan bahwa pemberian pakan rendah protein dapat mengakibatkan penurunan jumlah sel yang mengekspresikan IgA di *ileum* ayam petelur yang divaksin AI

1.5. Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk memberi informasi secara langsung kepada petani peternak bahwa *crude chlorella* dapat bermanfaat sebagai suplementasi pakan yang efektif sehingga diharapkan dapat meningkatkan kekebalan tubuh ayam petelur yang divaksinasi *Avian Influenza* .

1.6. Hipotesis

Hipotesis yang diajukan pada penelitian ini adalah :

1. Suplementasi *crude chlorella* yang diberikan bersama pakan rendah protein mampu meningkatkan jumlah sel yang mengekspresikan IgA di *ileum* ayam petelur yang divaksin AI.
2. Suplementasi *crude chlorella* mampu meningkatkan jumlah sel yang mengekspresikan IgA di *ileum* ayam petelur yang divaksin AI
3. Pakan rendah protein dapat menurunkan jumlah sel yang mengekspresikan IgA di *ileum* ayam petelur yang divaksin AI.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Chlorella*

2.1.1. Klasifikasi *Chlorella*

Chlorella dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Division	: <i>Chlorophyta</i>
Subphilum	: <i>Algae</i>
Klas	: <i>Chlorophyceae</i>
Ordo	: <i>Chlorococcaceae</i>
Familia	: <i>Oocystaceae</i>
Genus	: <i>Chlorella</i>
Species	: <i>Chl. vulgaris, Chl. pyrenoidosa, Chl. conglomerata, Chl. simplek, Chl. ellipsoides, Chl. miniata, Chl. variegata, Chl. parasita, Chl. corduktrik.</i>

(Sumber : Anonimous, 2007)

2.1.2. Morfologi *Chlorella*

Chlorella adalah salah satu jenis ganggang hijau (*green algae*). Ganggang hijau merupakan satu kumpulan tumbuhan bersel satu, berkoloni, atau bersel banyak, tidak mempunyai akar, batang, atau daun sebenarnya (Steenblock, 2000).

Chlorella memiliki bentuk bervariasi, disamping bentuk bulat ada juga yang bentuknya bulat lonjong dengan ukuran diameter 2-8 mikron (1 mikron setara 0,001 milimeter) mempunyai inti dan bersel tunggal. Ukuran diameter inti sel *chlorella* sekitar 0,3-0,5 mikron. *Chlorella* berkembang biak secara aseksual dengan cara membelah diri dan membentuk autospora (Suriawiria, 2002). *Chlorella* dapat juga dibiakkan dalam medium sederhana dengan waktu pembelahan yang relatif singkat, sekitar 4-14 jam.

2.1.3. Kandungan gizi umum *Chlorella*

Chlorella memiliki kandungan zat gizi yang cukup tinggi. Analisis umum kandungan zat gizi *chlorella* dapat dilihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1. Analisis Umum Kandungan Zat Gizi *Chlorella*

Kandungan	Kadar (%)
Air	3,6
Protein	60,5
Lemak	11,0
Serat	0,2
Karbohidrat	20,1
Abu	4,6
Kalori (kal)	421,0
Abu	4,6

(Sumber : Steenblock, 2000).

2.1.4. Kandungan protein *Chlorella*

Chlorella memiliki 19 macam asam amino, yaitu : lisin, leusin, isoleusin, treonin, valin, metionin, fenilalanin, triptofan, histidin, arginin, asam aspartat, serin, asam glutamat, prolin, glisin, alanin, sistein, tirosin dan ornitin. Sepuluh macam asam amino dalam *chlorella* merupakan asam amino essensial, yaitu arginin, histidin, lisin, leusin, isoleusin, treonin, valin, metionin, fenilalanin, dan triptofan.

Tabel 2.2. Susunan Asam Amino *Chlorella*

Jenis	Kadar (%)
Lisin*	3,46
Leusin*	5,26
Isoleusin*	2,63
Treonin*	2,70
Valin*	3,64
Metionin*	1,45
Fenilalanin*	3,08
Triptofan*	0,59
Histidin*	1,29
Arginin*	3,64
Asam aspartat	5,20
Serin	2,78
Asam glutamat	6,29
Prolin	2,93
Glisin	3,40
Alanin	4,80
Sistein	0,38
Tirosin	2,09
Ornitin	0,06

Keterangan : * = asam amino essensial .

(Sumber : Steenblock, 2000).

2.1.5. Hubungan *Chlorella* dan kekebalan tubuh

Chlorella mempunyai keunggulan dalam hal gizi dan kesehatan. Keduanya berperan untuk meningkatkan kesehatan secara alami. Pada sel-sel yang sehat, *chlorella* berperan untuk merawat dan meningkatkan fungsinya. Secara umum *chlorella* berkemampuan untuk membangun jaringan yang rusak, merangsang dan meningkatkan kekebalan tubuh alami, membersihkan limbah beracun dalam sel tubuh, menyeimbangkan keadaan yang tidak normal, meningkatkan fungsi organ-organ yang kurang aktif, menormalkan kondisi organ yang menyimpang. *Chlorella* berperan dalam merangsang kekebalan tubuh, yang berperan dalam hal ini adalah dinding sel *chlorella*. Dinding sel *chlorella* memiliki tebal sekitar 14 nm ($1\text{nm} = 10^{-9}\text{ m}$) dan komposisinya terdiri dari protein 27%, lemak 9,2%, alfa selulosa 15,4%, hemi selulosa 31%, glukosamin 3,3% dan abu 5,2% (Wirosaputro, 1998). Dinding sel yang utuh diperlukan sebagai salah satu perangsang sistem kekebalan tubuh, menyerap kolesterol, menyerap racun dan merangsang limfosit dinding usus, sehingga mampu pula merangsang sistem kekebalan mukosa usus (Kastono, 1992 dikutip dari Wirosaputro, 1998).

2.2. Ayam Petelur

Ayam petelur yang memiliki nama latin *Gallus domesticus* adalah keturunan ayam hutan. Taksonomi ayam petelur adalah seperti di bawah ini :

Filum : Chordata
Subfilum : Vertebrata

Kelas	: Aves
Subkelas	: Neornithes
Ordo	: Galliformes
Genus	: Gallus
Spesies	: <i>Gallus domesticus</i>

(Sumber : Supriyatna, dkk., 2005).

Karakteristik ayam petelur adalah memiliki sifat mudah terkejut atau *nervous*, bentuk tubuh ramping, cuping telinga berwarna putih dan kerabang telur berwarna putih. Produksi telurnya bisa mencapai 200 butir/ekor/tahun, tidak memiliki sifat mengeram dan efisien dalam penggunaan pakan (Supriyatna, dkk., 2005).

Sifat-sifat unggul ayam petelur antara lain, pada umur 4,5-5 bulan telah mengalami dewasa kelamin dengan bobot badan antara 1,6-1,7 kg. Produksi ayam petelur cukup tinggi yaitu antara 250-280 butir/tahun, dengan bobot telur sekitar 50-60 gram. Nilai konversi pakan ayam petelur cukup bagus, yaitu sekitar 2,2-2,5, yang artinya setiap 2,2-2,5 kg pakan yang dikonsumsi mampu menghasilkan telur 1 kg. Periode bertelurnya bisa mencapai 13-14 bulan, jadi meskipun periode bertelurnya cuma sekali tetapi sangat panjang dan produktif, karena tidak ada periode pengeraman.

Kelemahan ayam petelur adalah sangat mudah terpengaruh terhadap perubahan kondisi lingkungan, sehingga lebih mudah mengalami stress. Ayam

petelur juga selalu menuntut pakan dan air minum dengan kualitas yang tinggi, sehingga harus ditenakkan secara intensif (Sudarmono, 2003).

2.3. Sistem Pencernaan Ayam

Pencernaan adalah penguraian bahan makanan kompleks menjadi bahan makanan yang lebih sederhana di dalam saluran pencernaan, sehingga dapat diserap dan digunakan oleh jaringan-jaringan tubuh. Pada pencernaan tersangkut serangkaian proses mekanis dan kimia, serta dipengaruhi oleh banyak faktor (Anggorodi, 1985). Sistem pencernaan terdiri dari saluran pencernaan dan organ asesori. Saluran pencernaan merupakan organ yang menghubungkan dunia luar dengan dunia dalam tubuh hewan, yaitu proses metabolik di dalam tubuh. Saluran pencernaan ayam terdiri dari mulut, esofagus, tembolok, proventrikulus, ventrikulus, *duodenum*, usus halus, sekum, rektum, dan kloaka. Sementara organ asesori terdiri dari pankreas dan hati (Supriyatna dkk., 2005).

Ayam mengambil makanannya dengan paruh. Makanan tersebut berjalan dari esofagus untuk kemudian disimpan dalam tembolok untuk kemudian dilunakkan dan dicampur dengan getah pencernaan di proventrikulus yaitu *hydrochloric acid* dan *pepsin*, dan kemudian di giling di ventrikulus. Tidak ada enzim pencernaan yang dikeluarkan oleh ventrikulus. Fungsi utama alat tersebut adalah untuk memperkecil ukuran partikel-partikel makanan. Dari ventrikulus, makanan bergerak melalui lekukan usus yang disebut *duodenum*, yang secara anatomis sejajar dengan pankreas. Pankreas

mempunyai fungsi penting dalam pencernaan ayam seperti halnya pada spesies-spesies lainnya. Pankreas menghasilkan getah pankreas dalam jumlah banyak yang mengandung enzim-enzim amilolitik, lipolitik dan proteolitik. Enzim-enzim tersebut berturut-turut menghidrolisa pati, lemak, *proteosa* dan *pepton*. Bahan makanan bergerak melalui usus halus yang dindingnya mengeluarkan getah usus dan memiliki gerakan peristaltik. Getah usus tersebut mengandung *erepsin* dan beberapa enzim yang memecah gula. *Erepsin* menyempurnakan pencernaan protein, dan menghasilkan asam-asam amino, enzim yang memecah gula mengubah *disakarida* ke dalam gula-gula sederhana (*monosakarida*) yang kemudian dapat diasimilasi tubuh. Penyerapan dilaksanakan melalui vili usus halus. Urine pada unggas mengalir kedalam kloaka dan dikeluarkan bersama-sama dengan feses. Warna putih yang terdapat pada kotoran ayam sebagian besar adalah asam urat, sedang nitrogen urin mamalia adalah urea. Saluran pencernaan yang relatif pendek pada unggas digambarkan sebagai proses pencernaan yang relatif cepat (lebih kurang empat jam) (Anggorodi, 1985; Sainsbury, 2000).

2.3.1. Proses metabolisme protein pakan

Pencernaan atau metabolisme protein pakan menghasilkan asam-asam amino yang lebih lanjut akan berperan dalam produksi enzim, hormon, komponen struktural, protein darah, sel-sel badan dan jaringan yang lainnya. Sintesis protein terjadi dengan memanfaatkan asam-asam amino yang tersedia. Protein disintesis dari 20 macam asam amino, 10 macam di antaranya merupakan asam-asam amino esensial (yang tidak dapat disintesis oleh tubuh),

sedangkan sisanya merupakan asam-asam amino non esensial (dapat disintesis oleh tubuh).

Protein dalam pakan setelah masuk ke dalam saluran pencernaan akan mengalami perombakan oleh enzim-enzim hidrolitik. Protein ini akan mengalami denaturasi dalam proventrikulus, selanjutnya akan dirombak dalam usus halus oleh *tripsin*, *kimotripsin* dan oleh enzim-enzim *elastase*, *aminopeptidase*, *karboksipeptidase* dan *peptidase-peptidase* yang khas dalam rongga atau mukosa usus halus menjadi asam-asam amino. Selanjutnya asam-asam amino ini diserap masuk ke peredaran darah (Wahju, 1985; Tillman dkk., 1991; Lehninger, 1997).

2.4. Pakan Ayam Petelur

Pakan merupakan bahan makanan yang berasal dari tumbuh-tumbuhan, hewan ataupun bahan lain yang diberikan kepada ternak. Pakan dibuat dari beberapa bahan baku makanan dari berbagai sumber, yang disusun dengan cara-cara tertentu, kandungan nutrisinya disesuaikan dengan kebutuhan ayam (Sudarmono, 2003). Menurut Supriyatna dkk. (2005), pakan adalah campuran berbagai macam bahan organik dan anorganik yang diberikan kepada ternak untuk memenuhi kebutuhan zat-zat makanan yang diperlukan bagi pertumbuhan, perkembangan dan reproduksi. Agar pertumbuhan dan produksi maksimal, jumlah dan kandungan zat-zat makanan yang diperlukan ternak harus memadai. Anggorodi (1985) mendefinisikan pakan sebagai makanan yang disediakan bagi hewan untuk 24 jam. Suatu

pakan seimbang menyediakan semua zat makanan yang dibutuhkan untuk memberi makan hewan selama 24 jam.

Sudarmono (2003) berpendapat bahwa pakan bagi ayam *starter*, remaja, dewasa kesemuanya harus memenuhi dua persyaratan yaitu teknis dan ekonomis. Secara teknis pakan yang diberikan harus memenuhi persyaratan sebagai berikut; mengandung semua nutrisi yang diperlukan ayam dalam imbang yang serasi, lebih-lebih kandungan protein dan energinya, sebagian besar bahan di dalam pakan mudah dicerna, bahan baku yang digunakan dalam penyusunan pakan tidak cacat, tidak tengik, tidak berjamur, tidak lembab, tidak bergumpal, tidak berbau, dan tidak dipalsukan dengan bahan-bahan lain. Secara ekonomis atau dari segi harga, pakan tersebut tidak terlampaui mahal, sehingga peternak masih dapat menikmati keuntungan.

Pakan basal adalah pakan ternak yang memiliki kandungan nutrisi yang sesuai dengan kebutuhan nutrisi ternak dan fase hidup ternak. Pada ayam petelur fase layer, kandungan protein yang diberikan pada pakan ternak $\pm 18\%$ - 19% , sedangkan pakan rendah protein adalah pakan ternak yang memiliki kandungan protein $< 18\%$, yang mampu menyebabkan defisiensi protein pada ternak.

Banyak penelitian mengenai kebutuhan protein ayam petelur menunjukkan bahwa ayam petelur yang diberikan pakan dengan kandungan protein kasar 14% memiliki pengaruh yang signifikan jelek terhadap performa produksi dari pada ayam petelur yang diberi pakan dengan kandungan protein kasar 16% dan 18% (Bunchasak *et al.*, 2005). Gheng Zou

dan Wu (2005) melaporkan bahwa protein memiliki pengaruh yang signifikan pada produksi telur, berat telur, dan konversi pakan.

2.5. Avian Influenza

2.5.1. Virus Avian Influenza

Virus AI merupakan virus *Influenza A* yang menginfeksi unggas. Selain unggas, virus *Influenza A* dapat juga menginfeksi beberapa spesies mamalia, meskipun yang dipercayai sebagai inang alamiahnya yang bertindak sebagai penyimpan (*reservoir*) adalah unggas air liar yang termasuk dalam ordo *Anseriformes* dan *Caradriformes* (Suarez *et al.* 1998).

Virus AI merupakan virus poligenik yang mempunyai struktur terdiri dari 8 gen yaitu gen hemagglutinin (HA); neuraminidase (NA); *polymerase acidic* (PA); *polymerase basic 1* (PB1); *polymerase basic 2* (PB2); nukleoprotein (NP); matriks (M); dan gen non-struktural (NS), serta menghasilkan 10 macam protein.

Struktur asam amino protein HA dapat digunakan untuk menentukan sifat virulensi, dan bersama dengan protein NA digunakan untuk menentukan sub tipe virus *Influenza*. Protein HA melakukan perlekatan dengan reseptor sel inang. Antibodi terhadap protein HA dan NA bekerja menetralkan virus melalui blokade ikatan protein HA dan menginaktifkan enzim *neuraminidase*.

2.5.2. Vaksinasi Avian Influenza

Vaksinasi adalah cara untuk merangsang pembentukan kekebalan tubuh terhadap suatu penyakit. Prinsip proses vaksinasi adalah memberikan

infeksi buatan dengan maksud mengaktifkan sel-sel kekebalan tubuh untuk melawan antigen yang dimasukkan ke tubuh.

Vaksinasi melawan AI telah terbukti sukses menjadi parameter kontrol tambahan yang terlaksana disamping diadakannya pembunuhan unggas yang terkontrol (Italy (H7N1 & H7N3), Mexico (H5N2), Pakistan (H7N3), Hong Kong (H5N1), Vietnam (H5N1) dan Indonesia (H5N1)).

Kebijakan penetapan vaksinasi ada dua garis besar, yaitu : Yang pertama mampu mereduksi kemungkinan infeksi, sehingga dibutuhkan dosis yang lebih tinggi dari virus untuk menginfeksi unggas yang telah divaksinasi. Yang kedua, mampu menurunkan secara signifikan jumlah virus yang terpapar pada unggas yang telah terinfeksi, sehingga mampu pula menurunkan jumlah virus yang mengkontaminasi lingkungan sekitarnya dan unggas yang lain. Dan mampu pula mengurangi resiko tertular pada pekerja kandang dan orang yang berhubungan dengan unggas.

Vaksin AI inaktif dibuat dengan cara menumbuhkan virus *Influenza* pada telur ayam berembrio dan diinaktivasi secara kimiawi. Selanjutnya antigen viral yang terinaktivasi diformulasi dengan emulsi minyak adjuvan untuk merangsang respons imun. Keampuhan vaksin tergantung dari antigen vaksin dan virus lapangan dari tipe H yang sama (*homologous haemagglutinin*) (Breytenbach, 2005).

2.6. Kekebalan Tubuh Ayam

2.6.1. Kekebalan humoral dan sintesis antibodi

Sistem kekebalan tubuh ayam dapat dibagi dalam dua komponen, yang pertama adalah Thymus, yaitu sepasang kelenjar berlobus yang berada di sepanjang leher dari ayam yang menjadi sumber dari sel T. Komponen kedua adalah Bursa Fabricius, yaitu sebuah organ yang berada di dorsal dari kloaka yang menjadi sumber dari sel B yang membentuk sel plasma dan memproduksi antibodi (Riddell, 2007).

Respons imun humoral sebagai akibat kontak tubuh dengan antigen ditandai dengan disintesisnya antibodi oleh sel plasma. Antibodi disintesis dan disekresikan ke luar sel oleh sel plasma atau AFC (*Antibody Forming Cells*) yang merupakan hasil pembelahan dan diferensiasi sel B setelah terjadi aktivasi akibat pengenalan terhadap antigen.

Respons imun primer adalah respons imun yang berkembang untuk pertama kalinya setelah tubuh kontak dengan antigen dan ditandai dengan dihasilkannya antibodi IgM sebagai antibodi yang muncul pertama kali yang kemudian diikuti oleh IgG. Pada respons imun sekunder setelah kontak dengan antigen yang sama berikutnya ditandai dengan dihasilkannya antibodi IgG sebagai antibodi yang dominan. Dibanding respons imun primer, kadar antibodi yang dihasilkan pada respons imun sekunder jauh lebih besar (Roitt *et al.*, 2003).

Antigen yang masuk ke dalam tubuh akan dipresentasikan ke limfosit oleh sel-sel yang disebut APC (*Antigen Presenting Cells*) dalam bentuk *Major*

Histocompatibility Complex-II (MHC-II) yang dikenal oleh limfosit T-helper, karena T-helper tak mampu mengenal antigen bebas. Presentasi antigen atau fragmen antigen oleh APC dan adanya sel T teraktivasi diperlukan untuk proses aktivasi dan diferensiasi sel B menjadi sel plasma yang dapat mensintesis dan mensekresikan antibodi. Sel B diaktivasi oleh antigen atau fragmen antigen pada permukaan APC dengan adanya interleukin -1 (IL-1) yang dihasilkan oleh APC dan interleukin -4 (IL-4) yang dihasilkan oleh sel T (Roitt *et al.*, 2003).

Dibandingkan dengan respons antibodi primer, respons imun sekunder menunjukkan peningkatan kadar dan afinitas antibodi yang lebih tinggi. Hal ini dimungkinkan karena ada kemampuan “mengingat” dari sel memori. Ingatan ini tidak ditentukan pada respons imun sekunder terhadap antigen yang tidak tergantung sel T atau T-independent. Antigen tak tergantung sel T dapat menginduksi respons imun primer tanpa peran sel T, respons imun sekunder yang timbul setelah kontak dengan antigen yang sama tidak menunjukkan peningkatan kadar antibodi yang berarti karena mirip dengan respons imun primer (Roitt *et al.*, 2003).

Imunoglobulin yang baru disintesis memiliki sifat yang dapat mengenali antigen yang merangsang sintesisnya dan berikatan erat membentuk kompleks antigen-antibodi. Peningkatan imunoglobulin atau antibodi terjadi pada keadaan infeksi kronis, penyakit parasitik dan kelainan autoimun. Sedangkan penurunan imunoglobulin atau antibodi dijumpai pada

penyakit defisiensi umum, serta pada malnutrisi protein diet (Murray *et al.*, 1993).

IgA dibuat oleh sel plasma di dalam jaringan limfoid yang berhubungan dengan usus dalam menanggapi rangsangan antigen setempat. Sebagian besar IgA langsung berdifusi ke dalam lumen usus, sewaktu berdifusi, IgA bergabung dengan komponen sekretori yang dibuat oleh sel epitel usus. IgA juga berdifusi ke dalam sirkulasi porta dan dibawa ke hati dalam jumlah yang cukup. Hepatosit membuat komponen sekretori dan kemudian menggabungkannya ke dalam membran yang berlaku sebagai reseptor IgA. IgA yang berasal dari darah terikat pada hepatosit, diserap ke dalamnya dan melintasi sitoplasma hepatosit untuk dilepas ke dalam kanalikuli empedu. Empedu sangat kaya akan IgA, dan menjadi jalan utama bagi IgA untuk mencapai lumen usus. Hal ini diperkirakan menjadi jalan bagi materi asing yang terikat pada IgA yang bersirkulasi untuk dapat dihilangkan dari tubuh (Tizard, 1987).

Imunoglobulin A adalah imunoglobulin yang banyak mengandung karbohidrat berstruktur konvensional. Zat itu cenderung untuk membentuk polimer sedemikian sehingga terdapat dimer 11 S, trimer 13 S atau polimer yang lebih tinggi di samping molekul dasar 7 S. Komponen yang paling sering terdapat yaitu dimer yang terdiri dari dua unit 7 S yang dihubungkan oleh rantai J. Dalam serum hewan IgA merupakan imunoglobulin utama yang terdapat dalam sekresi eksternal tubuh. Itulah sebabnya IgA berperan sangat penting dalam perlindungan saluran-saluran intestinal, respirasi dan

urogenital, serta kelenjar susu dan mata, terhadap invasi mikroba. IgA tidak mengaktivasi kaskade komplemen dan juga tidak bertindak sebagai opsonin, tetapi dapat mengaglutinasi partikulat antigen dan menetralkan virus. Diperkirakan cara kerja IgA adalah mencegah melekatnya antigen pada permukaan tubuh (Tizard, 1987).

2.6.2. Kekebalan mukosa pada saluran pencernaan

Saluran pencernaan dapat dimungkinkan sebagai tempat utama rangsangan antigen pada hewan. Respons imun humoral mukosa dimulai oleh antigen yang masuk ke epitel mukosa usus yang bertindak sebagai APC, yang kemudian akan mempresentasikan antigen tersebut di permukaan sel bersama molekul MHC-II untuk dikenal oleh limfosit Th atau bersama molekul MHC-I untuk dikenal oleh limfosit Tc. TCR (*T cell receptor*) spesifik mengenali epitop yang terikat pada MHC-II, kemudian terjadi aktivasi limfosit T CD4 (Th). Th menghasilkan sitokin IL-4 (Th2) untuk merangsang proliferasi, diferensiasi dan maturasi limfosit B menjadi sel plasma yang diakhiri dengan produksi antibodi. IgA adalah antibodi yang paling tepat untuk perlindungan terhadap patogen. Antigen juga dapat masuk melalui sel M, epitop yang terdapat dalam molekul antigen kemudian langsung mengikat antibodi yang sudah tersedia di permukaan membran sel plasma.

Imunoglobulin A adalah imunoglobulin yang dominan diproduksi oleh sel B di *Peyer's patch*, tonsil, dan jaringan limfoid submukosal lainnya (Parslow T.G.*et al.*, 2001). Tonsil dan *Peyer Patch* terdiri dari jaringan limfe

yang relatif terorganisasi, mempunyai semua komponen yang dibutuhkan untuk menyusun tanggapan kebal, yaitu sel T, sel B dan makrofag. IgA banyak dibentuk di dalam simpul limfe yang tersebar dan di dalam sel plasma yang terisolasi yang dapat ditemukan pada dinding usus, di dalam kelenjar ludah dan di dalam kantung empedu (Tizard, 1987). *Peyer's Patch* ditemukan berlokasi di mukosa dan meluas hingga submukosa dari usus halus terutama ileum (Bowen, 2004).

2.6.3. Struktur dan fungsi Immunoglobulin A

Salah satu karakteristik sistem imun mukosa adalah peran utama IgA dalam respons imun mukosa. IgA memiliki peranan penting dalam sistem sekretoris eksternal. Immunoglobulin sekretoris ini dihasilkan dalam kadar yang tinggi oleh jaringan limfoid yang melapisi gastrointestinal, respiratorius dan genitourinarius. Sekresi ini dikombinasikan dengan protein yang disebut komponen sekretori yang dapat mempermudah sekresi dan memiliki proteksi terhadap enzim proteolitik yang terdapat di daerah tersebut (Bellanti, 1993). Terdapat dua subkelas IgA, yaitu IgA1 dan IgA2. IgA1 merupakan subkelas terbanyak (80%) dari IgA yang berada di sirkulasi dan di mukosa. IgA2 banyak terdapat dalam cairan yang di sekresi, terutama di bagian distal saluran gastrointestinal (Putra, 1997).

IgA mempunyai tiga struktur yang berkaitan dengan fungsinya, yaitu polimerisasi IgA, komponen sekretori, dan Fc region.

- Polimerisasi IgA

Rantai H (*heavy*) IgA mempunyai sisa sistein (*cysteine*) ekstra yang berisi C-terminal. Keadaan ini memudahkan IgA berikatan dengan molekul bivalen atau multivalen, termasuk rantai J (*J chain*) yang diproduksi oleh limfosit B, menjadi IgA dimer atau trimer. Bentuk IgA polimer ini akan meningkatkan kemampuan mengikat dan mengaglutinasi antigen.

- Komponen sekretori

Hanya IgA bentuk dimer saja yang dapat berikatan dengan komponen sekretori (*secretory component* = SC) yang diproduksi oleh sel epitel, menjadi secretory IgA (SIgA). Bentuk SIgA menjadi lebih tahan terhadap enzim proteolitik, lebih mukofilik sehingga kemampuan mengikat patogen meningkat dan mencegah perlekatan patogen dengan permukaan epitel. SC bertindak sebagai reseptor transpor untuk IgA dan menjadi bagian dari molekul IgA. Hing region IgA kaya akan protein glikosilat (*proline-rich region*) menyebabkan IgA lebih tahan terhadap *protease*. Dengan adanya SC maka bentuk SIgA semakin stabil di lumen gastrointestinal dibanding imunoglobulin lain.

- Fc region

Fc region IgA (FcR IgA) tidak bereaksi dengan komplemen, kecuali IgA dalam bentuk polimer IgA atau kompleks imun berikatan dengan antigen. Bila ada antigen, IgA mempunyai efek

memudahkan fagositosis, efek tersebut menurun saat antigen menghilang. FcR IgA tidak dapat mengerahkan sel radang dan mediator kimia yang diperlukan dalam reaksi inflamasi. IgA yang bebas mempunyai efek anti inflamasi. FcR IgA dapat berikatan dengan *lactoferrin* dan *lactoperoxidase*, sehingga meningkatkan ketahanan tubuh non spesifik.

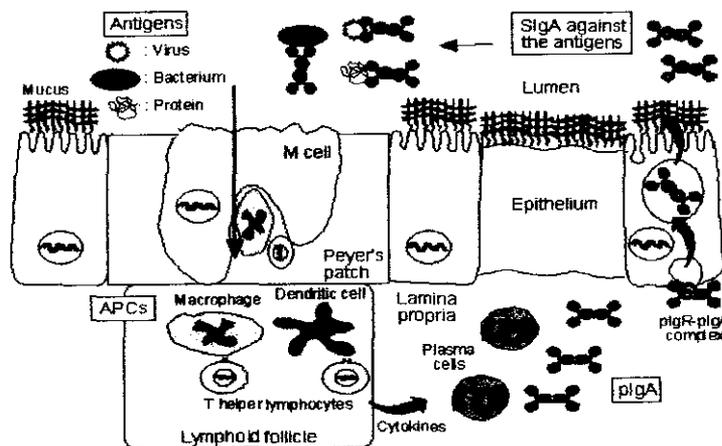
2.6.4. Transpor IgA

Secretory Component (SC) merupakan molekul yang penting bagi sistem transpor IgA. Transpor IgA diawali dengan ikatan IgA dimer dengan SC melalui ikatan kovalen di permukaan basolateral sel epitel, selanjutnya diikuti endositosis *secretory* IgA (SIgA) ke vesikel. Vesikel berisi SIgA bergerak ke apikal, dan melepas SIgA ke lumen usus. Sintesis SC tidak tergantung pada keberadaan IgA, biasanya jumlah SC melebihi kebutuhan untuk transportasi. Sintesis IgA di mukosa berbeda dengan di jaringan limfoid lain. Derivat sel di *Peyer's Patches* berpotensi untuk mengalami perubahan isotipe. Limfosit B IgM⁺ dapat berubah menjadi limfosit B IgA⁺, dengan bantuan sitokin IL-4 dan IL-5, hal ini tidak dapat terjadi pada limfosit B di jaringan limfoid lain, sedangkan limfosit T merupakan sel yang mempunyai kemampuan untuk mengalami perubahan isotipe. Regulasi sintesis IgA dilakukan oleh limfosit T yang mempunyai receptor Fc (FcR) spesifik untuk IgA (limfosit T IgA-FcR), yang dapat meningkatkan diferensiasi dan maturasi limfosit B IgA⁺ pada tahap setelah terjadi perubahan isotipe.

2.6.5. Sel M (*microfold cell*)

Sel M merupakan sel epitel pipih, terletak hanya di permukaan area *dome* diantara sel epitel lainnya, sangat sedikit mempunyai mikrovilli, mempunyai lapisan *glycocalix* tipis, sitoplasma kaya dengan vesikel pinositosis, tidak memiliki kemampuan proteolitik sebab tidak mempunyai lisosom dan tidak dapat mengekspresikan MHC-II. Antigen yang membangkitkan respons imun mukosa akan memasuki area *dome* melewati sel M dan mengalami beberapa kejadian, antara lain :

1. Antigen akan terikat dengan permukaan sel M,
2. Antigen masuk ke sel M melalui pinositosis / endositosis,
3. Vesikel yang berisi antigen melintas dari permukaan luar ke permukaan dalam sel M,
4. Antigen dilepas utuh ke area subepitelial.



Gambar 2.1. Proses induksi respons imun intestinal

(Sumber: Corthesy, 2006)

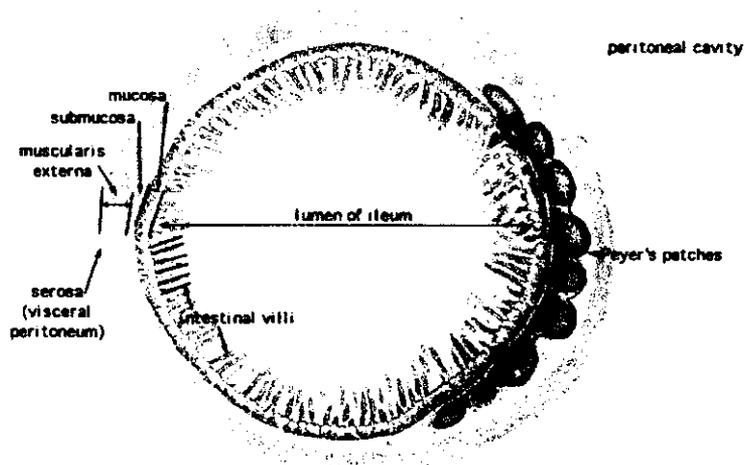
2.7. *Ileum*

Ileum adalah salah satu bagian dari usus halus. Secara keseluruhan usus halus terbagi atas tiga bagian : yang pertama adalah *duodenum*, bagian kedua adalah *yeyunum*, yang memiliki panjang dua perlima sisa usus halus, dan yang terakhir adalah *ileum* dengan panjang tiga perlima sisanya. *Ileum* tergantung pada dinding abdomen bagian posterior oleh mesenterium bersama *yeyunum*. *Ileum* terdiri atas empat lapisan atau tunika, yaitu:

1. Tunika mukosa
2. Tunika submukosa
3. Tunika muskularis
4. Tunika serosa (adventisia)

Hampir di semua bagian, mukosa nampak tidak beraturan dan terlihat tonjolan-tonjolan seperti jari yaitu vili yang memperluas daerah permukaan, serta invaginasi yang masuk ke dalam lamina propia disebut sebagai *kripta lieberkuhn*. Di dalam lamina propia terdapat banyak kapiler darah dan limfe yang berfungsi untuk menyerap bahan makanan. Tunika mukosa menghasilkan antibodi, terutama IgA, sebagai reaksi terhadap antigen dan mikroorganisme di dalam lumen usus. Hal ini dilakukan oleh jaringan limfatik yang terletak terutama di dalam lamina propia baik sebagai jaringan limfatik yang tersebar (*diffuse*), *nodulus solitar* atau *nodulus aggregatii*. Massa limfatik besar dapat meluas sampai ke submukosa. Jaringan limfatik yang tersebar di dalam lamina propia ditemukan mulai dari oesophagus hingga lambung dan usus, yang mengandung limfosit, sel plasma dan makrofag. IgA

sekresi dan antibodi lainnya yang dihasilkan oleh sel-sel tersebut akan terikat dengan suatu protein yang dibentuk oleh sel-sel epitel permukaan mukosa, dan masuk ke dalam lumen untuk bergabung dengan antigen, enterotoksin, dan bakteri untuk melindungi saluran cerna terhadap serangan virus dan bakteri (Leeson, 1996).



Gambar 2.2. Struktur histologis *ileum*
(Sumber: Anonimous, 2006)

BAB 3

MATERI DAN METODE

BAB 3 MATERI DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan mulai 9 April sampai dengan 30 Mei 2007 di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Pemeliharaan hewan coba dilakukan di kandang hewan coba, penimbangan pakan dilakukan di Laboratorium Anatomi, pemeriksaan protein kasar (analisis proksimat) dilakukan di Laboratorium Makanan Ternak dan pembuatan serta pengamatan preparat imunositokimia dilakukan di Laboratorium Patologi.

3.2. Bahan dan Materi Penelitian

3.2.1. Bahan penelitian

Bahan yang diperlukan pada penelitian ini adalah hewan coba penelitian berupa 42 ekor Ayam Petelur strain *Lohman Brown* dari P.T. Adiguna Bintang Lestari Pandaan yang berumur 16 minggu, desinfektan kandang Rodalon dari P.T. Pyridam Veteriner, vaksin *Avian Influenza* inaktif strain H₅N₁ dari P.T. Medion.

Pakan jadi menggunakan pakan Komplit Butiran Ayam Petelur (Layer II) CP 524-2 produksi P.T. Charoen Pokphand Indonesia dengan kandungan protein kasar 18 – 19%, kandungan pakan lain dapat dilihat pada lampiran 1. Pakan jadi inilah yang digunakan sebagai pakan basal, yaitu pakan yang telah memenuhi standart kebutuhan nutrisi ayam khususnya pada fase petelur. Pakan rendah protein adalah pakan yang memiliki kandungan protein <18% yang kurang memenuhi kebutuhan protein ayam dan dapat menyebabkan

defisiensi protein. Untuk mendapatkan pakan rendah protein 14,6%, digunakan metode Pearson's Square dalam penghitungan masing-masing bahan pakan. Penambahan dedak padi pada pakan jadi dilakukan dengan perbandingan 1 : 4 (lampiran 2). Dedak padi yang digunakan adalah dedak halus dengan kandungan protein 13%. Penggunaan pakan rendah protein ini dimaksudkan sebagai stressor pakan, dikarenakan efek suplementasi akan muncul pada keadaan yang tidak biasa dan perbandingan antara pakan konsentrat dengan dedak padi dibuat berdasarkan asumsi bahwa pemberian pakan rendah protein tetap harus berada dalam batas yang aman sehingga diperkirakan mampu meraih persentase protein pakan 14,6%.

Suplemen yang digunakan dalam penelitian ini adalah *crude chlorella* dalam bentuk biakan murni yang diperoleh dari Balai Budidaya Air Payau desa Pecaron kabupaten Situbondo yang berada di bawah naungan Departemen Kelautan dan Perikanan. *Crude chlorella* yang berasal dari laut dibudidayakan oleh Balai Budidaya Air Payau pada bak-bak penampungan yang tersedia untuk kemudian dikeringkan dengan cara dijemur dibawah sinar matahari dan dilanjutkan dengan memasukkan ke dalam oven. Pengeringan ini tidak menggunakan media tambahan apapun hingga benar-benar kering seperti tepung dan siap digunakan.

Perlakuan suplementasi *crude chlorella* akan diberikan dalam persentase 0%; 2,5% dan 5%. Bahan-bahan lain yang digunakan untuk penelitian adalah buffer formalin 10% yang digunakan sebagai pengawet *ileum* sebelum dibawa ke laboratorium untuk dibuat preparat imunositokimia,

alkohol 70%, 80%, 90% dan 96% untuk pembuatan sediaan histologis, dan pewarna khusus untuk imunositokimia, serta parafin untuk bahan sediaan histologis.

3.2.2. Alat penelitian

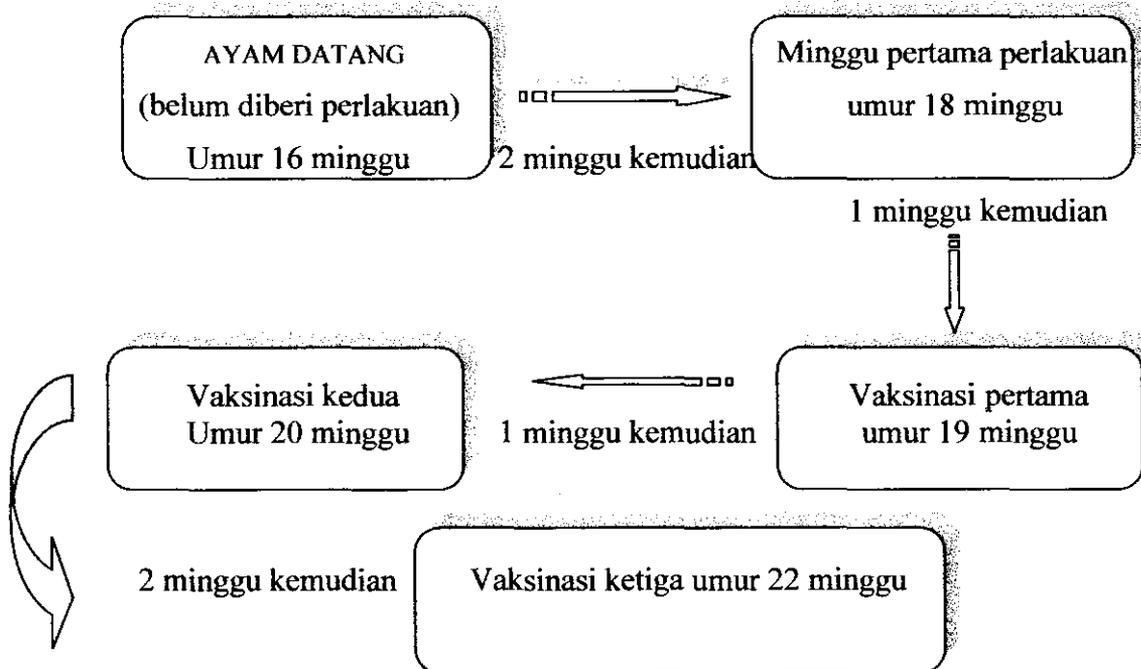
Alat penelitian yang digunakan adalah timbangan digital, kantong plastik, peralatan pembersih kandang, jas lab/ cattle pack, kandang baterai lengkap dengan tempat pakan dan minum, serta spuit untuk vaksinasi AI. Alat yang digunakan pada pembuatan dan pemeriksaan histologi antara lain gunting, pinset, scalpel, alat seksi, pot plastik, gelas objek dan gelas penutup, mikrotom geser, *hot plate*, mikroskop, minyak emersi, kamera digital dan *counter* manual.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Perlakuan hewan coba

Ayam yang baru datang diberi air gula dan selanjutnya dipelihara untuk adaptasi selama satu minggu. Pada umur 18 minggu hingga akhir penelitian, hewan coba diberi perlakuan. Pemberian makan dan minum dilakukan tiga kali sehari. Satu minggu setelah perlakuan dimulai, ayam divaksinasi dengan vaksin *Avian Influenza* dan diikuti dengan vaksinasi booster I satu minggu kemudian dan booster II dua minggu kemudian. Vaksinasi dilakukan hingga 3 kali dimaksudkan untuk melihat efektivitas kerja vaksin.

Tabel 3.1. Jadwal vaksinasi AI



3.3.2. Metode perlakuan hewan coba

Perlakuan yang dicobakan pada ayam sebanyak 6 perlakuan dengan 7 ulangan. Sebanyak 42 ekor ayam diundi secara acak untuk mendapatkan perlakuan A_1B_1 , A_1B_2 , A_1B_3 , A_2B_1 , A_2B_2 dan A_2B_3 .

Tabel 3.2. Metode perlakuan hewan coba

A_1	A_1B_1	A_1B_2	A_1B_3
A_2	A_2B_1	A_2B_2	A_2B_3

Keterangan :

A_1 = perlakuan pakan basal

A_2 = perlakuan pakan rendah protein

B_1 = suplementasi *crude chlorella* 0%

B_2 = suplementasi *crude chlorella* 2,5%

B₃ = suplementasi *crude chlorella* 5%

A₁B₁ = perlakuan pakan basal + 0% suplementasi *crude chlorella*

A₁B₂ = perlakuan pakan basal + 2,5% suplementasi *crude chlorella*

A₁B₃ = perlakuan pakan basal + 5% suplementasi *crude chlorella*

A₂B₁ = perlakuan pakan rendah protein + 0% suplementasi *crude chlorella*

A₂B₂ = perlakuan pakan rendah protein + 2,5% suplementasi *crude chlorella*

A₂B₃ = perlakuan pakan rendah protein + 5% suplementasi *crude chlorella*

Ayam dipelihara dan diberi perlakuan hingga umur 24 minggu untuk kemudian dikorbankan dan diambil sampelnya.

3.3.3. Panen dan pengambilan sampel

Panen (pemotongan ayam) dilakukan pada minggu ke delapan setelah perlakuan, yaitu pada tanggal 5 Juni 2007. Ayam dikorbankan dengan cara disembelih. Dilanjutkan dengan pengambilan sampel *ileum* dengan cara melakukan seksi pada tubuh ayam, kemudian diletakkan dalam buffer formalin 10%. Sampel yang dikoleksi kemudian selanjutnya dilakukan pembuatan preparat imunositokimia di Laboratorium Patologi Universitas Airlangga untuk kemudian diperiksa di bawah mikroskop.

3.3.4. Metode imunositokimia

Imunositokimia merupakan gabungan antara sitologi dan imunologi. Imunositokimia adalah suatu metode pewarnaan substansi bahan aktif di dalam sel dengan menggunakan prinsip-prinsip dasar imunologi yaitu pengikatan antigen pada antibodi. Hasil reaksi antigen dan antibodi ini dapat diidentifikasi pada spesimen karena antibodi diikat oleh suatu penanda yang dapat divisualisasikan, sehingga dapat menandai keberadaan bahan aktif

tersebut di dalam sel. Penelitian ini menggunakan kit dari DAKO LSAB yang dilengkapi dengan teknik avidin-biotin complex. Teknik ini merupakan modifikasi dari metode tidak langsung dimana satu antigen diikat oleh antibodi dengan dua tahap. Antibodi primer, yaitu Anti-Chicken-IgA langsung berikatan dengan antigen, selanjutnya antibodi primer berikatan dengan antibodi sekunder yaitu Mouse Anti-Chicken yang telah mengalami biotinilasi. Avidin adalah glikoprotein yang mempunyai afinitas ikatan yang tinggi dengan biotin. Antibodi sekunder telah terkonjugasi dengan biotin yang dapat berikatan dengan molekul avidin. Setelah antibodi primer berikatan dengan antibodi sekunder yang telah terikat biotin, maka selanjutnya campuran avidin-biotin complex ini ditetaskan pada preparat dan langsung membentuk avidin-biotin complex melalui molekul avidin. Kromogen adalah suatu zat yang dapat memvisualisasikan substansi penanda pada ikatan imunokompleks pada pewarnaan imunohistokimia. Kromogen yang digunakan pada kit ini adalah DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride). Kromogen ini dapat memvisualkan warna coklat pada preparat yang diamati.

3.3.5. Metode penghitungan IgA

Penghitungan IgA dilakukan dengan cara mengamati preparat imunositokimia di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x menggunakan minyak emersi dan *counter* manual. Pada setiap preparat terdapat tiga penampang melintang *ileum*, dalam setiap satu penampang *ileum* dipilih tiga

lokasi secara acak yang diperkirakan mampu mewakili keseluruhan penampang *ileum* tersebut.

Penghitungan dilakukan pada sel-sel yang mengalami ekspresi IgA yang ditunjukkan dengan sel-sel yang berwarna coklat yang berlokasi di daerah mukosa lumen *ileum* di sekitar epitel *ileum*.

3.4. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan model perancangan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan dua faktor, yaitu : faktor I dengan dua taraf dan faktor II dengan tiga taraf. Setiap unit perlakuan diulang sebanyak 7 ulangan.

Faktor I adalah perbedaan persentase protein pakan, yaitu pakan basal (A_1) dan pakan rendah protein (A_2). Faktor ke II adalah perbedaan persentase *crude chlorella*, yaitu 0% (B_1), 2,5% (B_2) dan 5% (B_3).

3.5. Peubah Yang Diamati

Peubah yang diamati adalah adanya perbedaan ekspresi IgA di *ileum* ayam pada masing-masing perlakuan yang diamati secara mikroskopis. Ekspresi IgA ditunjukkan dengan warna coklat pada sitoplasma sel yang diamati, sedangkan daerah di sekitar sel yang tidak berwarna coklat tidak menunjukkan adanya ekspresi IgA.

3.6. Analisis Data

Data yang dikoleksi disajikan secara deskriptif. Uji statistik yang digunakan dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan uji F (ANOVA), uji lanjutannya adalah dengan uji Duncan dilakukan bila pada

unit-unit perlakuan diperoleh perbedaan yang bermakna dengan tingkat signifikansi 5 % (Kusriningrum, 1990). Analisis statistika dilakukan dengan menggunakan SPSS XIII *for* Windows (Santoso, 2005).

BAB 4

HASIL PENELITIAN

BAB 4 HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian efek suplementasi *crude chlorella* terhadap jumlah ekspresi IgA di *ileum* ayam petelur yang divaksin *Avian Influenza*, diperoleh sebagai berikut :

4.1. Jumlah Sel Yang Mengekspresikan IgA di Ileum

Hasil pengamatan didapatkan hasil rata-rata dan simpangan baku jumlah sel yang mengekspresikan IgA di *ileum* yang tersaji pada tabel 4.1

Tabel 4.1. Rata-rata dan simpangan baku jumlah sel yang mengekspresikan IgA di *ileum* dari enam perlakuan ayam petelur.

	B ₁	B ₂	B ₃
	103,33±7,08 ^b	173,90±6,24 ^a	124,51±16,62 ^b
	64,36±4,90 ^c	113,53±36,25 ^b	107,05±25,25 ^b

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antara perlakuan ($p < 0,05$).

Keterangan tabel:

A₁ = perlakuan pakan basal

A₂ = perlakuan pakan rendah protein

B₁ = suplementasi *crude chlorella* 0%

B₂ = suplementasi *crude chlorella* 2,5%

B₃ = suplementasi *crude chlorella* 5%

A₁B₁ = perlakuan pakan basal + 0% suplementasi *crude chlorella*

A₁B₂ = perlakuan pakan basal + 2,5% suplementasi *crude chlorella*

A_1B_3 = perlakuan pakan basal + 5% suplementasi *crude chlorella*

A_2B_1 = perlakuan pakan rendah protein + 0% suplementasi *crude chlorella*

A_2B_2 = perlakuan pakan rendah protein + 2,5% suplementasi *crude chlorella*

A_2B_3 = perlakuan pakan rendah protein + 5% suplementasi *crude chlorella*

Hasil uji dengan Univariate ANOVA menunjukkan bahwa pemberian suplementasi *crude chlorella* dengan pakan rendah protein berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap peningkatan ekspresi IgA di *ileum* ayam petelur yang divaksin AI.

Berdasarkan tabel 4.1, tampak perlakuan A_1B_2 memiliki rata-rata tertinggi dan berbeda signifikan dibanding perlakuan lainnya, yaitu $173,90 \pm 6,24$. Pada perlakuan A_1B_1 , A_1B_3 , A_2B_2 dan A_2B_3 menunjukkan rata-rata yang tidak berbeda signifikan, yang ditunjukkan dengan superskrip yang sama. Yaitu $103,33 \pm 7,08$; $124,51 \pm 16,62$; $113,53 \pm 36,25$ dan $107,05 \pm 25,25$. Rata-rata terendah dan berbeda nyata dengan perlakuan lainnya ditunjukkan pada perlakuan A_2B_1 , yaitu $64,36 \pm 4,90$.

Tabel 4.2. Total rata-rata dan simpangan baku jumlah sel yang mengekspresikan IgA di *ileum* dari perlakuan perbedaan persentase protein pakan

TOTAL	$133,92 \pm 32,06^a$	$94,98 \pm 33,05^b$

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antara perlakuan ($p < 0,05$).

Faktor perbedaan persentase protein pakan ternyata menimbulkan pengaruh yang nyata ($p < 0,05$) terhadap peningkatan ekspresi IgA di *ileum* ayam petelur yang divaksin AI.

Berdasarkan tabel 4.2., A₁ menunjukkan total rata-rata tertinggi dan signifikan yaitu pada perlakuan pakan basal sebesar $133,92 \pm 32,06$. Pada A₂ menunjukkan total rata-rata terendah yaitu pada perlakuan pakan rendah protein sebesar $94,98 \pm 33,05$.

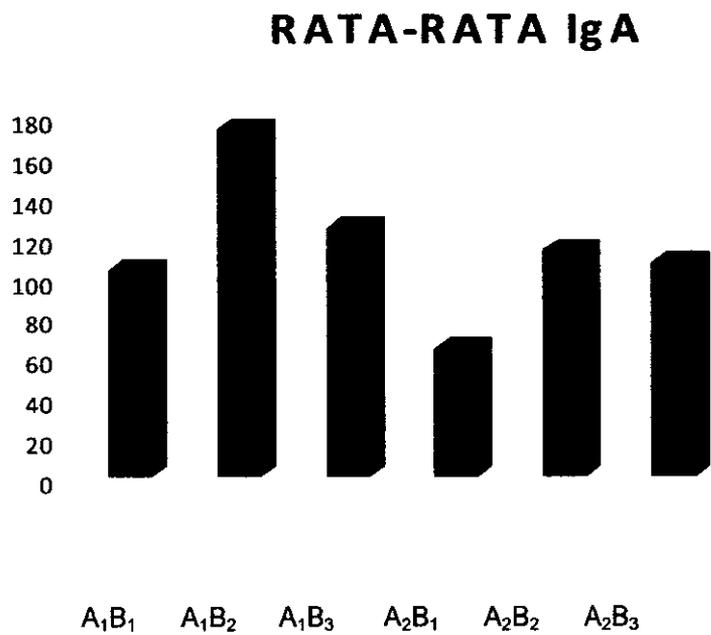
Tabel 4.3. Total rata-rata dan simpangan baku jumlah sel yang mengekspresikan IgA di *ileum* dari perlakuan perbedaan persentase suplementasi *crude chlorella*

TOTAL	83,85±21,05^c	143,72±40,07^a	115,78±22,45^b

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antara perlakuan ($p < 0,05$).

Faktor perlakuan perbedaan persentase suplementasi *crude chlorella* mampu menimbulkan pengaruh yang nyata ($p < 0,05$) terhadap peningkatan ekspresi IgA di *ileum* ayam petelur yang divaksin AI.

Berdasarkan tabel 4.3., total rata-rata tertinggi dan signifikan ditunjukkan oleh B₂ yaitu pada suplementasi *crude chlorella* 2,5%. Pada perlakuan B₃, yaitu suplementasi *crude chlorella* 5% menunjukkan rata-rata sebesar $115,78 \pm 22,45$. Total rata-rata terendah dan signifikan ditunjukkan oleh B₁ yaitu pada suplementasi *crude chlorella* 0% sebesar $83,85 \pm 21,05$.



Gambar 4.1. Rata-rata dan simpangan baku jumlah sel yang mengekspresikan IgA di *ileum* dari enam perlakuan ayam petelur.

BAB 5

PEMBAHASAN

BAB 5 PEMBAHASAN

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa perlakuan A₂B₁, yaitu pemberian suplementasi *crude chlorella* 0% pada pakan rendah protein menghasilkan rata-rata ekspresi IgA yang paling rendah, yaitu sebesar $64,36 \pm 4,90$. Hal ini menunjukkan bahwa protein pakan memegang peranan sangat penting dalam pembentukan respons imun terhadap vaksin *Avian Influenza*, khususnya respons imun mukosa usus. Pada keadaan kekurangan protein jumlah limfosit T, limfosit B, sel plasma dan antibodi akan menurun (Keith and Jeejbhoy, 1997). Valbuena et al. (1996), menyatakan bahwa pada individu yang mengalami kekurangan protein akan terjadi penurunan jumlah immunoglobulin (IgG, IgA, IgM), komplemen C3 dan C4 serta limfosit.

Rata-rata ekspresi IgA tertinggi pada perlakuan pakan rendah protein dihasilkan oleh kelompok perlakuan A₂B₂ yang diberikan suplementasi *crude chlorella* 2,5% pada pakan rendah protein, yaitu sebesar $113,53 \pm 36,25$. Hasil ini menyamai perlakuan A₁B₁ yang diberikan suplementasi *crude chlorella* 0% dan pakan basal yang menunjukkan rata-rata sebesar $103,33 \pm 7,08$. Berarti dengan pemberian suplementasi *crude chlorella* 2,5% pada pakan rendah protein mampu menggantikan pemberian pakan basal tanpa pemberian suplementasi *crude chlorella*. Perlakuan B₂, yaitu pemberian suplementasi *crude chlorella* 2,5% memiliki total rata-rata yang tertinggi sebesar $143,72 \pm 40,07$. Pada prosentase *crude chlorella* 2,5% inilah sistem imun mukosa dari usus mampu merespons dengan cukup baik dan bekerja secara efektif dibanding prosentase pemberian *crude chlorella* yang lain. Pada

pemberian *crude chlorella* dengan prosentase 2,5% ini ayam lebih mudah mencerna *crude chlorella* dibanding pada pemberian suplementasi *crude chlorella* 5%, sehingga *arginin* yang terkandung dalam *crude chlorella* pun mampu tercerna dengan cukup baik. Kebutuhan *arginin* akan meningkat saat ayam dalam keadaan stress, salah satu penyebab stress adalah defisiensi protein. *Arginin* adalah salah satu asam amino essensial yang mampu memicu terbentuknya antibodi. *Arginin* yang terkandung dalam *chlorella* sebesar 3,64% (Steenblock, 2000). Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Abdulakalykova dan Ruiz (2006), bahwa *arginin* dapat memicu sel T helper, diikuti sekresi sitokin sehingga proliferasi dan diferensiasi sel B berlangsung dan pada akhirnya mampu meningkatkan titer antibodi. Peningkatan respons imun juga dimungkinkan karena adanya peranan dari dinding sel *chlorella* yang mampu merangsang sistem kekebalan tubuh dan merangsang limfosit dinding usus, sehingga mampu merangsang respons imun mukosa usus (Kastono, 1992 dikutip dari Wirosaputro, 1998).

Rata-rata ekspresi IgA dari perlakuan A₁B₃ yaitu pemberian suplementasi *crude chlorella* 5% pada pakan basal sebesar 124,51±16,62 ternyata menunjukkan penurunan dibandingkan suplementasi *crude chlorella* 2,5%. Hal ini juga dialami pada perlakuan A₂B₃ yang diberikan pakan rendah protein dengan suplementasi *crude chlorella* 5% sebesar 107,05± 25,25. Total rata-rata yang ditunjukkan pada perlakuan B₃ yaitu pada suplementasi *crude chlorella* 5% sebesar 115,78±22,45 juga lebih rendah dibandingkan perlakuan B₂ yaitu suplementasi *crude chlorella* 2,5%. Dimungkinkan hal ini dapat

terjadi akibat dari serat kasar yang terkandung dalam *crude chlorella* sebesar 0,2% (Steenblock, 2000). Kandungan serat kasar dalam pakan sebanding dengan kemampuan ayam untuk mencerna pakan tersebut. Persentase serat kasar maksimal yang dapat dicerna ayam adalah 6%. Semakin tinggi persentase *crude chlorella* yang diberikan tentu semakin tinggi pula serat kasar yang terkandung, sehingga kemampuan ayam untuk mencerna *crude chlorella* tersebut juga semakin menurun, yang akhirnya berdampak pada tidak optimalnya efek imunitas yang ditunjukkan oleh ekspresi IgA di *ileum* ayam tersebut.

Protein pakan memiliki hubungan dengan kekebalan karena pencernaan atau metabolisme protein pakan menghasilkan asam-asam amino yang lebih lanjut akan berperan dalam produksi enzim, hormon, komponen struktural, protein darah dari sel-sel badan dan jaringan lainnya (Tillman dkk., 1991). Protein dalam pakan setelah masuk ke dalam saluran pencernaan akan mengalami perombakan oleh enzim-enzim hidrolitik. Protein ini akan mengalami denaturasi dalam proventrikulus, sehingga ikatan peptide yang peka terhadap pepsin menjadi pecah, selanjutnya polipeptida-polipeptida yang didapat dari hasil pencernaan dalam proventrikulus akan dirombak dalam usus halus oleh tripsin, kimotripsin dan oleh enzim-enzim elastase, aminopeptidase, karboksipeptidase dan peptidase-peptidase yang khas dalam rongga atau mukosa usus halus menjadi asam amino. Asam-asam amino ini selanjutnya diserap masuk ke peredaran darah (Wahju, 1985; Tillman dkk., 1991; Lehninger, 1997). Protein serum darah khususnya globulin berasal dari asam

amino di dalam pakan yang kemudian disintesis 50% di hati, sedangkan sisanya dibentuk dalam jaringan limfoid dan sel-sel retikuloendotelial lain (Coles and Campbell, 1986; Murray *et al.*, 1993). Protein darah memiliki fungsi yang penting yaitu menyediakan nutrisi untuk jaringan tubuh dan membentuk antibodi untuk mempertahankan tubuh terhadap agen penyakit melalui fraksi gammaglobulin (Schalm *et al.*, 2000). Antibodi disintesis dan disekresikan ke luar sel oleh sel plasma atau AFC (*Antibody Forming Cells*) yang merupakan hasil pembelahan dan diferensiasi sel B setelah terjadi aktivasi akibat pengenalan terhadap antigen. Antigen yang masuk akan dipresentasikan ke limfosit oleh sel-sel yang disebut APC (*Antigen Presenting Cells*) dalam bentuk MHC-II (*Major Histocompatibility Complex-II*) yang dikenal oleh T_H (*T-helper*) karena T_H tidak mampu mengenali antigen bebas. Presentasi antigen atau fragmen antigen oleh APC dan adanya sel T yang teraktivasi diperlukan untuk proses aktivasi dan diferensiasi sel B menjadi sel plasma yang dapat mensintesis dan mensekresikan antibodi atau imunoglobulin (Roitt *et al.*, 2003).

Imunoglobulin atau antibodi merupakan glikoprotein yang disekresi oleh sel plasma sebagai respons terhadap paparan antigen. Antibodi ini mempunyai kemampuan untuk mengikat epitop yang merangsang pembentukan antibodi tersebut. Imunoglobulin sekretori (*secretory immunoglobulin*) merupakan glikoprotein yang menyerupai musin pada bagian engsel (*hing region*) antara sub unit Fc (*constant fragmen*) dan Fab (*antigen binding fragmen*). Bagian ini menempati interfase antara musin dan

cairan di atasnya. Bagian yang menyerupai musin berada dalam lapisan musin, dan bagian molekul imunoglobulin yang lain berada dalam lapisan cairan, dengan demikian maka imunoglobulin sekretori dapat membentuk lapisan selapis (*monolayer*) pada permukaan musin sehingga menjadi mekanisme pertahanan terhadap imunogen atau patogen (Pitono, 2003 dikutip dari Sanderson, 1999).

Imunoglobulin A mempunyai peranan karakteristik dalam respons imun mukosa, terutama di saluran cerna. Dalam saluran cerna IgA disintesis oleh sel plasma di lapisan mukosa. Imunoglobulin A dalam sekresi mukus terdapat dalam bentuk dimer dan dihubungkan dengan komponen rantai J, serta dibubuhi dengan *secretory piece* dalam perjalanan dari lamina propia menuju ke permukaan epitel. Keberadaan *secretory piece* ini menyebabkan imunoglobulin tahan terhadap efek enzim proteolitik. IgA dapat meningkatkan fungsi opsonisasi sel PMN karena pada permukaan sel PMN terdapat reseptor untuk Fc dari IgA.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Mengacu pada uraian hasil dan pembahasan maka dapat dikemukakan kesimpulan penelitian:

- a. Suplementasi *crude chlorella* 2,5% yang diberikan bersama pakan rendah protein mampu meningkatkan jumlah sel yang mengekspresikan IgA di *ileum* ayam petelur yang divaksin AI
- b. Suplementasi *crude chlorella* mampu meningkatkan jumlah sel yang mengekspresikan IgA di *ileum* ayam petelur yang divaksin AI
- c. Pemberian pakan rendah protein dapat mengakibatkan penurunan jumlah sel yang mengekspresikan IgA di *ileum* ayam petelur yang divaksin AI

6.2. Saran

1. Suplementasi *crude chlorella* 2,5% pada pakan dapat digunakan sebagai “*feed supplement*” alternatif untuk menunjang pelaksanaan program vaksinasi, yaitu meningkatkan respons imun dan mengurangi stress pasca vaksinasi pada ayam.
2. Perlu dilakukan analisis secara ekonomi penggunaan suplementasi *crude chlorella* pada peternakan ayam petelur.

RINGKASAN

RINGKASAN

Avian Influenza (AI) adalah penyakit yang menyerang unggas yang dapat menyebabkan kematian yang sangat tinggi dan menurunkan produksi ternak ayam di dunia. Usaha pengendalian dengan vaksinasi AI masih tetap diyakini sebagai cara yang cukup efektif mencegah serangan penyakit AI di peternakan ayam. Ayam dapat mengalami stress diakibatkan oleh serangan penyakit dan defisiensi salah satu zat makanan. Dalam penelitian ini, upaya yang dilakukan adalah bertujuan untuk mengurangi stress pasca vaksinasi dan meningkatkan kekebalan tubuh melalui pemberian pakan. Pemberian pakan yang dimaksud adalah pemberian suplementasi *crude chlorella* pada pakan ayam. Pemberian *crude chlorella* ternyata memberikan respons positif terhadap kekebalan tubuh ayam. Peningkatan respons kekebalan tersebut berpengaruh terhadap jumlah ekspresi IgA pada *ileum* yang mempunyai sistem kekebalan mukosa.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek pemberian *crude chlorella* pada pakan rendah protein terhadap jumlah ekspresi IgA di *ileum* ayam petelur yang divaksinasi *Avian Influenza* (AI). Penelitian ini termasuk eksperimental murni yang menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial 2x3. Faktor I adalah perbedaan prosentase protein pakan, yaitu pakan basal (A₁) dan pakan rendah protein (A₂). Faktor ke II adalah perbedaan prosentase pemberian suplementasi *crude chlorella* sebesar 0%(B₁); 2,5%(B₂); 5%(B₃). Masing-masing perlakuan digunakan 7 (tujuh) ulangan. Pada hari ke tujuh setelah masa adaptasi hingga panen, hewan coba diberi perlakuan, yaitu

unit perlakuan yang diberi pakan basal dan suplementasi *crude chlorella* 0%; suplementasi *crude chlorella* 2,5% dan suplementasi *crude chlorella* 5%. Unit perlakuan yang diberi pakan rendah protein dengan suplementasi *crude chlorella* 0%; suplementasi *crude chlorella* 2,5% dan suplementasi *crude chlorella* 5%.. Tindakan vaksinasi AI secara intramuscular pada seluruh hewan coba dilakukan setelah ayam berusia 18 minggu, kemudian dilakukan vaksinasi booster seminggu kemudian, dan diulangi lagi pada dua minggu kemudian untuk mendapatkan efek yang optimal dari vaksinasi itu sendiri.

Kandungan protein secara keseluruhan dari *chlorella* sangat tinggi, dan salah satu asam amino penyusunnya adalah *arginin* yang mempunyai kandungan 3,64% dari keseluruhan kandungan proteinnya (Steenblock, 2000). Kandungan *arginin* dalam *chlorella* dianggap sebagai antigen asing oleh sistem kekebalan mukosa, antigen ini dapat masuk melalui epitel mukosa usus yang bertindak sebagai APC (*Antigen Presenting Cells*) yang kemudian mengaktifkan sel B. Kemudian sel B akan memproduksi IgA sebagai pertahanan khas dari sistem imun mukosa usus, khususnya *ileum*.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian suplementasi *crude chlorella* 2,5% dengan pakan rendah protein dapat meningkatkan jumlah ekspresi IgA di *ileum* ayam petelur yang divaksin AI dan diberi pakan rendah protein.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Abdulakalykova, S., C.A. Ruiz, 2006. Arginin and Vitamine E Improve The Cellular and Humoral Immune Response of Broiler Chickens. *Int. J. of Poultry. Sci.* 5(2): 121-127.
- Anggorodi, R. 1985. *Kemajuan Mutakhir dalam Ilmu Makanan Ternak Unggas*. Penerbit Universitas Indonesia (UI-Press). Jakarta. 6-51.
- Anonimous. 2006^a. The Free Encyclopedia-Chlorella. www.wikipedia.org. (3 April 2007).
- Anonimous. 2006^b. The Free Encyclopedia-Ileum. <http://www.wikipedia.org> (1 September 2007).
- Anonimous. 2007. The Free Encyclopedia-Chlorella. <http://en.wikipedia.org/wiki/Chlorella>. (26 April 2007).
- Bains, B. S. 1996. The Rule of Vitamin C in Stress Management. *World Poultry Missed*. Volume 12 no 4.
- Bellanti, J.A. 1993. *Imunologi III*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 97-104.
- Bowen, R. 2004. The Gastrointestinal Immune System. <http://www.rbowen@colostate.edu>. (16 April 2007).
- Breytenbach, J. H. 2005. Guidelines for The Administration of Nobilis Influenza H5 Vaccine as Part of an Avian Influenza Control Strategy. Intervet International. Netherlands.
- Bunchasak, C., K. Poosuwan, R. Nurkraew, K. Markvichitr and A. Chototesa. 2005. Effect Dietary Protein on Egg Production and Immunity Responses of Lying Hens During Peak Production Period. *International Journal of Poultry Science* 4 (9): 701-708 (Abstract). (www.pjbs.org/jips/ab445.htm). (6 Juli 2007).
- Coles, E.H. and T.W. Campbell. 1986. *Avian Clinical Pathology*. In : *Veterinary Clinical Pathology*. W.B. Saunders Company Ltd. Tokyo.
- Corthesy, B. 2006. Mucosal Immunology and Secretory Immunoglobulin A : General Concepts. //http.www. ial.text.com. (26 Agustus 2007).

- Dubey, D.R. and E.J. Yunis.1996. Aging and Nutritional Effect on Immune Function in Human. In : Basic and Clinical Immunology 8th ed. Prentice Hall International Inc. USA.
- Gheng Zou, S. and Y.Z. Wu. 2005. Effects of Protein and Supplemental Fat on Performance of Lying Hens (Abstract). International Journal of Poultry Science 4 (12): 986-989. www.pjbs.org/jips/ab419.htm.(20 Agustus 2007).
- Keith, M.F. and K.N. Jeejebhoy. 1997. Immunonutrition. University of Toronto, Ontario. Canada.
- Kromo. 2007. Dicampur Sebelum Dicampur. Poultry Indonesia. Vol.II: 12-14.
- Kusriningrum. 1989. Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Lavinia. 2003. Pengaruh Pemberian Chlorella Terhadap Kadar Total Protein Darah pada Ayam Pedaging. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya
- Leeson, C., S. Leeson dan A. Paparo. 1996. Buku Ajar Histologi. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 347-368
- Lehninger, A.L. 1997. Dasar-Dasar Biokimia. Alih Bahasa Thenawidjaja M. Jilid I. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Maynard, L.A. ; J.K. Loosli ; H.F. Hirtz and R.G. Warner. 1979. Animal Nutrition. 7th ed. T.M.H. Publishing Company Ltd. New Delhi. 136-143.
- Murray, R. K., D. K. Granner., Peter A. Mayes., Victor, W. Rodwell. 1993. Biokimia Harper. Edisi 24. Terjemahan : Dr. Andry. H. Editor : Dr. Alexander, H. S. Penerbit Buku Kedokteran. ECG. Jakarta.
- Nugrhawatiy, T. 2002. Efek Berbagai Tingkat Protein Pakan Terhadap Titer Antibodi Ayam Petelur Jantan Yang Divaksin ND (New Castle Disease). Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Parslow, G., P.S. Daniel., I. Abba and B.I. John. *al*. 2001. Medical Immunology. The McGraw-Hill Company. USA.
- Putra, S.T. 1997. Konsep Patobiologi dan Imun Mukosal. (editor Soeparto P, Judajana FM, Putra ST, Sudarmo SM). Imunologi Mukosal Kedokteran, edisi 1. GRAMIK FK Unair. 27-31.

- Riddell, C. 2007. Comparative Anatomy, Histology And Physiology Of The Chicken. University of Saskatchewan. Canada.//<http://www.westerncollegeofveterinarymedicine/UniversityofSaskatchewan.com>.(19 April 2007).
- Roitt, I. 2003. Imunologi : Essential Immunology. Edisi 8. Alih Bahasa : Alida Harahap dkk. Widya Medika. Jakarta. 24-31.
- Sainsbury, D. 2000. Poultry Health and Management. Fourth Edition. Blackwell Science. United Kingdom. 22-23.
- Sanderson, J.R., W.A. Walker. 1999. Mucosal Barrier: An Overview. In (Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, eds). Mucosal Immunology, 2nd ed. San Diego: Academic Press. 5-18.
- Santoso, S. 2005. Mengolah Data Statistik Secara Profesional. PT. Elex Media Komputindo. Kelompok Gramedia. Jakarta.
- Schalm, O.W., Bernard F., Joseph G. Z. and N.C. Jain. 2000. Veterinary Hematology. 5th Ed. Lippincot Williams and Wilkins. Canada. 891-896.
- Setyono, H., Kusningrum, Mustikoweni, T. Nurhajati, M. Agustono, M. Al-Arief, M. Lamid, A. Monica, W.L. Paramitha. 2003. Prosedur Analisis Bahan Pakan Ternak. Laboratorium Makanan Ternak Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Soeparto, P., M.S. Subijanto, F.M. Judajana, T.P. Suhartono, A. Elyana. 2003. Gangguan Sistem Imun Mukosa Intestinal. GRAMIK FK UNAIR. Surabaya. 61-62.
- Steenblock. 2000. Chlorella Makanan Sehat Alami. *Cetakan Keempat*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 4-10.
- Suarez, D. L., M. L. Perdue, N. Cox, T. Rowe, C. Bender, J. Huang, D. Swayne. 1998. Comparisons of Highly Virulent H5N1 Influenza A Viruses Isolated from Humans and Chickens from Hong Kong. J. Virol. 72: 6678-6688.
- Sudarmono, A.S. 2003. Pedoman Pemeliharaan Ayam Ras Petelur. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 13-18.
- Supriyatna, E., U. Atmomarsono, R. Kartasudjana. 2005. Ilmu Dasar Ternak Unggas. PT Panebar Swadaya. Jakarta
- Suriawiria, U. 2002. Chlorella. www.kompas.com/kompas-cetak/0210/19/iptek/chlo10.htm. (9 april 2007).

- Tilman, A. D., H. Hartadi, S. Reksadiprojo, S. Prawirokusumo, dan S. Lebdoesoekojo. 1991. Ilmu Makanan Ternak Dasar. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 161-179.
- Tizard, I. 1987. Pengantar Imunologi Veteriner. Airlangga University Press. Surabaya. 64-209.
- Tse, P. 2000. The Detoxification, Immunostimulation and Healing Properties of Chlorella. World Convention of Traditional Medicine and Acupuncture. Singapore.
- Valbuena, A.A. ; M. Diaz-Ewald ; M. De Villaroel ; N. Moniel ; A. Granados ; S. Diaz ; D. Salas and M. Livero. 1996. Immunologic Characteristic Of Undernutrition. Universidad Del Zulia, Maracaibo. Venezuela.
- Wahju, J. 1985. Ilmu Nutrisi Unggas. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 67-309.
- WHO. 2006. Strengthening Pandemic-Influenza Preparedness And Response, Including Application of The International Health Regulations. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/pandemicfluprotocol.(3 Januari 2007).
- Wirosaputro, S. 1998. Chlorella Makanan Kesehatan Global Alami Buku I. Cetakan Pertama. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 49-54.
- Woodward, B.1998. Depression In The Quantity Of Intestinal Secretory IgA And In Expression Of The Polymeric Immunoglobulin Receptor In Protein Caloric Deficiency Of The Weanling Mouse. University Of Guelph, Ontario. Canada.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Kandungan nutrisi pada pakan komplit CP 524-2 untuk ayam petelur.

**Analisa Kandungan Nutrisi Pada
Pakan Komplit Butiran Ayam Petelur (Layer II)
CP 524-2
PT Charoen Pokphand Indonesia**

Air	Max	13,0
Protein	-	18 – 19
Lemak	Min	3,0
Serat	Max	6,0
Abu	Max	12,0
Calcium	Min	3,70
Phosphor	Min	0,60

Tabel : Kandungan Nutrisi Pakan
Sumber : PT. Charoen Pokphand Indonesia

Bahan-bahan yang dipakai, antara lain :

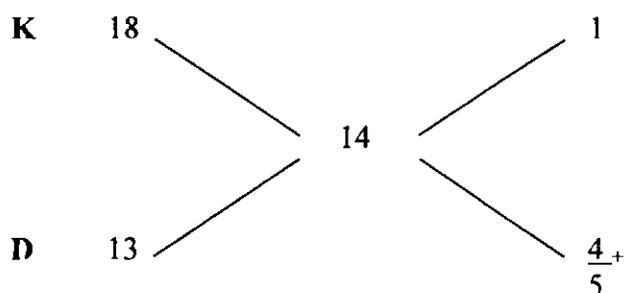
Jagung, dedak, tepung ikan, bungkil kedelai, bungkil kelapa, tepung daging dan tulang, pecahan gandum, bungkil kacang tanah, canola, tepung daun, vitamin, calsium, fosfat dan trace mineral.

Antibiotic :

Zinc Bacitrasin

Lampiran 2. Perhitungan Jumlah Komposisi Pakan

**Perhitungan Jumlah Komposisi Pakan
Dengan Metode Pearson's Square**



Ditemukan perbandingan 1:4 antara konsentrat dengan dedak untuk mendapatkan prosentase protein 14%.

$$\text{Konsentrat} = \frac{1}{5} \times 100 \text{ kg} = 20 \text{ kg}$$

$$\text{Dedak} = \frac{4}{5} \times 100 \text{ kg} = \frac{80 \text{ kg}}{100 \text{ kg}}$$

Lampiran 3. Hasil analisis proksimat pakan rendah protein (A₂)

Bahan Kering(%)	Protein Kasar(%)	Serat Kasar(%)
90,8241	14,6112	10,3102

Sumber : Laboratorium Makanan Ternak FKH Universitas Airlangga

Lampiran 4. Hasil analisis dengan Univariate ANOVA terhadap jumlah ekspresi IgA *ileum* ayam petelur yang diberi suplementasi *crude chlorella* dan divaksinasi *Avian Influenza*.

Summarize

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
IGA * PERBEDAAN KADAR PROTEIN * PERBEDAAN KADAR CRUDE CHLORELLA	42	100,0%	0	,0%	42	100,0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries ^a

					IGA		
PERBEDAAN KADAR PROTEIN	BASAL	PERBEDAAN KADAR CRUDE CHLORELLA	CC0%	1	99,44		
				2	101,33		
				3	117,44		
				4	106,07		
				5	97,99		
				6	104,45		
				7	96,58		
				Total	Mean Std. Deviation	103,3300 7,08293	
				CC2,5%	1	168,77	
					2	185,55	
					3	177,16	
					4	168,77	
					5	178,08	
					6	168,11	
					7	173,90	
					Total	Mean Std. Deviation	173,9031 6,24376
					CC5%	1	153,22
						2	106,11
				3		133,00	
				4		130,78	
				5		111,48	
6	126,92						
7	110,09						
Total	Mean Std. Deviation	124,5141 16,62102					
Total	Mean Std. Deviation	133,9157 32,05659					
RENDAH PROTEIN	PERBEDAAN KADAR CRUDE CHLORELLA	CC0%	1	64,36			
			2	63,33			
			3	54,77			
			4	66,55			
			5	63,66			
			6	67,55			
			7	70,33			
			Total	Mean Std. Deviation	64,3643 4,90122		
			CC2,5%	1	145,88		
				2	119,00		
				3	107,44		
				4	144,98		
				5	62,77		
				6	67,77		
				7	146,88		
				Total	Mean Std. Deviation	113,5314 36,25238	
			CC5%	1	117,33		
				2	87,44		
				3	74,66		
				4	103,40		
				5	91,22		
6	146,33						
7	128,96						
Total	Mean Std. Deviation	107,0486 25,25279					
Total	Mean Std. Deviation	94,9814 33,04970					
Total	Mean Std. Deviation	114,4486 37,71359					

a. Limited to first 100 cases.

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
PERBEDAAN KADAR PROTEIN 1,00	BASAL	21
2,00	RENDAH PROTEIN	21
PERBEDAAN KADAR CRUDE CHLORELLA 1,00	CC0%	14
2,00	CC2,5%	14
3,00	CC5%	14

Descriptive Statistics

Dependent Variable: IGA

PERBEDAAN	PERBEDAAN KADAR	Mean	Std. Deviation	N
BASAL	CC0%	103,3300	7,08293	7
	CC2,5%	173,9031	6,24376	7
	CC5%	124,5141	16,62102	7
	Total	133,9157	32,05659	21
RENDAH PROTEIN	CC0%	64,3643	4,90122	7
	CC2,5%	113,5314	36,25238	7
	CC5%	107,0486	25,25279	7
	Total	94,9814	33,04970	21
Total	CC0%	83,8472	21,04811	14
	CC2,5%	143,7172	40,07290	14
	CC5%	115,7813	22,44896	14
	Total	114,4486	37,71359	42

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: IGA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	44266,670 ^a	5	8853,334	22,688	,000
Intercept	550136,090	1	550136,090	1409,779	,000
PROTEIN	15916,746	1	15916,746	40,788	,000
CC	25128,286	2	12564,143	32,197	,000
PROTEIN * CC	3221,638	2	1610,819	4,128	,024
Error	14048,229	36	390,229		
Total	608450,989	42			
Corrected Total	58314,899	41			

a. R Squared = ,759 (Adjusted R Squared = ,726)

Estimated Marginal Means

1. PERBEDAAN KADAR PROTEIN

Dependent Variable: IGA

PERBEDAAN KADAR PROTEIN	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
BASAL	133,916	4,311	125,173	142,658
RENDAH PROTEIN	94,981	4,311	86,239	103,724

2. PERBEDAAN KADAR CRUDE CHLORELLA

Dependent Variable: IGA

PERBEDAAN KADAR CRUDE CHLORELLA	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
CC0%	83,847	5,280	73,140	94,555
CC2,5%	143,717	5,280	133,010	154,425
CC5%	115,781	5,280	105,074	126,489

3. PERBEDAAN KADAR PROTEIN * PERBEDAAN KADAR CRUDE CHLORELLA

Dependent Variable: IGA

PERBEDAAN KADAR PROTEIN	PERBEDAAN KADAR CRUDE CHLORELLA	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
BASAL	CC0%	103,330	7,466	88,188	118,473
	CC2,5%	173,903	7,466	158,761	189,046
	CC5%	124,514	7,466	109,372	139,657
RENDAH PROTEIN	CC0%	64,364	7,466	49,222	79,507
	CC2,5%	113,531	7,466	98,389	128,674
	CC5%	107,049	7,466	91,906	122,191

Post Hoc Tests

PERBEDAAN KADAR CRUDE CHLORELLA

Homogeneous Subsets

IGA

Duncan^{a,b}

PERBEDAAN KADAR CRUDE CHLORELLA	N	Subset		
		1	2	3
CC0%	14	83,8472		
CC5%	14		115,7813	
CC2,5%	14			143,7172
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 390,229.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 14,000.

b. Alpha = ,05.

Oneway

ANOVA

IGA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	44266,670	5	8853,334	22,688	,000
Within Groups	14048,229	36	390,229		
Total	58314,899	41			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

IGA

Duncan^a

INTERAKSI ANTARA KADAR PROTEIN	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
RENDAH PROTEIN-0	7	64,3643		
BASAL-CC0%	7		103,3300	
RENDAH PROTEIN-5	7		107,0486	
RENDAH PROTEIN-2	7		113,5314	
BASAL-CC5%	7		124,5141	
BASAL-CC2,5%	7			173,9031
Sig.		1,000	,073	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 7,000.

Lampiran 5. Prosedur Pembuatan Sediaan Imunositokimia

Pembuatan sediaan imunositokimia ini dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya dengan cara sebagai berikut :

a. Fiksasi dan Pencucian

Bertujuan untuk menghentikan proses metabolisme jaringan, mematikan kuman dan bakteri, menjadikan jaringan lebih keras sehingga mudah dipotong, mencegah terjadinya degenerasi (Lamella, 1971).

Cara kerja :

- Setelah diseksi, ileum diambil dan dimasukkan dalam buffer formalin 10% sekurang-kurangnya 24 jam.
- Ileum dipotong dengan ketebalan 0,5 cm.
- Kemudian dilakukan pencucian dengan air mengalir selama 30 menit.

b. Dehidrasi dan Clearing

Bertujuan untuk menarik air dari jaringan, membersihkan dan menjernihkan jaringan.

Cara kerja :

Organ yang telah dicuci dengan air, dimasukkan ke dalam reagen dengan urutan alkohol 70%, 80%, 90%, 96% alkohol absolute I, II masing-masing 30 menit.

c. Infiltrasi

Bertujuan untuk menginfiltrasi jaringan dengan parafin. Parafin akan menembus ruang antar sel dan dalam sel sehingga jaringan lebih tahan terhadap pemotongan.

Cara kerja :

- Ileum dimasukkan dalam parafin I yang masih cair.
- Dimasukkan ke dalam oven pada suhu 60° selama 30 menit.
- Dipindahkan ke parafin II yang masih cair.
- Dipindahkan ke dalam oven pada suhu 60° selama 30 menit.

d. Pembuatan blok paraffin

Bertujuan supaya jaringan mudah dipotong.

Cara kerja :

- Disiapkan beberapa cetakan besi yang diolesi dengan gliserin supaya nantinya parafin tidak melekat pada besi.
- Besi cetakan diisi parafin cair.
- Ileum dimasukkan ke dalam cetakan, tunggu sampai parafin membeku atau mengeras.

e. Pengirisan dengan mikrotom

Bertujuan untuk memotong jaringan setipis mungkin agar mudah dilihat di bawah mikroskop.

Cara kerja :

- Blok parafin yang telah mengeras diiris dengan mikrotom dengan ketebalan 4-7 mikron.

- Dicelupkan ke dalam air hangat dengan suhu 42-45° C sampai jaringan mengembang dengan baik.
- Olesi gelas obyek dengan poly L-lysine, kemudian jaringan diletakkan pada gelas obyek dan dikeringkan di atas hot plate.

f. Deparafinisasi

- Cuci gelas obyek dengan xylol I, II dan III masing-masing 10 menit.
- Kemudian lanjutkan dengan alkohol absolute I dan II masing-masing 3 menit.
- Lanjutkan dengan alkohol 96% I dan II masing-masing 3 menit.
- Teruskan dengan alkohol 80% selama 3 menit.
- Kemudian dengan alkohol 70% selama 3 menit.
- Cuci dengan air mengalir selama 1 menit.

g. Digesti proteolitik

Menggunakan Trypsin 0,025% dalam inkubator dengan temperatur 37° C selama 15 menit.

h. Staining protocol

- Cuci gelas obyek dengan PBS (10%) 2 kali masing-masing 5 menit.
- Lanjutkan dengan larutan H₂O₂ 3% selama 10 menit.
- Cuci lagi dengan PBS 2 kali masing-masing 5 menit.
- Antibodi primer diencerkan dengan diluent Ab 5%, diteteskan pada jaringan, biarkan 45-60 menit.

- Cuci dengan PBS lagi 2 kali masing-masing 5 menit.
- Teteskan biotinylated Link (yellow) drops pada jaringan, biarkan selama 30 menit.
- Cuci lagi dengan PBS sebanyak 2 kali masing-masing 5 menit.
- Teteskan Streptavidin (red) drops pada jaringan, biarkan selama 30 menit.
- Cuci lagi dengan PBS 2 kali masing-masing 5 menit.
- Rendam dalam DAB (3,3- diaminobenzidine) chromogen 6-10 menit (diencerkan dengan diluent 2%).
- Cuci lagi dengan PBS selama 5 menit.
- Cuci dengan aquades selama 5 menit.

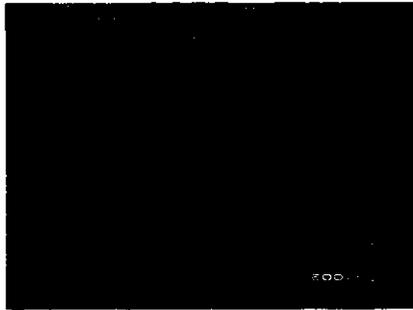
i. Counterstain

- Dengan hematoxillin selama 5-15 menit.
- Cuci dengan air mengalir selama 5 menit.
- Berikan amoniak air selama 3 menit.
- Dipping dalam aquades 3-5 menit.

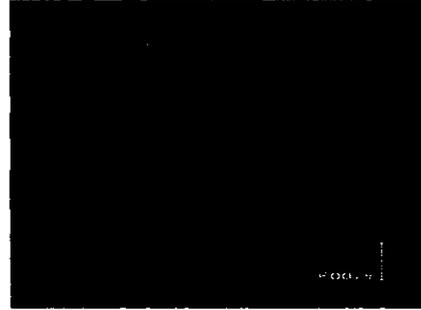
j. Mounting

Menggunakan Entelan, Canada balsam atau DAKO® Faramount.

Lampiran 6. Foto - Foto Preparat Imunositokimia



a



b



c



d



e

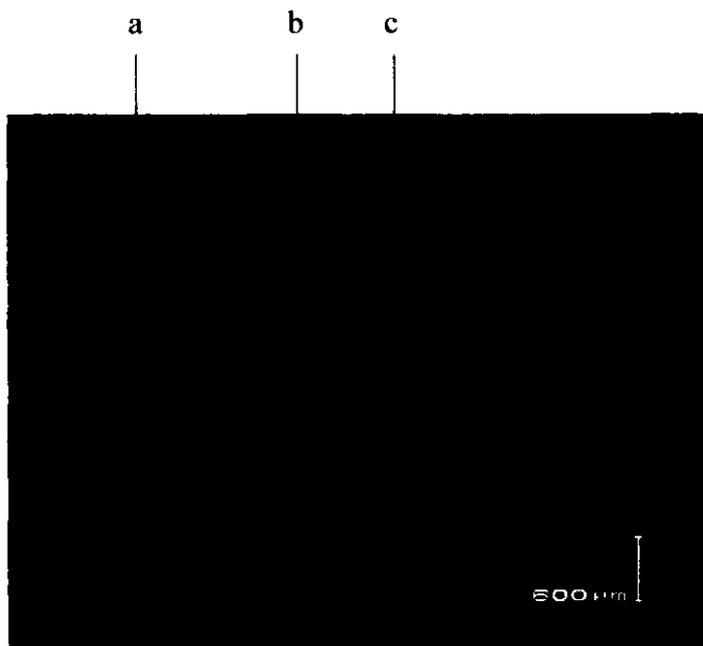


f

Keterangan :

- a. Ekspresi IgA perlakuan pakan basal dengan suplementasi *crude chlorella* 0% (perbesaran 1000x).
- b. Ekspresi IgA perlakuan pakan basal dengan suplementasi *crude chlorella* 2,5% (perbesaran 1000x).
- c. Ekspresi IgA perlakuan pakan basal dengan suplementasi *crude chlorella* 5% (perbesaran 1000x).
- d. Ekspresi IgA perlakuan pakan rendah protein dengan suplementasi *crude chlorella* 0% (perbesaran 1000x).
- e. Ekspresi IgA perlakuan pakan rendah protein dengan suplementasi *crude chlorella* 2,5% (perbesaran 1000x).
- f. Ekspresi IgA perlakuan pakan rendah protein dengan suplementasi *crude chlorella* 5% (perbesaran 1000x).

Lampiran 7. Skema preparat imunositokimia dari *ileum*



- Keterangan :
- a. Inti sel limfosit B
 - b. Ekspresi IgA yang ditunjukkan dengan warna coklat di sitoplasma
 - c. Lamina propria

Lampiran 8. Mikroskop dan *counter* untuk penghitungan ekspresi IgA ileum.

