

SKRIPSI

JUMLAH SEL LIMFOSIT PADA BURSA FABRISUS AYAM SETELAH PEMBERIAN STRESSOR BISING DAN VAKSINASI NEWCASTLE DISEASE



Oleh :

THOHA

NIM. 060213008

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2008**

**JUMLAH SEL LIMFOSIT PADA BURSA FABRISIUS AYAM SETELAH
PEMBERIAN STRESSOR BISING DAN
VAKSINASI *NEWCASTLE DISEASE***

Skripsi
Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan
Pada
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

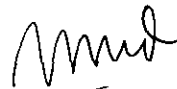
Oleh :

THOHA
NIM 060213008

Menyetujui
Komisi Pembimbing,



(Arimbi, M.Kes., drh)
Pembimbing Pertama



(Wiwik Misaco, M.Kes., drh)
Pembimbing Kedua

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

**Pengaruh Pemberian Stressor Bissing Terhadap Jumlah Sel Limfosit Pada Bursa
Fabrisius Ayam Setelah Vaksinasi ND**

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, 4 Juli 2008



THOHA
NIP. 060213008

Telah di uji pada

Tanggal 27 Juni 2008

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Prof. Dr. Fedik A. Rantam, drh

Anggota : Dr. Zainal Arifin, M.S., drh

Djoko Legowo, M.Kes, drh

Arimbi, M.Kes, drh

Wiwik Misaco, M.Kes., drh

Surabaya, 1 Januari 2011

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh
NIP. 1306873

THE NUMBER OF LYMPHOCYTE CELL ON CHICKEN'S BURSA OF FABRICIUS AFTER NOISE STRESS GIVING AND NEWCASTLE DISEASE VACCINATION

THOHA

ABSTRACT

The objective of this research is to find the effect of noise stress giving and *Newcastle Disease* vaccination to the number of lymphocyte cell in chicken's bursa of fabricius. On the previous research done by Arimbi (1999), samples that used were 100 *Day Old Chick* CP 909 strain which is produced by PT. Charoen Phokphand. Those samples divided into 4 group based on the treatment given, each group consist of 25 chicks. The group based on the treatment are Group I (P0) was neither stress or vaccination (S-V-), group 2 (P1) was vaccinated without stress (S-V+), group 3 (P2) was stress without vaccination (S+V-) and last group 4 was either stress and vaccination (S+ V+). Samples were taken on 8th week and they were used are 20 bursa of fabricius organs. Those samples divided into 4 group of treatment, each group consist of four samples. As the research method, sample has been processed became histopathological examination by microscopic evaluation was used to count the number of lymphocyte cell. The result of this research shows the number of lymphocyte cell in group P1 (S-V+) is the highest. That situation related to the vaccination was given. Based on group P0 (S-V-), as controller. The number of lymphocyte cell in group P2 (S+V-) and P3 (S+V+) have been reduced. This condition caused by continuously stress and it leads into *exhaustion phase* of the GAS theory, which is stress is no longer adaptable. This condition caused by continuously stress and it leads into *exhaustion phase* of the GAS theory, which is stress is no longer adaptable. This condition could suppress the immune system and cause failure in proliferation and differentiation of lymphocyte cell. And finally the number of lymphocyte cell decreased.

Key words : noise stress, lymphocyte, bursa of fabricius

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat, karunia dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul **Jumlah Sel Limfosit Pada Bursa Fabrisius Ayam Setelah Pemberian Stressor Bising dan Vaksinasi *Newcastle Disease*.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

Prof. Hj. Romziah Sidik, P.h.D., drh selaku pimpinan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ibu Arimbi, M.Kes., drh selaku dosen pembimbing pertama dan Ibu Wiwik Misaco, M.Kes., drh selaku dosen pembimbing kedua atas kesabaran, saran dan bimbingannya sampai dengan selesainya skripsi ini. Terima kasih kepada Prof. Dr. Fedik A Rantam, drh, Bapak Dr. M. Zainal Arifin, M.S., drh, serta Bapak Djoko Legowo, M.Kes., drh selaku dosen penguji atas berbagai saran dan kritik yang diberikan sehingga skripsi ini menjadi lebih baik.

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

Seluruh Staf laboratorium Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas bantuan teknik dalam proses penelitian ini.

Abi, Uma dan adikku tercinta yang telah memberikan segalanya, bantuan doa, dorongan dan semangat. Halatima, Ami Hasan sekeluarga yang banyak memberi dukungan sehingga penulis bisa menyelesaikan studi. Sahabatku Rihqi, Sigit, Bambang, Warda, Kencos, Elisa, terima kasih telah menjadi sahabat yang baik. Rekan-rekan satu atap yaitu Betta, Ucup, Betty, Harso, Dani, Saherman, Irfan. Teman satu almamater yaitu Sendy, Fitri,

Yudha, Ratih, Wawan, Besty yang selalu memberi semangat, serta semua pihak yang tidak bisa disebutkan namanya satu-persatu.

Penulis juga menyadari bahwa penulisan makalah ini masih jauh dari kesempurnaan, karena itu saran dan masukan dari pembaca diharapkan bisa menjadi bahan pertimbangan untuk mencapai hasil yang lebih baik. Akhirnya penulis berharap agar makalah ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan, khususnya Ilmu Kedokteran Hewan.

Surabaya, Juli 2008

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PERNYATAAN	ii
HALAMAN IDENTITAS	iii
ABSTRACT.....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xii
 BAB 1 PENDAHULUAN	 1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Landasan Teori.....	4
1.4. Tujuan Penelitian	5
1.5. Manfaat Penelitian	5
1.6. Hipotesis Penelitian	6
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	 7
2.1. <i>Newcastle Disease</i> (ND).....	7
2.2. <i>Newcastle Disease Virus</i> (NDV)	9
2.3. Stress dan Sressor	12
2.4. Sistem Imun pada Ayam.....	14
2.5. Stress dan Respon Imun pada Ayam	17
2.6. Sel Limfosit.....	19
2.7. Bursa Fabrisius	20
 BAB 3 MATERI DAN METODE.....	 24
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	24
3.2. Materi Penelitian	24
3.2.1. Bahan Penelitian	24
3.2.2. Alat penelitian.....	24
3.2.3. Besaran sampel	25
3.3. Variabel Penelitian.....	25
3.4. Metode Penelitian	26
3.4.1. Perlakuan Yang Diberikan.....	26
3.5. Peubah Yang Diamati	27
3.6. Kerangka Konseptual Penelitian.....	28
3.7. Jenis dan Rancangan Penelitian.....	28
3.8. Analisis Data	29
 BAB 4 HASIL PENELITIAN	 30
 BAB 5 PEMBAHASAN.....	 34
 BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	 38

6.1. Kesimpulan 38

6.2. Saran 38

RINGKASAN 39

DAFTAR PUSTAKA 42

LAMPIRAN 43

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Rata-rata $\pm$ Simpangan Baku Jumlah Sel Limfosit	30

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Newcastle Disease Virus</i> (NDV)	9
2. Bursa Fabrisius dengan Pewarnaan HE (perbesaran 100x)	21
3. Mekanisme penurunan respon imun pada kondisi stress	23
4. Kerangka Operasional Penelitian.....	28
5. Diagram Batang jumlah sel limfosit bursa fabrisius ayam	31
6. Bursa fabrisius pada perlakuan P0 (S-V+) perbesaran 400x	32
7. Bursa fabrisius pada perlakuan P1 (S-V+) perbesaran 400x	32
8. Bursa fabrisius pada perlakuan P2 (S+V-) perbesaran 400x	33
9. Bursa fabrisius pada perlakuan P3 (S+V+) perbesaran 400x	33

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pembuatan Sediaan Histologis.....	45
2. Hasil Penghitungan Sel Limfosit.....	49
3. Rata-rata Jumlah Sel Limfosit.....	50
4. Analisa Statistik menggunakan ANOVA.....	51
5. Analisa Statistik dengan Uji BNT 5%.....	53
6. gambar bahan penelitian.....	54
7. Gambar alat-alat penelitian	54

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

Daftar Singkatan :

ACTH	: <i>Adrenocorticotropin Hormon</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
APC	: <i>Antigen Presenting Cells</i>
BNT	: <i>Beda Nyata Terkecil</i>
d β	: <i>disibel</i>
GAS	: <i>General Adaptation Syndrome</i>
HE	: <i>Haematoxylin Eosin</i>
HPA	: <i>Hypothalamus Pituitary Adrenal</i>
IL-1	: <i>Interleukin 1</i>
IL-2	: <i>Interleukin 2</i>
IL-6	: <i>Interleukin 6</i>
ND	: <i>Newcastle Disease</i>
NDV	: <i>Newcastle Disease Virus</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
OIE	: <i>Office Internationale des Epizooticae</i>
TH	: <i>T Helper</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor - α</i>

Daftar Ari Lambang :

%	: persen
$\geq$	: lebih besar dari atau sama dengan
>	: lebih besar dari
r	: ulangan
t	: jenis perlakuan
d β	: desibel
ml	: mililiter

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Peternakan ayam saat ini menghadapi banyak kendala. Salah satu kendala yang serius bagi peternakan ayam dalam mencegah penyakit adalah keberhasilan vaksinasi. Bila terjadi wabah suatu penyakit, akan memerlukan banyak biaya untuk pengobatan, selain itu juga akan terjadi penurunan produksi ternak tersebut. Penyakit pada ayam yang sampai sekarang masih menjadi masalah utama adalah penyakit “tetelo” atau *Newcastle Disease* (ND). *Newcastle Disease* (ND), merupakan penyakit yang banyak menimbulkan kematian, dengan angka kematian mencapai 50% sampai 100%, terutama pada bentuk Doyle’s (Hanson, 1987). Angka kematian yang tinggi tersebut, jelas akan mengurangi sumber protein yang berasal dari produk ternak unggas, akibatnya kebutuhan konsumsi protein bagi penduduk Indonesia akan berkurang. Gizi yang tidak memadai akan berpengaruh pada pertumbuhan dan perkembangan tunas bangsa, sehingga akan menurunkan kualitas tenaga daya manusia (Hosen, 1996).

Faktor predisposisi ND sangat kompleks diantaranya adalah adanya penyakit yang bersifat immunosupresif seperti Gumboro, Marek’s bentuk ringan, penyakit pada saluran pernafasan dan pencernaan, mikotoksin serta program vaksinasi yang kurang sesuai dengan aspek manajemen lainnya (Soetirto, 2000). Menurut Hosen (1996), ayam merupakan ternak yang sangat rentan terhadap stress, yang ditunjukkan dengan kelemahan, ketakutan

dan penurunan produksi. Lingkungan yang tidak dijaga dengan baik memungkinkan munculnya stressor, sehingga dapat menjadi penyebab stress dan akan berpengaruh terhadap sistem imun (Putra 1999).

Mekanisme kegagalan vaksinasi ND ayam pada kondisi stres masih belum banyak yang mengungkap. Bila stres dialami oleh sel imunokompeten seperti makrofag, sel T, sel B dan epitel mukosa, maka fungsi sistem imun tersebut akan merasakan efek dari stres tersebut (terpengaruh) (Putra, 1999). Sel yang mengalami stres akan mengakibatkan penyimpangan respon imun akibat pengaruh hormon yang dihasilkan, karena akan merusak sel imunokompeten atau menghambat produksi mediator kimia seperti interleukin (IL-1, TNF- α , IL-6, IFN) yang diperlukan dalam membentuk antibodi sehingga akan mengakibatkan rendahnya respon terhadap imunogen (Covelli, 1994; McCance dan Shelby, 1994). Stressor yang timbul dari lingkungan dapat dihindari dengan mengetahui penyimpangan respon imun akibat stressor. Keberhasilan vaksinasi sangat tergantung dari kesiapan sel imunokompeten dalam menanggapi imunogen, untuk menghasilkan antibodi yang maksimal. Kegagalan vaksinasi akan sangat merugikan, karena ayam menjadi rentan terhadap suatu penyakit, bahkan mematikan.

Sejak peternakan digarap dengan serius dan vaksin ND mulai diproduksi sekitar tahun 1995 di Pusat Veterinaria Farma Surabaya, penyakit ini masih belum reda, bahkan tidak ada satu wilayah di Indonesia yang bebas ND. Banyak peneliti telah melakukan berbagai percobaan baik mengenai

penyakitnya, maupun terhadap berbagai cara penanganan maupun cara penggunaan vaksinnya. Rangga Tabbu (1997), memaparkan hasil penelitiannya di lapangan mengenai beberapa penyakit yang mendukung terjangkitnya ND seperti *Chronic Respiratory Disease (CRD)*, *Infektius Bronchitis (IB)*, *Snot*, *Swolen Heat Syn&wme (SHS)* dan gumboro yang bersifat immunosupresif Ahmad (1997), telah meneliti penurunan respon imun pada stres yang memudahkan infeksi *Helicobacter pylori*. Mohamed dan Hanson (1980), melaporkan pada ayam yang mengalami stresor sosial dengan dipisahkan (diisolasi) dalam waktu 24 jam, terjadi peningkatan kadar kortisol dalam darahnya. Trout dan Mashaly (1994), meneliti bahwa heat stres dengan mengkondisikan ayam pada suhu 35°C, 5 jam / hari selama 5 hari, dan injeksi ACTH 50 IU/kg selama 5 hari pada ayam dan burung dapat menyebabkan penurunan distribusi populasi limfosit dalam darahnya. Namun demikian, perlu dikaji lebih mendalam melalui pendekatan imunopatologik mengenai berbagai macam penyebab menurunnya respon imun pada ayam yang divaksinasi ND, terutama pada kondisi menerima stressor.

Stres dapat mempengaruhi sel limfosit melalui produksi hormon kortisol. Kortisol akan memodulasi sistem imun dengan menghambat produksi *Interleukin-1 (IL-1)* dari makrofag dan *Interleukin-2 (IL-2)* dari sel T. Dengan demikian, terjadi penurunan respon sel T, dengan berkurangnya populasi sel T-helper, menyebabkan berkurangnya sel B maupun sel plasma, sehingga terjadi penurunan produksi antibodi (Mc. Cance dan Shelby, 1994).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut diatas, rumusan masalah pada penelitian ini adalah apakah terdapat perubahan jumlah sel limfosit pada bursa fabrisius ayam yang mendapat stressor bising dan divaksinasi ND?

1.3 Landasan Teori

Rangsangan stres dapat menyebabkan gangguan pada sistem imun sehingga tubuh akan mudah terserang penyakit (Miller dan Spencer, 1995). Konsep tentang stres yang dapat mempengaruhi sistem kekebalan dan daya tahan tubuh telah diteliti sejak setengah abad yang lalu, termasuk didalamnya hubungan antara faktor sosial, psikologis, dan biologis sebagai penyebab timbulnya penyakit (McCance dan Shelby, 1994). Selye (1946) mengatakan bahwa dalam, suatu penelitian terhadap hewan coba tikus, terjadi perubahan pada timus dan struktur limfoid yang lain. Timus dan struktur limfoid yang lain mengalami atrofi, selanjutnya ditemukan bahwa hal tersebut terjadi disebabkan oleh stres akibat perlakuan yang merugikan terhadap hewan coba berupa suhu dingin, luka operasi dan restraint.

Menurut Coles (1990), stres dapat menurunkan jumlah sel limfosit. Hal ini erat kaitannya dengan mekanisme regulasi dan hormon adrenokortikoid yang memiliki pengaruh terhadap sel limfosit, terutama sel limfosit yang memiliki masa hidup pendek. Sel limfoid dalam tubuh dibagi menjadi sel limfoid yang masa hidupnya panjang dan sel limfoid yang masa hidupnya pendek. Sel limfoid yang masa hidupnya panjang terdapat pada

sumsum tulang, sedangkan sel limfoid yang masa hidupnya pendek terdapat pada medulla dan folikel jaringan limfoid seperti bursa fabrisius.

Bursa fabrisius atau dalam bahasa latin disebut *Bursa Cloacalis* atau *Bursa of Fabricii*, merupakan salah satu organ limfoid yang hanya dimiliki oleh unggas. Bursa fabrisius terletak di bagian dorsal dari kloaka dan merupakan tempat dihasilkannya Sel B yang membentuk sel plasma dan memproduksi antibodi, sehingga organ ini berperan penting dalam sistem pertahanan tubuh (Riddell, 2004).

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian stressor bising terhadap jumlah sel limfosit pada bursa fabrisius, ayam setelah vaksinasi ND.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah

1. Dapat memberikan informasi bahwa ayam yang mendapat stressor bising dan divaksinasi ND akan mengalami perubahan pada jumlah sel limfosit bursa fabrisius.
2. Mendapatkan landasan atau dasar dalam pengelolaan ternak unggas terutama dalam menanggulangi wabah ND.

1.6 Hipotesa penelitian

Hipotesa dalam penelitian ini adalah terdapat perubahan jumlah sel limfosit pada bursa fabrisius ayam yang mendapat stressor bising dan divaksinasi ND.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Newcastle Disease*

Newcastle disease (ND) dikenal juga sebagai *Pseudovogelpest*, *Pseudo Fowl Plaque*, *Pseudopestis Avium*, *Pseudopoultry Plaque*, *Avian Pneumoencephalitis*, *Asiatische Vogelpest*, *Avian Pest*, *Avian Distemper*, *RanMet Disease*, *Korean Fowl*, *Maldle de Newcastle*, *Enfer-medad de Newcastle*, *Tetelo*, *Sampar ayam*, *Pes Unggas* (Werner, 1989; Sudardjat, 1991; Tabbu, 2000).

Newcastle Disease (ND) pertama kali ditemukan oleh Kraneveld pada tahun 1926 di Bogor, Indonesia. Satu tahun sesudahnya penyakit ditemukan di Inggris oleh Doyle yang kemudian memberi nama penyakit tersebut dengan sebutan *Newcastle Disease* karena terjadinya penyaltdt ini di daerah Newcastle (Fenner *et al*, 1993).

Newcastle Disease (ND) adalah penyakit menular yang disebabkan oleh virus dari familia Paramyxovirus, berbentuk spherik atau pleomorfik (Alexander, 1991). Penyakit ini mempunyai angka kematian yang sangat tinggi, menyerang semua jenis; ayam, kalkun, burung dan manusia. Penyakit ini bersifat akut, sangat fatal dan menyerang pada semua umur ayam. Ayam sering ditemukan mati mendadak tanpa gejala klinis yang jelas (Buxton dan Fraser, 1977; Hanson, 1987).

Newcastle Disease menyerang unggas baik piaraan maupun liar. Hewan muda lebih rentan daripada hewan dewasa dan menyebabkan

mortalitas yang tinggi (Anonimus, 2003). Mortalitas dan morbiditas ND berbeda-beda tergantung jenis species dan strain virus ND. Pada peternakan unggas, ayam merupakan unggas yang paling peka terhadap ND dibandingkan unggas yang lain (01E, 2002). Manusia juga dapat terinfeksi virus ini dengan gejala penyakit yang ringan, misalnya mata merah atau konjungtivitis ringan (Beard dan Hanson, 1984).

Gejala klinis ND pada unggas bervariasi tergantung dari strain virus ND yang menginfeksi:

1. Velogenik Viserotropik

Menunjukkan gejala perakut seperti penurunan produksi telur yang tajam, depresi, respirasi meningkat, diare profus berwarna hijau, Dedematus, sianosis, konjungtivitis, dan mortalitas lebih dari 90%.

2. Velogenik Neurotropik

Menunjukkan gejala syaraf seperti depresi, tremor, tortikolls, batuk, paralisis sayap dan kaki, mortalitas pada ayam 20%.

3. Mesogenik

Gejala yang tampak adalah depresi, penurunan berat badan, penurunan produksi telur, gangguan respirasi akut, mortalitas 10%.

4. Lentogenik

Umumnya bersifat subklinis dengan gejala gangguan pematangan, produksi telur menurun, tidak tampak gejala syaraf dan kematian kecuali disertai dengan masuknya agen penyakit lain, misalnya *E coli*.

5. Avinilent

Bersifat subklinis dengan gejala infeksi enterik (Anonimus, 2002; OIE, 2002)

Newcastle Disease ditularkan melalui kontak langsung dari unggas sakit ke unggas yang sehat. Penularan secara tidak langsung terjadi melalui kontak antara unggas dengan manusia, bahan atau alat, debu dan udara yang tercemar virus ND (Dharma. dan Putra, 1997).

2.2 *Newcastle Disease Virus* (NDV)

Newcastle Disease Virus (NDV) memiliki klasifikasi sebagai berikut :

Group	: <i>Group V ((-)ssRNA)</i>
Order	: <i>Mononegavirales</i>
Famili	: <i>Paramyxoviridae</i>
Sub Family	: <i>Paramyxovirinae</i>
Genus	: <i>Rubulavirus</i>
Serotipe	: <i>Paramyxovirus type I (PMV-1)</i>
Prototipe	: <i>Newcastle disease virus</i>

(Alexander, 1988; Murphy, dkk, 1999; OIE., 2002; Ritchie dan Harrison, 2003)

Newcastle disease Virus (NDV) tersusun dari asam inti ribonukleat (RNA) berantai tunggal dengan struktur helikal, berukuran garis tengah dengan antara 100 - 300 nm dan mempunyai selubung yang terdiri dari lapisan lemak (Beard and Hanson, 1984).



Gambar 2.1 : *Newcastle Disease Virus* (NDV) (Anonimus, 2007).

Virus ND terdiri dari amplop dan komponen dalam (nukleokapsid) yang juga dikenal sebagai nukleoprotein antigen solubel (Beard dan Hanson, 1984). Amplop adalah lapisan paling luar dari virus yang terdiri dari protein *Hemagglutinin Neuraminidase* (HN) dan *Fusion* (F). *Hemagglutinin Neuraminidase* (HN) mempunyai reseptor dengan sel darah merah, sehingga dapat menyebabkan terjadinya aglutinasi sel darah merah, sedangkan *Fusion* (F) bertanggung jawab terhadap perlekatan virus pada sel hospes. Replikasi *Newcastle Disease Virus* (NDV) terjadi pada sitoplasma sel hospes (Beard dan Hanson, 1984; Spradbrow, 1987; Fenner dkk. 1993; Anonimus, 2007).

1. Bentuk Doyle

Ditemukan oleh Doyle tahun 1926. Bentuk ini merupakan bentuk infeksi letal akut yang dapat menginfeksi ayam semua umur. Lesi hemorhagi ditemui pada saluran pencernaan dan disebabkan virus ND strain Viserotropik Velogenik, sehingga, bentuk ini disebut juga. *Viscerotropic Velogenic Newcastle Disease* (VVND).

2. Bentuk Beach

Ditemukan 15 tahun kemudian oleh Beach pada tahun 1942 bentuk ini merupakan bentuk akut dan seringkali menimbulkan infeksi letal, pada ayam semua umur yang disertai lesi pada sistem pernafasan dan syaraf. Bentuk ini disebabkan oleh virus ND strain Neurotropik Velogenik, sehingga, disebut juga, *Neurotropic Velogenic Newcastle Disease* (NVND).

3. Bentuk Beaudette

Ditemukan oleh Beaudette, dan Black pada tahun 1946. Bentuk ini merupakan bentuk akut pada, sistem respiratorius dan sering juga menimbulkan infeksi nervus letak pada ayam muda. Patotipe ini disebabkan Virus ND strain Mesogenik.

4. Bentuk Hitchner

Ditemukan oleh Hitchner dan Johnson pada. tahun 1948.

Bentuk ini merupakan bentuk ringan dengan infeksi respiratorius ringan yang disebabkan oleh virus ND strain Lentogenik dan memiliki mortalitas yang rendah pada unggas semua umur. Bentuk Asimptomatik Enterik

Ditemukan oleh Lanchaster pada tahun 1981 dan bentuk ini disebabkan oleh strain Lentogenik yang secara umum tidak menunjukkan gejala klinis dan patologis yang berard sehingga strain ini disebut juga strain *Avirulent*.

2.3 Stres dan Stressor

Dalam ilmu psikologi stres diartikan sebagai suatu kondisi kebutuhan tidak terpenuhi secara adekuat sehingga menimbulkan adanya ketidakseimbangan (Fahmi M., 2007). Taylor (1995), seperti yang dikutip Bambang dan Sumadiono (2007), mendeskripsikan stres sebagai pengalaman emosional negatif disertai perubahan reaksi biokimiawi, fisiologis, kognitif dan perilaku yang bertujuan untuk mengubah atau menyesuaikan diri terhadap situasi yang menyebabkan stres. Stress adalah kondisi dimana individu untuk mengatasinya sampai melewati batas kemampuan dirinya. (McCance dan Shelby, 1994). Menurut Kort (1994), stress merupakan reaksi tubuh untuk melawan agen perusak, infeksi dan bermacam-macam keadaan abnormal (stressor), sehingga cenderung mengganggu homeostasis.

Stres baik ringan, sedang maupun berat dapat menimbulkan perubahan fungsi fisiologis, kognitif, emosi dan perilaku. Stres dapat dibedakan menjadi dua macam, yaitu akut dan kronik (Fahmi M., 2007). Sedangkan dalam penelitian Ross dan Viowsky (1979), seperti yang dikutip dalam Fahmi (2007), menyatakan bahwa efek psikologi tidak tergantung pada jumlah stres maupun beratnya stres yang terjadi, akan tetapi tergantung pada status stres itu sendiri, apakah stres tersebut diinginkan (*desirable stress*) atau tidak

diinginkan (undesirable stress). Stres yang tidak diinginkan mempunyai potensi yang lebih besar dalam menimbulkan efek psikologik.

Menurut Prawirohusodo (1988), stresor adalah faktor-faktor yang dapat menimbulkan terjadinya stres. Stresor dapat dibedakan menjadi tiga golongan, yaitu

1. Stresor fisikbiologik : dingin, panas, infeksi, rasa nyeri, pukulan dan lain-lain.
2. Stresor psikologis : takut, khawatir, cemas, marah dan lain-lain.
3. Stresor sosial budaya : perselisihan, pertengkaran dan lain-lain.

Stres yang merusak sering disebut distress, adalah ketika impuls rangsangan diterima secara terus-menerus dan berulang kali yang melampaui batas adaptasi (Fahmi M., 2007)

Sistem saraf, endokrin, dan sistem imun saling berhubungan dengan memanfaatkan berbagai substansi penghantar sinyal stres dan reseptor sinyal, yang berakibat terjadi pengaturan perilaku sel pada sistem imun. Stres yang berlangsung lama, mampu menurunkan fungsi respon imun sehingga tubuh rentan terhadap penyakit (McCance dan Shelby, 1994; Putra; 1998). Stres dapat menyebabkan peningkatan kortisol dan katekolamin sehingga akan menekan aktivitas sel imunokompeten yang berakibat pada penurunan ketahanan tubuh (Fahmi M., 2007).

Tidak semua individu mempunyai reaksi stress yang sama, sehingga suatu kondisi atau keadaan dinamakan stressor tergantung bagaimana individu menanggapi keadaan itu. Penolakan beban yang lebih dari kemampuan, yang

bisa dipelajari dengan melakukan relaksasirelaksasi yang dikenal dengan "coping" (Putra, 1998). Mekanisme *coping* penting dalam menimbulkan efek stressor pada sistem imun. *Coping* ini menempati tempat yang sentral terhadap ketentraman atau ketahanan tubuh dan daya penolakan terhadap gangguan atau serangan suatu penyakit baik yang bersifat psikis atau fisik (Notosoedirdjo, 1998). Stress yang menyebabkan penekanan fungsi sistem imun mungkin berhubungan dengan status psikologis individu, dimana kemampuan cope terhadap stressor, akan meredakan atau mengurangi beberapa efek yang merugikan. Mekanisme *coping* dapat terbentuk lewat proses belajar dan mengingat. *Coping* individu yang berlangsung efektif, walaupun ada peningkatan stress, sehingga kerentanan tubuh terjadinya sakit dapat dicegah atau ditiadakan (Miffler dan Spencer, 1995).

2.4 Sistem imun pada ayam

Menurut Bambang dan Sumadiono (2007), sistem kekebalan tubuh terdiri atas sistem imun spesifik (adaptive / acquired) dan sistem imun nonspesifik (natural/native). Sistem imun spesifik terdiri dari sistem imun spesifik humoral dan selular. Yang berperan dalam sistem imun spesifik humoral adalah limfosit B atau sel B yang jika dirangsang oleh benda asing akan berproliferasi menjadi sel plasma yang dapat membentuk antibodi (imunoglobulin). Selain itu juga berfungsi sebagai Antigen Presenting Cells (APC). Sedangkan yang berperan dalam sistem imun spesifik selular adalah limfosit T atau sel T yang berfungsi sebagai regulator dan efektor. Fungsi

regulasi terutama dilakukan oleh sel T helper (sel TH, CD4) yang memproduksi sitokin seperti interleukin-4 (IL4 dan IL-5) yang membantu sel B memproduksi antibodi, IL-2 yang mengaktivasi sel-sel CD4, CD8 dan *Interferon* yang makrofag. Fungsi efektor terutama dilakukan oleh sel T sitotoksik (CD8) untuk membunuh sel-sel yang terinfeksi virus, sel-sel tumor, dan allograft. Fungsi efektor CD4+ adalah menjadi mediator reaksi hipersensitifitas tipe lambat pada organisme intraseluler seperti *Mycobacterium*.

Pada keadaan tidak homeostasis, bang)dtanya respon imun ini dapat merugikan kesehatan, misal pada reaksi autoimun atau reaksi hipersensitifitas (alergi). Beberapa penyakit seperti diabetes melitus, sklerosis multipel, lupus, artritis rematoid termasuk contoh penyakit autoimun. Kondisi ini terjadi jika sistem imun disensitisasi oleh protein yang ada dalam tubuh kemudian menyerang jaringan yang mengandung protein tersebut. Mekanisme terjadinya masih belum jelas (Bambang dan Sumadiono, 2007).

Sistem imun nonspesifik dapat memberikan respon langsung terhadap antigen. Sesuai dengan namanya, sistem imun nonspesifik ini tidak ditujukan terhadap mikroorganisme tertentu. Komponen sistem imun nonspesifik terdiri atas pertahanan fisik dan mekanik, biokimiawi, humoral dan seluler (Bambang dan Sumadiono, 2007).

Sistem pertahanan fisik dan mekanik meliputi kulit, mukosa, silia pada saluran nafas, batuk dan bersin. Hal diatas, berfungsi sebagai preventif way dalam mencegah masuknya berbagai benda asing yang bersifat patogen ke

dalam tubuh. Sedangkan pertahanan tubuh secara kimiawi berupa bahan yang disekresi mukosa saluran nafas, kelenjar sebaceous kulit, telinga, spermin dalam semen dan lain-lain (Bambang dan Sumadiono, 2007).

Pertahanan non-spesifik humoral terdiri dari berbagai bahan seperti komplemen yang berperan meningkatkan fagositosis (opsonisasi) dan mempermudah destruksi bakteri dan parasit, interferon, fagosit (makrofag, *neutrofil*), *tumor necrosis factor* (TNF) dan *C-Reactive protein* (CRP).

Interferon menyebabkan sel jaringan yang belum terinfeksi menjadi tahan virus. Di samping itu interferon dapat meningkatkan aktifitas sitotoksik *Natural Killer Cell* (sel NK). Sel yang terinfeksi virus atau menjadi ganas akan menunjukkan perubahan di permukaannya sehingga, dikenali oleh sel NK yang kemudian membunuhnya (Bambang dan Sumadiono, 2007).

Natural Killer Cell (sel NK), adalah sel limfoid yang ditemukan dalam sirkulasi dan tidak mempunyai ciri sel limfoid dari sistem imun spesifik, sehingga disebut sel non B non T (sel NBNT) atau sel populasi ke tiga. Sel NK dapat menghancurkan sel yang mengandung virus atau sel neoplasma (Bambang dan Sumadiono, 2007).

Fagosit atau makrofag dan sel NK berperan dalam sistem imun nonspesifik seluler. Dalam kerjanya sel fagosit juga berinteraksi dengan komplemen dan sistem imun spesifik. Penghancuran kuman terjadi dalam beberapa tingkat, yaitu kemotaksis, menangkap, memakan (fagositosis), membunuh dan mencerna (Bambang dan Sumadiono, 2007).

Banyak cara dilakukan untuk pemeriksaan / penilaian sistem imun humoral antara lain dengan *radioimunoassai (RIA)*, *enzym linked immunosorbent asai (ELISA)*, *fluorescence immunoassai FIA*) dan uji hemaglutinasi (HA), inhibition hemaglutinasi (HI). Produksi antibodi berlangsung sangat cepat, antibodi penghambat hemaglutinasi (HI), dapat diamati 4-6 hari pascavaksinasi dan antibodi ini merupakan ukuran dari kekebalan (Fenner dkk, 1993)

2.5 Stress dan respon imun pada ayam

Kondisi stres dapat mengubah fungsi sistem imun, karena pada kondisi tersebut dapat dihasilkan berbagai neurotransmitter atau neuropeptida serta beberapa hormon yang mampu memodulasi fungsi sistem imun (McCance dan Shelby, 1994; Putra, 1998). Pengaruh stres terhadap sistem imun adalah akibat pelepasan neuropeptida dan adanya reseptor neuropeptida, pada limfosit B dan limfosit T. Kecocokan neuropeptida dan reseptornya, akan menyebabkan stres dapat mempengaruhi kualitas sistem imun (Bambang dan Sumadiono, 2007). Respon terhadap stres ditentukan melalui aktifitas hipotalamus - hipofisis - Cortex suprarenalis, sampai akhirnya disekresikan neuropeptida kedalam darah (McCance dan Shelby, 1994; Covelli, 1994).

Menurut Bambang dan Sumadiono (2007), Stresor pertama kali ditampung oleh pancaindera, dan diteruskan ke pusat emosi yang terletak di sistem saraf pusat. Dari sini, stres akan dialirkan ke organ tubuh melalui saraf otonom. Organ yang antara lain dialiri stres adalah kelenjar hormon dan

terjadilah perubahan keseimbangan hormon, yang selanjutnya akan menimbulkan perubahan fungsional berbagai organ target. Beberapa peneliti membuktikan stres telah menyebabkan perubahan neurotransmitter neurohormonal melalui berbagai aksis seperti (HPA) (Hypothalamic-Pituitary Adrenal Axis), (HPT) (Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis) dan HPO (Hypothalamic-Pituitary-Ovarial Axis).

Neuropeptida atau hormon yang berpengaruh pada respon imun yang utama adalah golongan steroid (Weiss, 1989; McCance dan Shelby, 1994; Covelli, 1994). Glukokortikoid, sebagai hormon steroid (termasuk kortisol), berperan mengubah sintesa *Ribonucleic Acid* (RNA) dan enzim pada jaringan sel target Akibatnya akan terjadi peningkatan sintesis total protein glukoneogenesis dan perubahan asam amino menjadi *Carbondioksida* (CO₂) + Urea. (Norris, 1980; Harper dkk, 1979)

Mekanisme kortisol dalam memodulasi sistem imun sangat multifaktorial, dimana akan menghambat produksi *Interleukin-1* (IL-1) dari makrofag, dan *Interleukin-2* (IL-2) dari sel T. Dengan demikian, terjadi penurunan respon sel T, dengan berkurangnya populasi sel Thelper, menyebabkan berkurangnya sel B maupun sel plasma, sehingga terjadi penurunan produksi antibodi (McCance dan Shelby, 1994). Sel plasma merupakan sel pengganti antibodi, sebagai bentuk morfofungsi dari sel B yang telah mengalami aktivasi, oleh beberapa, sitokin misalnya *Interleukin-2* (IL-2) dan *Interleukin-4* (IL-4), sel B akan berproliferasi dan berdeferensiasi akhirnya terbentuk sel plasma yang menghasilkan antibody Miller dan

Spencer, 1995). Efek kortisol yang dapat menekan respon terjadi pada kondisi stres yang kronis, sehingga kadar hormon kortisol dalam darah meningkat dalam waktu yang cukup lama (Parillo dan. Fauzi, 1979), selanjutnya dikatakan bahwa kortisol mempunyai efek pada beberapa tahapan / stadium dari proses imun dan efek tersebut tampaknya antagonis.

2.6 *Sel limfosit*

Limfosit adalah sel leukosit yang terdapat pada sumsum tulang dan selanjutnya bermigrasi ke bagian lain dari sistem limfatik, seperti limfonodus, limpa dan timus. Sel limfosit terbagi menjadi 2 yaitu : sel limfosit B dan sel limfosit T. Sistem limfatik juga memiliki sistem transport, yaitu melalui pembuluh limfe yang berfungsi untuk transport dan penyimpanan sel limfosit tubuh. Sistem limfatik juga berfungsi untuk menyaring keluar sel yang mati dan sebagai sistem pertahanan terhadap invasi mikroorganisme seperti bakteri (<http://nobelprize.org>)

Perkembangan sel limfosit bermula dari stem cell yang berkembang dari limfoblas melalui pro limfosit stage. Dari perkembangan tersebut akan dihasilkan sel limfosit dewasa yang berukuran besar dan kecil (Coles, 1992).

Sel limfosit memiliki diameter 8-10 mikrometer, inti selnya besar yang tersusun atas heterokromatin. Sel limfosit memiliki sitoplasma, tipis yang didalamnya terdapat mitokondria, ribosom, dan lisosom. Tidak dijumpai adanya organel-organel sel spesifik. Seperti sel darah yang lain, limfosit diproduksi di sum-sum tulang, hal ini pertama kali dibuktikan melalui

percobaan dengan menginduksi sum-sum tulang menggunakan sinar raAasi (Abbas *et al.*, 1997).

Menurut Abbas *et al.*, (1997), kekebalan merupakan hasil reaksi dari 2 tipe sel limfosit, sel limfosit B dan sel limfosit T diproduksi dalam sum-sum tulang. Sel limfosit T mengalami pematangan di kelenjar timus, sedangkan sel limfosit B diperkirakan mengalami pematangan di sum-sum tulang atau bursa fabrisius pada unggas. Berjuta-juta sel limfosit B bermigrasi ke seluruh tubuh melalui aliran darah dan sistem limfe.

Sel limfosit T dan sel limfosit B memiliki fungsi yang berbeda. Sel limfosit B menghasilkan antibodi yang disekresikan ke darah dan limfe. Sel limfosit T berfungsi menyerang antigen yang masuk ke dalam tubuh. Sel limfosit memiliki tipe yang berbeda-beda sesuai dengan antigen yang dihadapi. Tidak ada satu pun dari sel limfosit tersebut yang akan menyerang tubuh sendiri, sekalipun ada, hal tersebut sangat jarang terjadi (Abbas *et al.*, 1997).

2.7 Bursa Fabrisius

Organ limfoid ayam dikelompokkan menjadi organ limfoid primer dan organ limfoid sekunder. Organ limfoid primer berfungsi mengatur produksi dan diferensiasi limfosit sedang organ limfoid sekunder mengadakan respon terhadap stimulasi antigen. Organ limfoid primer pada ayam adalah timus dan bursa fabrisius. Organ limfoid yang terus ada selama hidup, meliputi Limpa, simpul limfe, limfonodus-limfonodus (Tizard, 1998).

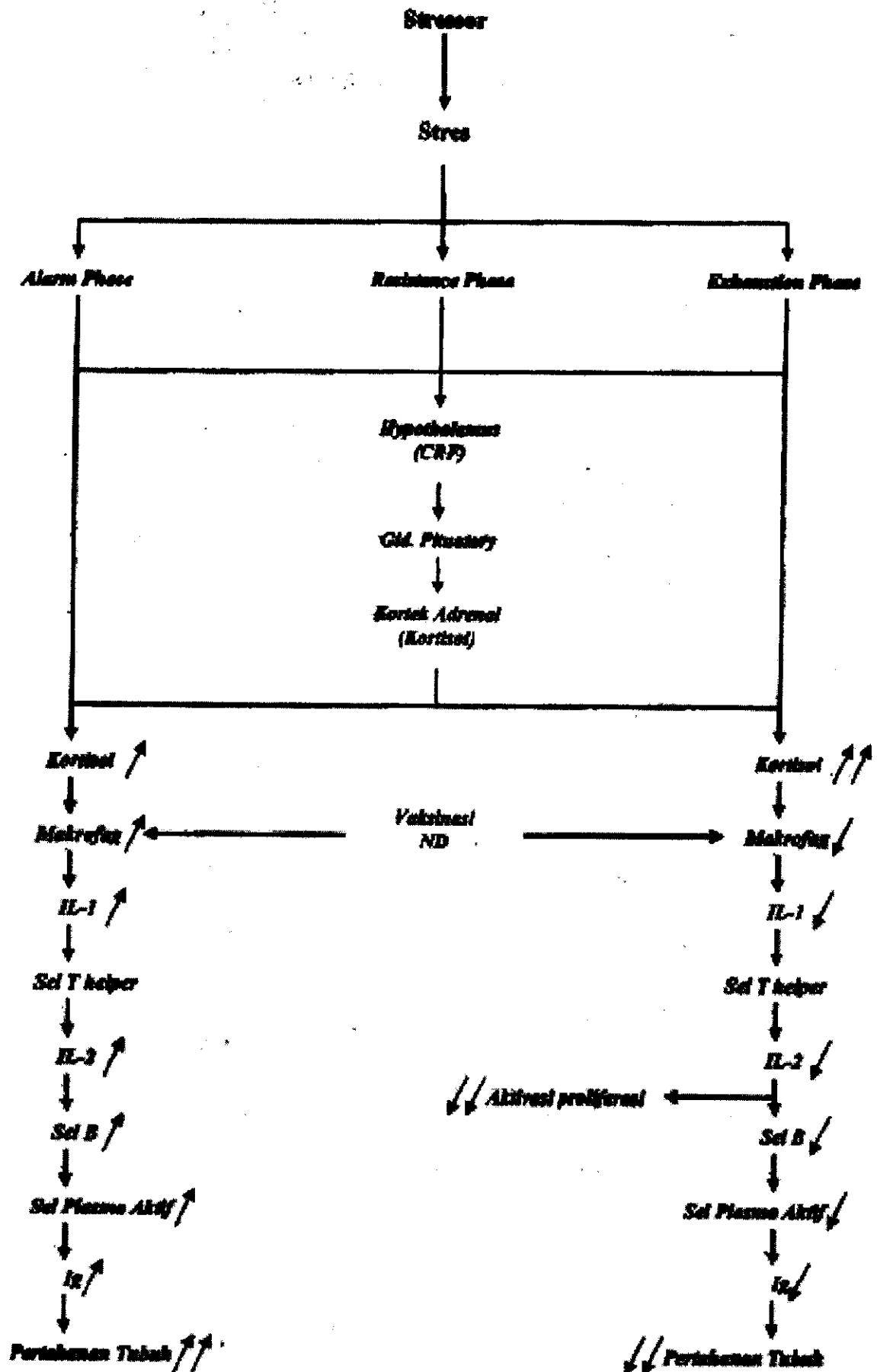
Bursa fabrisius terdiri dari sel limfoid yang terbalut dalam jaringan epithelial. Jaringan epithelial ini membatasi suatu kantong berongga yang dihubungkan dengan kloaka oleh suatu saluran. Pada bagian dalam kantong ini terdapat lipatan besar epitel menjulur ke dalam lumen dan melalui lipatan epithelial ini tersebar folikel sel limfoid. Setiap folikel limfoid terbagi atas korteks dan medulla. Korteks mengandung limfosit, sel plasma dan makrofag. Pada pertemuan kortiko-medulla terdapat membran basal dan jaringan-jaringan kapiler yang bagian dalamnya adalah sel epithelial. Sel epithelial medula ini sering menunjukkan mitosis, dan mengarah ke tengah medula tampak diganti limfoblast dan limfosit, dengan demikian bagian tengah medula terlihat terdiri dari limfosit (Tizard, 1998).



Gambar 2.2. Bursa fabrisius dengan pewarnaan HE (perbesaran 100 X)
(gambar dari ...)

Tizard (1998), menjelaskan bahwa fungsi bursa fabrisius adalah sebagai organ limfoid primer yang berfungsi untuk tempat pendewasaan dan diferensiasi bagi sel dari sistem pembentuk antibodi. Tetapi penelitian

dilakukan akhir-akhir ini memberikan interpretasi yang berbeda. Misalnya dapat dibuktikan bahwa sel limpa dari unggas yang mengalami bursektomi neonatal bila dipindahkan pada unggas normal, menyebabkan resipien kehilangan kemampuannya untuk membentuk antibodi. Telah dibuktikan bahwa hal ini terjadi sebagai akibat terbentuknya populasi sel supressor pada unggas yang mengalami bursektomi. Fungsi lain dari bursa fabnsius adalah sebagai organ limfoid sekunder, yaitu dapat menangkap antigen dan memproduksi antibodi.



Gambar 2.3 : Mekanisme penurunan respon imun pada kondisi stres (McCance dan Shelby, 1994)

BAB 3

MATERI DAN METODE

BAB 3 MATERI DAN METODE

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini berlangsung di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga pada bulan Maret - Mei 2007, yang meliputi pemrosesan jaringan, pembuatan preparat histopatologi dan pengamatan secara mikroskopis.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan adalah sebagai berikut : organ bursa fabrisius, larutan buffer formalin 10%, alkohol absolut alkohol, xylol, aquadest, balsem, gliserin, amonia, paraffin dan Hematoxilin Eosin.

Bursa fabrisius sebagai bahan pada penelitian ini diperoleh dari penelitian sebelumnya oleh Arimbi (1999). Pada penelitian ini digunakan organ bursa fabrisius, ayam sebanyak 20 organ.

3.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : scalpel steril, gunting, cawan petri, gelas labu, pinset steril, alat penghitung (counter), pot untuk menampung organ, pipet, mikroskop, mikrotum, obyek glass, cover glass, kamera digital.

3.2.3 Besaran Sampel

Jika t adalah jenis perlakuan dan r adalah ulangnya, sehingga diperoleh r sebanyak :

$$(t - 1) (r - 1) \geq 15 \text{ (Hanafiah, 199 1)}$$

$$4 - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$3 (r - 1) \geq 15$$

$$3r - 3 \geq 15$$

$$3r \geq 12$$

$r \geq 4$, sehingga ulangan minimalnya adalah 4

Dalam penelitian ini untuk tiap perlakuan digunakan sebanyak lima ulangan.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini adalah:

1. Variabel bebas:

- Stressor bising dengan tingkat kebisingan 102 dB, diukur dengan alat sound level meter VS-370A, merk national.
- Vaksinasi ND strain lentogenik (La Sota), diberikan secara tetes mata 0,05ml/dosis

2. Variabel Tergantung: Jumlah sel limfosit pada folikel limfoid bursa fabrisius ayam yang dihitung dengan alat penghitung (counter) melalui pengamatan mikroskopis perbesaran 400x dengan menggunakan tehnik pewarnaan BE.

3. Variabel Kendali: Umur, jenis kelamin, sanitasi kandang, pakan dan minum dan kepadatan kandang.

3.4 Metode Penelitian

3.4.1 Perlakuan yang diberikan

Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dari penelitian sebelumnya oleh Arimbi (1999). Pada penelitian tersebut, perlakuan diberikan kepada 100 ekor anak ayam strain CP 909 yang dibagi menjadi 4 kelompok, masing-masing terdiri dari 25 ekor, yaitu :

Kelompok P0: kontrol (tanpa stressor, tanpa vaksinasi) (S-V-)

Kelompok P1: perlakuan tanpa stressor, dengan vaksinasi -(S-V+)

Kelompok P2: perlakuan dengan stressor, tanpa vaksinasi (S+V-)

Kelompok P3 : perlakuan dengan stressor, dengan vaksinasi (S+V+)

Pada penelitian tersebut, penelitian dilakukan dengan jadwal sebagai berikut :

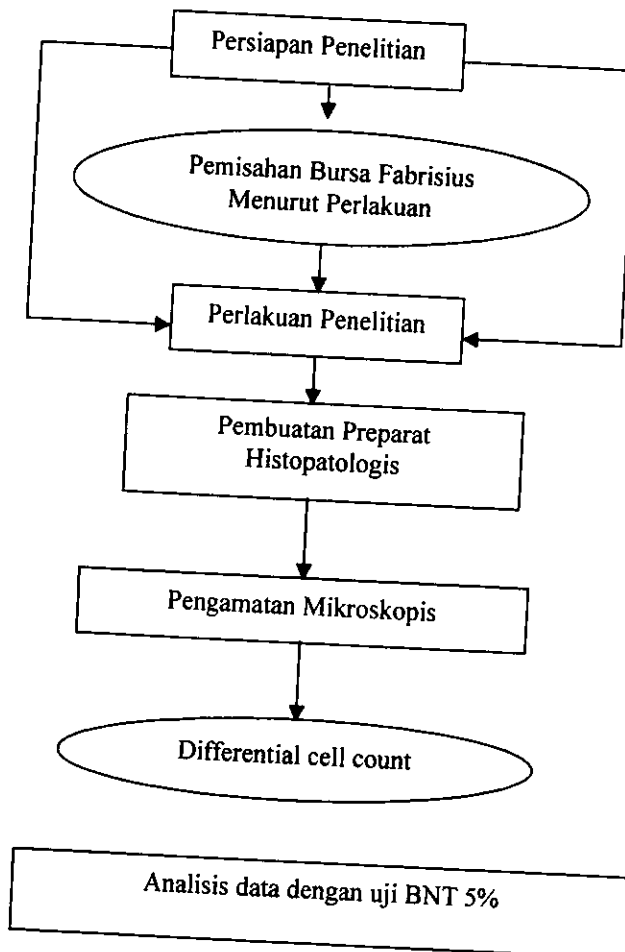
1. Minggu ke 1 ayam diadaptasikan dengan lingkungannya.
2. Minggu ke 2 pemberian stressor pada kelompok P2 dan P3, dengan lama pemberian stressor adalah 16 jam per hari mulai jam 06.00 - 22.00 dengan tingkat kebisingan 102 db, diukur dengan alat sound level meter VS-370A, merk national.
3. Minggu ke 5) pemberian vaksinasi pada kelompok P1 dan P3 (Pada kelompok dengan stressor dan tanpa stressor).
4. Minggu ke 8: koleksi organ untuk pemeriksaan histopatologis.

Bursa fabrisius sebagai bahan penelitian ini diambil pada minggu ke 8 pada penelitian sebelumnya oleh Arimbi (1999) yang selanjutnya disimpan dalam botol berisi larutan formalin. Dalam penelitian ini, sampel dari masing-masing kelompok perlakuan diambil sebanyak lima organ bursa fabrisius yang selanjutnya dibuat menjadi sediaan histopatologis dengan metode pewarnaan HE.

3.5. Peubah yang Diamati

Peubah yang diamati dalam penelitian ini adalah jumlah sel limfosit folikel limfoid bursa fabrisius pada sediaan histopatologis dengan metode pewarnaan HE melalui pemeriksaan mikroskopis dengan perbesaran 400x.

3.6 Gambar Kerangka Operasional Penelitian



3.7 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimen sesungguhnya (*true experimental*). Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (*Complete Randomized Design*), dengan skema sebagai berikut:

	Stress +		Stress -	
	Vaksin +	Vaksin -	Vaksin +	Vaksin -
Jumlah Sel Limfosit				

3.8 Analisis Data

Data hasil penelitian ini dianalisa menggunakan Anova (*Analysis of Variance*) dan apabila terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji BNT dengan tingkat signifikansi 5% (Kusriningrum, 1989).

BAB 4

HASIL PENELITIAN

BAB 4 HASIL PENELITIAN

Data yang diperoleh berdasarkan pengamatan mikroskopis adalah perubahan jumlah sel limfosit pada folikel limfoid bursa fabrisius. Pada tiap sediaan histopatologis dilakukan penghitungan sel limfosit pada tiga folikel limfoid dapat dilihat pada lampiran 2. Hasil penghitungan selanjutnya dirata-rata dan ditransformasikan ($\sqrt{X}$) dapat dilihat pada tabel 4.1 dan lampiran 3. Transformasi dilakukan karena dari hasil analisa menggunakan Anova diperoleh nilai heterogenitas (F_{hitung}) yang tinggi.

Tabel 4.1 Rata-rata $\pm$ Simpangan Baku Jumlah Sel Limfosit

<i>Perlakuan</i>	<i>Ulangan</i>	<i>Rata-rata J: SD</i>
PO	5	44,80 $\pm$ 0,9404 ^b
Pi	5	75,29 $\pm$ 14,070 ^a
P2	5	35,58 $\pm$ 1,1483 ^c
P3	5	40,08 $\pm$ 0,8746 ^{bc}

Keterangan

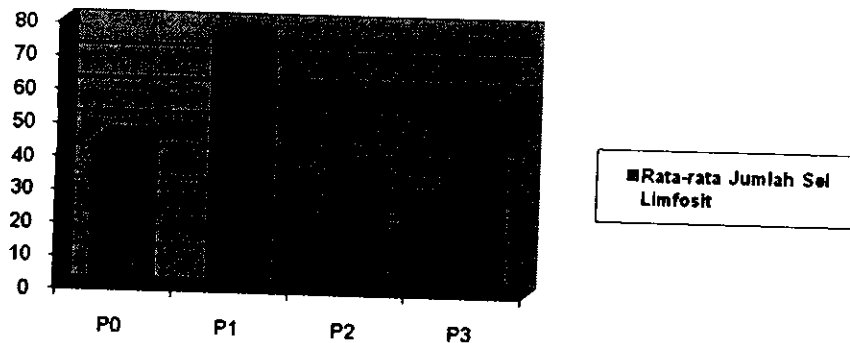
Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata.

P0 : kontrol (tanpa stressor, tanpa vaksinasi) (S-V-)

P 1 : perlakuan tanpa stressor, dengan vaksinasi -(S-V+)

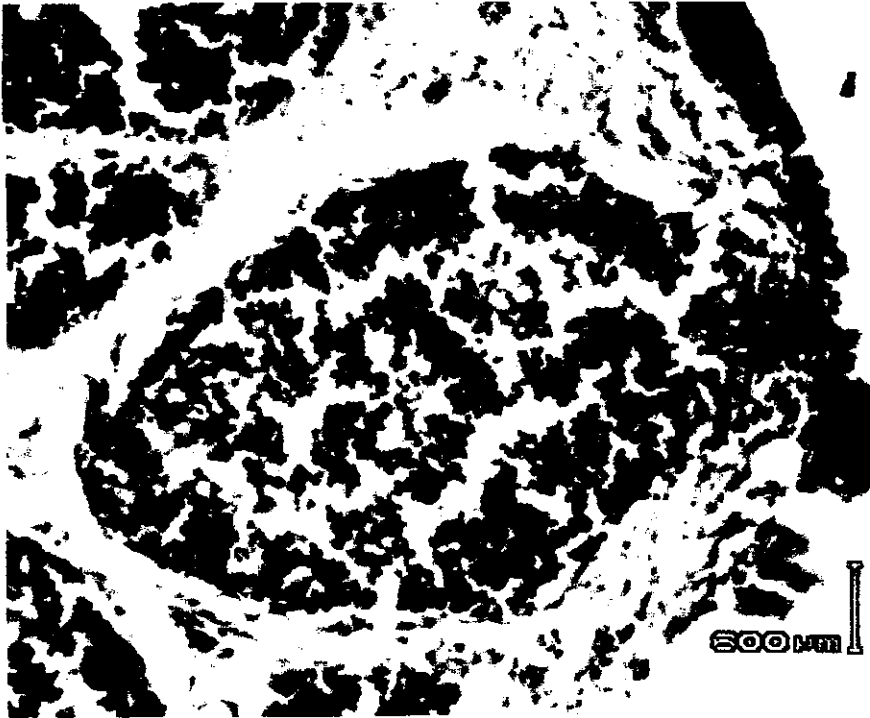
P2: perlakuan dengan stressor, tanpa vaksinasi (S+V-)

P3 : perlakuan dengan stressor, dengan vaksinasi (S+V+)



Garnbar 4.1 Diagram batang rata-rata jumlah sel limfosit bursa fabrisius ayam

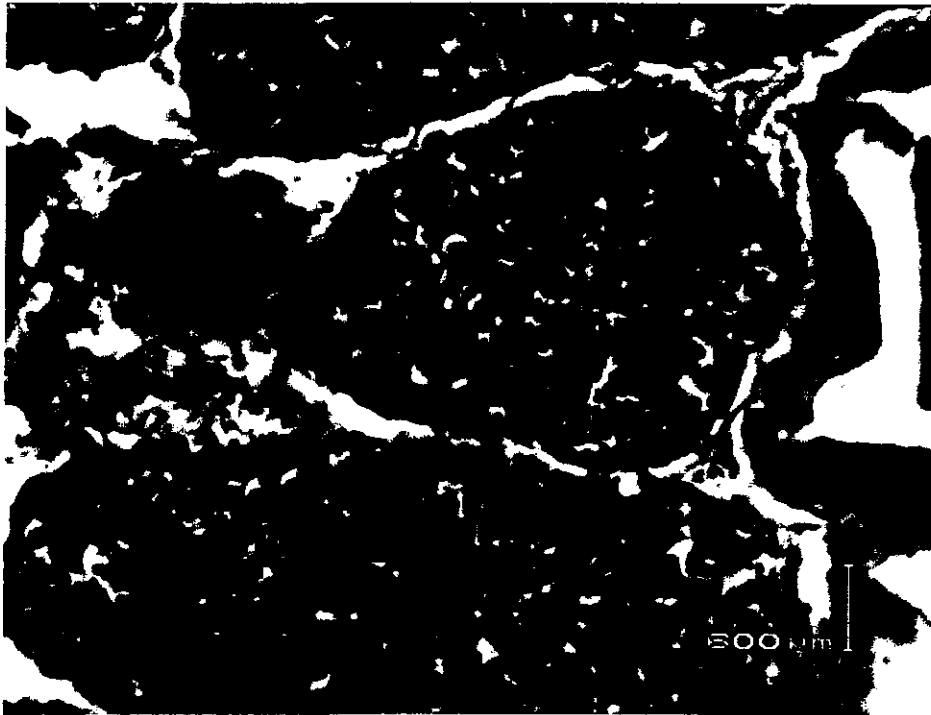
Data yang telah ditransformasikan selanjutnya dianalisa menggunakan Anova (*Analysis of Variance*) dan diperoleh hasil $F_{hitung} = 34,1816 > F_{tabel} (0,01) = 5,29$, maka dapat disimpulkan bahwa diantara perlakuan terdapat perbedaan yang sangat nyata ($p < 0.01$). Tahap berikutnya dilakukan uji BNT taraf signifikansi 5%. Hasil uji BNT menunjukkan bahwa nilai tertinggi diperoleh pada perlakuan P1 yang berbeda nyata ($p < 0.05$) dengan perlakuan yang lain, nilai terendah diperoleh pada perlakuan P2 yang tidak berbeda nyata ($p > 0.05$) dengan perlakuan P3, sedangkan antara P0 dan P3 tidak berbeda nyata ($p > 0.05$).



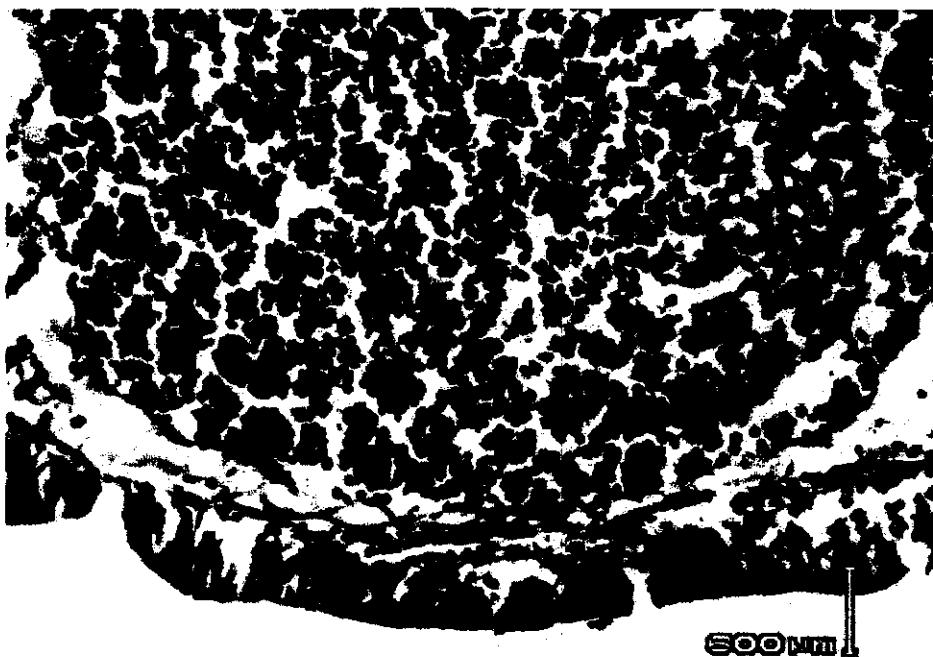
Gambar 4.2 Bursa fabrisius pada perlakuan P0 (S-V-) perbesaran 400x



Gambar 4.3 Bursa fabrisius pada perlakuan P1 (S-V+) perbesaran 400x



Gambar 4.4 Bursa fabrisius pada perlakuan P2 (S+V-) perbesaran 400x



Gambar 4.5 Bursa fabrisius pada perlakuan P3 (S+V+) perbesaran 400x

BAB 5

PEMBAHASAN

BAB 5 PEMBAHASAN

Pada peternakan ayam, vaksinasi memiliki peran penting dalam pencegahan penyakit. Keberhasilan vaksinasi dipengaruhi oleh kondisi sistem imun ayam dalam menanggapi imunogen. Tinggi rendahnya antibodi yang dihasilkan dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain : jenis vaksin, cara vaksinasi, kondisi ayam seperti stress, ada tidaknya penyakit dan masih tingginya titer antibodi maternal (Rangga Tabbu, 1996).

Psikoneuroimunologi sebagai ilmu yang digunakan untuk menjelaskan tentang respons imun pada kondisi stres mulai dikembangkan. Holden (1980) dan Ader (1981), dalam Widodo (2007) menyatakan bahwa psikoneuroimunologi adalah kajian yang melibatkan berbagai segi keilmuan, neurologi, psikiatri, patobiologi dan imunologi. Konsep psikoneuroimunologi ini muncul saat adanya penelitian tentang adanya hubungan antara stress dengan kekebalan tubuh. Dimana ditemukanlah kesimpulan bahwa stress bisa menyebabkan turunnya imunitas tubuh.

Konsep ini memberi peluang untuk menjelaskan perubahan biologis sebagai bentuk respons stres oleh rangsangan. Sinyal stres yang dirasakan individu, dirambatkan melalui *hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis* (HPA axis). Stresor menyebabkan peningkatan corticotropin releasing factor (CRF) hipotalamus, yang memicu aktivitas HPA axis. Pengaruh kortisol pada hambatan sekresi IL-1 oleh makrofag dan IL-2 oleh sel Th yang dapat menurunkan sintesis imunoglobulin oleh sel B.

Pada penelitian ini, ingin diungkap respon imun ayam yang diberi stressor bising setelah vaksinasi ND. Dengan pendekatan konsep Psikoneuroimmunologi yang menjelaskan tentang respon imun pada kondisi stres, respon tersebut dilihat dari jumlah sel limfosit pada bursa fabrisius yang merupakan sel penghasil antibodi. Menurut Coles (1990), stress dapat menurunkan jumlah sel limfosit. Hal ini erat kaitannya dengan mekanisme regulasi dari hormon adrenokortikoid yang memiliki pengaruh terhadap sel limfosit.

Stresor pertama kali ditampung oleh pancaindera dan diteruskan ke pusat emosi yang terletak di sistem saraf pusat. Dari sini, stres akan dialirkan ke organ tubuh melalui saraf otonom. Organ yang antara lain dialiri stres adalah kelenjar hormon dan terjadilah perubahan keseimbangan hormon, yang selanjutnya akan menimbulkan perubahan fungsional berbagai organ target. Beberapa peneliti membuktikan stres telah menyebabkan perubahan neurotransmitter neurohormonal melalui berbagai aksis seperti HPA (Hypothalamic-Pituitary Adrenal Axis), HPT (Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis) dan HPO (Hypothalamic-Pituitary-Ovarial Axis).

Seley (1946), seperti yang dikutip Mc Cance dan Shelby (1994), melaporkan adanya perubahan struktural yang terjadi setelah pada tikus yang diberi stressor merugikan yaitu ;

1. Pembesaran pada korteks adrenal,
2. Atropi dari glandula timus dan beberapa organ limfoid lainnya.
3. Terbentuknya ulser pada lambung dan usus /duodenal.

Selanjutnya Seley, dan Noris (1980), mendefinisikan tiga tahapan respons individu dalam menerima stressor, yang dikenal dengan *General Adaptation Syndrome* (GAS), pertama adalah *The Alarm Stage*, dimana stressor mulai memicu sistem syaraf, sehingga kelenjar pituitari dan sistem syaraf mulai beraksi, disini terjadi pengerahan sistem pertahanan tubuh. Kedua, *The stage of resistance (adaptation)*, dimulai dengan reaksi dari hormon kortisol dari kelenjar adrenal, neropineprin dan epineprin sehingga sistem mobilisdasi tubuh berjalan terus menerus, dan adaptasi yang tidak berjalan baik akan mengakibatkan gangguan homeostasis dan modulasi pada sel imunokompeten. Ketiga, *Exhaustion Stage* yaitu terjadi penurunan respon imun, sehingga mudah terkena infeksi penyakit (McCance dan Shelby, 1994). Stressor dapat merubah fungsi sistem imun melalui 2 jalan, yaitu : Pertama, stressor dapat menyebabkan gangguan fungsi sel-sel imun itu sendiri, termasuk aktifitas dalam memproduksi IL-2, dan ekspresi gene IL-2. Kedua, limfosit mempunyai 2 sinyal reseptor yaitu terhadap stimulus neural melalui neurotransmitter, neurohormon, atau neuropeptida, dan reseptor terhadap stimulus imun melalui antigen, limfokin dan kontak antar sel, yang kesemuanya itu menyebabkan perubahan terhadap respon limfosit. Stress kronis / intensif akan menyebabkan sel-sel imun kehilangan respon untuk melawan adanya patogen. Pada sistem imun yang mengalami stress yang terus menerus dan tubuh tidak dapat merespon dengan baik, maka pemberian vaksinasi tidak akan menghasilkan titer antibodi yang maksimal. (Miller dan Spencer, 1995; Ader, 1995).

Data hasil penelitian yang telah dianalisa menggunakan Anova menunjukkan perbedaan yang sangat nyata diantara perlakuan. Analisa lebih

lanjut menggunakan uji BNT menunjukkan bahwa terjadi peningkatan jumlah sel limfosit pada perlakuan P1 (75,29) yang berbeda nyata dengan perlakuan yang lain. Hal tersebut berkaitan dengan vaksinasi yang diberikan.

Pada perlakuan P2 (35, 58) dan P3 (40,08) terjadi penurunan jumlah sel limfosit dibandingkan dengan P0 (44,89). Hal ini disebabkan oleh terjadinya penurunan respon imun akibat stres yang berkelanjutan. Stressor yang diberikan terus menerus tidak dapat diadaptasi dengan baik oleh ayam, sehingga respon imun yang terjadi mulai masuk tahapan *exhaustion phase* dari teori GAS yang merupakan tahapan stress yang merugikan sistem imun (Mc Cance dan Shelby, 1994).

Pada stress yang bersifat kronis, kortikosteroid dalam darah menjadi lebih tinggi dan dapat merusak sel imunokompeten seperti makrofag dan sel Th, sehingga terjadi penurunan respon imun baik yang bersifat primer maupun sekunder. Menurut Miller dan Spencer (1995), kortisol memiliki reseptor pada sel limfosit yaitu β *adrenergic receptor* yang menyebabkan steroid yang terikat membran akan masuk ke dalam sel dan inti sel, sehingga terjadi gangguan replikasi. Replikasi yang terganggu akan mengakibatkan penurunan respon imun yang pada akhirnya akan mengganggu proliferasi dan diferensiasi sel T maupun sel B. Hal tersebut dapat dijadikan penjelasan terjadinya penurunan jumlah sel limfosit pada kelompok perlakuan P2 (35,58) dan P3 (40,08).

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Jumlah sel limfosit pada ayam yang diberi stressor bising dan divaksinasi ND mengalami penurunan. Stressor yang berlanjut tidak dapat diadaptasi karena stres telah memasuki tahap *exhaustion phase* dari teori GAS. Proliferasi dan diferensiasi sel limfosit (sel T dan sel B) menjadi terganggu, yang disebabkan oleh tingginya kadar kortisol dalam darah.

6.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian tindak lanjut mengenai stres dan pengaruhnya terhadap kondisi fisiologi tubuh yang lain.
2. Pada peternakan ayam disarankan untuk menghindari kondisi yang dapat menyebabkan timbulnya stres pada ayam.

RINGKASAN

RINGKASAN

Vaksinasi merupakan salah satu upaya penting dalam pencegahan penyakit pada peternakan ayam. Dalam pelaksanaannya, vaksinasi sering kali menemui kegagalan atau didapatkan hasil yang kurang memuaskan disebabkan oleh beberapa faktor. Salah satu sebab tidak optimalnya program vaksinasi adalah timbulnya stres pada ayam. Stres pada ayam dapat disebabkan oleh suhu, kepadatan kandang, suara bising, *handling*, dan lain-lain.

Kortisol sering juga disebut *stress hormone* karena hormon ini diproduksi pada kondisi stres. Sekresi kortisol merupakan respon normal tubuh dalam menghadapi kondisi stres. Pada stres yang berlangsung singkat, kortisol akan meningkatkan respon imun tubuh. Pada kondisi stres kronis, kortisol akan diproduksi tubuh dalam jumlah banyak. Hal tersebut akan membawa dampak negatif bagi tubuh karena kortisol akan bersifat immunosuppressive. Produksi kortisol yang berlebihan dapat menimbulkan kematian pada sel imunokompeten seperti sel T, sel B dan makrofag. Hal tersebut dapat berakibat ayam lebih rentan terserang penyakit karena sel imunokompeten berperan dalam pembentukan antibodi dan pertahanan tubuh terhadap serangan antigen. Kondisi tersebut juga berdampak pada kegagalan vaksinasi.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah bursa fabrisius ayam. Bursa fabxisius diproses menjadi sediaan histopatologis dengan metode pewarnaan BE, selanjutnya dilakukan penghitungan jumlah sel limfosit melalui

pengamatan mikroskopis. Bursa Fabrisius merupakan tempat dihasilkannya Sel limfosit B yang membentuk sel plasina dan memproduksi antibodi, sehingga organ ini berperan penting dalam sistem pertahanan tubuh (Riddell, 2004).

Penelitian ini bertujuan untuk mengungkap adanya pengaruh dan pemberian stressor bising terhadap jumlah sel limfosit bursa fabrisius ayam yang dijadikan sebagai indikator dari keberhasilan vaksinasi. Menurut Coles (1990), stress dapat menurunkan jumlah sel limfosit. Hal ini erat kaitannya dengan mekanisme regulasi dan hormon adrenokortikoid yang memiliki pengaruh terhadap sel limfosit.

Pada penelitian sebelumnya, perlakuan diberikan kepada 100 ekor anak ayam yang dibagi menjadi 4 kelompok, masing-masing terdiri dari 25 ekor, yaitu : PO (tanpa stressor, tanpa vaksinasi), PI (tanpa stressor, dengan vaksinasi), P2 (dengan stressor, tanpa vaksinasi), P3 (dengan stressor, dengan vaksinasi). Dalam penelitian ini, sampel dari masing-masing kelompok perlakuan diambil sebanyak lima organ bursa fabrisius yang selanjutnya dibuat menjadi sediaan histopatologis dengan metode pewarnaan HE melalui pemeriksaan mikroskopis dengan perbesaran 400x.

Data hasil penelitian yang telah dianalisa menggunakan Anova menunjukkan perbedaan yang sangat nyata diantara perlakuan. Analisa lebih lanjut menggunakan uji BNT menunjukkan bahwa terjadi peningkatan jumlah sel limfosit pada perlakuan PI (75,29) yang berbeda nyata dengan perlakuan yang lain. Pada perlakuan P2 (35,58) dan P3 (40,08) terdapat penurunan jumlah sel limfosit dibandingkan dengan PO (44,89). Hal ini disebabkan oleh terjadinya penurunan

respon imun akibat stres yang berkelanjutan. Stressor yang diberikan terus menerus tidak dapat diadaptasi dengan baik oleh ayam, sehingga respon imun yang terus-mulus mulai masuk tahapan *exhaustion phase* dari teori GAS yang merupakan tahapan stres yang merugikan sistem imun (Mc Cance dan Shelby, 1994).

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai stres dan pengaruhnya terhadap kondisi fisiologi tubuh yang lain dan untuk mencegah kegagalan vaksinasi, disarankan agar peternak ayam menghindari kondisi yang dapat menyebabkan timbulnya stres pada ayam.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas A.K, Lichtman A.H, and Pober J.S. 1994. *Celluler and Molecular Immunology*, 2 d ed. Philadelphia, WB Saunders Ca.
- Ader R. In Kaplan HI and Sadock BJ. 1995. *Comprehensive Texbook of Psychiatry*/VI. Vol. 2. 6 th Ed. William & Wilkins. Baltimore-Philadelphia-Hongkong-London-Munich-Sydney-Tokyo.
- Allan W.H. and R.E Gough. 1976. A Comparison Between The Hemagglutinin Inhibition and Complement Fixation Text For ND. *Res. Vet.Sci.* 20: 101-103.
- Alexander, 1991. *Newcastle Disease and Other Paramyxovirus Infectious Disease of Poultry*. Iowa States University Press. Ames Iowa, USA. Pp. 496-573.
- Anonimus. 2003. *Exotic Newcastle Disease*. www.cidrap.umn.edu.
- Bambang G. dan Surnadiono. 2007. Stres dan Sistem Imun Tubuh; Suatu Pendekatan Psikoneuroimunologi. Sub Bagian Alergi Imunologi, Bagian Ilmu Kesehatan Anak, Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. Dalam www.woLdpress.com
- Baratawidjaja K.G, 1996. *Immunology Dasar*. Edisi Ketiga Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta.
- Bryan J, 1999. Ayam. Pun Suka Musik. Dalam. *Harian Republika*. 8 mei 1999.
- Covelli V, 1994. What Is Stress ? How It Does Corelate with The Immune System *Ann, NY. Acad Sci.* 741, 212-215.
- Darbyshire J.H, 987. Immunity and Resistance In Respiratory Tract Disease. In : *Avian Immunology Basis and Practice*. Editor by ;Toivanen, A. and Toivanen, P.CRC. Press. Inc. Boca Raton Florida. Pp. 130-136.
- Darmawan, 1995. Pengaruh Jenis Vaksin, Cara Aplikasi Dan Jenis Ayam, Terhadap Tanggap KebalVaksinasiNewcastle Disease.. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Darmawan, Natadjumena S, Warna H, 1982. Masa Kekebalan Vaksin ND Strain F. Pusat Veterinaria Farina Surabaya.
- Darminto dan Ronohardjo P, 1995. Potensi Virus Newcastle Disease Galur Vaksin Dalam Tempat Penyhnpanan Darurat. Balai Penelitian Veteriner

- Bogor.
- Dhabhar F.S, 1998. Stress Induced Enhancement Of Cell Mediated Immunity. In: Neuroimmunomodulation. Ann. New York Acad. Sci. Vol. 840: 359-380. New York.
- Eerola E, Veroma T and Toivanen A, 1987. Special Feature In The Structural Organization Of The Avian Lymphoid System. In: Avian Immunology Basis and Practice. Editor by; Toivanen A. and Toivanen, P. CRC Press. Inc. Boca Raton Florida.
- Emawati R, 1997. Efektifitas Vaksin Newcastle Disease InAtif Buatan Lokal Dalam Emuksi Ganda UntukPencegahan Penyakit Pada Ayam. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Fahmi M. 2007. Stress dan Sistem Imun. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dalam; www.blogspot.com
- Fawzy I.F, 1995. Behaviour And Immunity. In: Comprehensive Text Book Of PSYCHIATRY / VI. By: Kaplan HI, and Sadock B.J. Williams and Wilkins. Baltimore. Philadelphia. Hong Kong. Munich. London. Sydney. Tokyo.
- Fenner F.J, Gibb E.J.P, Murphy F.A, Rott R, Studdert Mj, White D.o, 1993. Veterinary Virology. Academic Press, Inc. Penterjemah Putra H dan Suryana IKIP Semarang Press.
- Hosen S, 1996. Menanggulangi Stress Pada Ayam. Poultry Indonesia. 193: 8-9. Jakarta
- Harper H.A, Rodwell V.W, Mayes P.A, 1979. Biokimia (Review of Physiologycal Chemistry). Ditedemahkan oleh: Martin Muliawan. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Hitcner S.B, Chairman, Dobermouth C.H, Purchase H.G, William J.E, 1980. Isolation Identification of Avian Pathogens. Creative Printing Company. Inc.2011 East main street, Endwell, New York 13760.
- Kresno S.B, 1996. Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium. FakultasKedokteran Universitas Indonesia Jakarta
- Kort W.J, 1994. The Effect Of Chronic Stress on The Immune Response. Adv. Neuroimmunology. 4 (1): 1 -11.
- Kusriningrum. 1989. Dasar Rancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.

- Mc Cance K.L and Shelby J, 1994. Stress and Disease. In: Pathophysiology. The Biologic Basis in Adult and Children (Kathryn L, Mc Cance and Sue E Huether, 2 eds). Mosby. St Louis, Baltimore, Chicago, London, Madrid, Philadelphia, Sydney, Toronto.
- Norris D.O, 1980. *Vertebrae Endocrinology*. Lea and Febriger Philadelphia.
- Notosoedirdjo M, 1980. Psikobiologi Sebagai Dasar Psikoneuroimunologi. Disampaikan pada kajian ilmiah Psikoneuroimunologi, 12 november 1998 di Ruang Sidang Utama Gramik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.
- OIE (Office International des Epizooties). 2002. Newcastle Disease.. www.oie.int
- Powell P.C. 1987. Macrophag and Other Nonlymphoid. Cells Contributing To Immunity In; *Avian Immunology Basis and Practice* by; Toivanen and Toivanen P. CRC. Press. Inc. Boca Raton. Florida.
- Prawirohusodo S. 1988. Stres dan Kecemasan Dalam: Kumpulan Makalah Simposium. Stres dan Kecemasan. Bagian Kedokteran Jiwa Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Putra ST. 1991. Dampak Perubahan Lingkungan Makro Terhadap Perubahan Ekosistem Kelenjar Getah Bening: 1-6.
- Putra ST. 1989. Konsep Psikoneuroimunologi dan Kontribusinya Pada Pengembangan IPTEK Kedokteran. Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.
- Putra ST. 1999. Development Of Psychoneuroimmunological Concept. Kelompok Studi Psikoneuroimunologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.
- Rangga Tabu C. 1996. Perkiraan Penyakit Unggas tahun 1996. Mewaspada Gumboro dan Tetelo. *Poultry Indonesia*. 193: 35-47. Jakarta
- Soetirto E. 2000. Tetelo Yang Selalu Bikin Masalah. Dalam Peristiwa Infovet Edisi 082 Januari. Jakarta.
- Weiss J.M. 1999. Effect of Exercise on The Immune System : Relationship to Stress. In : *Biological Effect of Physical Activity*. By : William R.S., Wallace A.G. Duke University Medical Center Editor.
- Widodo. 2007. Psycho Neuro Immunology. Smart Ed, 9 agustus 2007. www.smartFM.co.id

LAMPIRAN

Lampiran 1

Prosedur Pembuatan Sediaan Histologis

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

a. Fiksasi dan Pencucian

Tujuannya adalah untuk menghentikan proses metabolisme jaringan, mematikan kuman dan bakteri, menjadikan jaringan lebih keras sehingga mudah dipotong, serta mencegah terjadinya degenerasi.

Cara kerja :

- Setelah diseksi, organ Bursa Fabricius diambil dan dimasukkan dalam formalin sekurang kurangnya 24 jam.
- Organ bursa Fabricius 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 1, 11 masing-masing 30 menit.

c. Infiltrasi

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

Cara kerja :

- Organ bursa Fabricius dimasukkan dalam parafin I yang masih cair.
- Dimasukkan kedalam oven pada suhu 60⁰ selama 30 menit.
- Dipindahkan ke paraffin II yang masih cair.
- Dipindahkan kedalam oven pada suhu 60⁰ selama 30 menit.

d. Pembuatan blok paraffin

Bertujuan supaya jaringan mudah dipotong.

Cara kerja :

- Disiapkan beberapa, cetakan besi yang diolesi dengan gliserin supaya nantinya paraffin tidak melekat pada besi.
- Besi cetakan diisi paraffin cair.
- Organ bursa Fabricius dimasukkan kedalam cetakan, tunggu sampai paraffin membeku atau mengeras.

e. Pengirisan dengan mikrotom

Bertujuan untuk memotong jaringan setipis mungkin agar mudah dilihat dibawah mikroskop.

Cara kerja:

- Blok paraffin yang telah mengeras diiris dengan mikrotom dengan ketebalan 4-7 mikron.
- Dicelupkan kedalam air hangat dengan suhu 42-45⁰ C sampai jaringan mengembang dengan baik.
- Olesi gelas obyek dengan egg albumin, kemudian jaringan diletakkan pada gelas obyek dan dikeringkan diatas hot plate.

f. Pewarnaan

Bertujuan untuk memudahkan melihat perubahan pada, jaringan. Sediaan organ bursa Fabricius diwarnai dengan metode Harris dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin*, sehingga dapat dilihat dengan jelas, bentuk masing-masing selnya.

Cara kerja :

- Jaringan yang telah dikeringkan dimasukkan kedalam, xylol I selama 3 menit, xylol II selama, satu menit, dan berturut turut alkohol absolut I,II, alkohol 96 %, 90 %, 80 %, 70 % dan air selama satu menit.
- Jaringan dimasukkan ke dalam zat warna, Harris selama, 5-10 menit.
Jaringan dimasukkan ke dalam air kran selama lima. menit.
- Jaringan dicelupkan ke dalam. alkohol asam sebanyak 3-10 kali celupan.
- Jaringan dicelupkan kedalam air kran sebanyak empat kali celupan.
- Jaringan dicelupkan kedalam amoniak sebanyak enam, kali celupan.
- Jaringan dimasukkan kedalam air kran selama 10 menit.
- Jaringan dimasukkan kedalam akuades selama 5 menit.
- Jaringan dimasukkan berturut-turut kedalam alkohol 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, alkohol absolut I, II, masing masing 0,5 menit.
- Jaringan dimasukkan kedalam. xylol I dan H, masing-masing dua, menit.
- Jaringan dibersihkan dari sisa. pewarnaan.

g. Mounting

Suatu penutupan gelas obyek dengan gelas penutup yang sebelumnya. telah ditetesi dengan kanada, balsam.

h. Pemeriksaan Mikrokopis

Pemeriksaan dilakukan dari pembesaran lemah menuju ke pembesaran kuat yaitu, 40X, 100X, 400X.

Lampiran 2

Hasil Penghitungan Sel Limfosit

Perlakuan		Folikel			Total	Rata-rata
		I	II	III		
P0	1	1965	1956	1869	5790	1930
	2	1844	2308	2136	6288	2096
	3	2004	1917	1953	5874	1958
	4	1896	2115	2034	6045	2015
	5	2213	1947	2191	6351	2117
P1	1	3583	4068	3773	11424	3808
	2	3927	4175	3751	11853	3851
	3	4261	4177	3880	12318	4106
	4	3955	4122	3547	11604	3868
	5	3896	4035	3907	11832	3944
P2	1	1436	1246	1272	3954	1318
	2	1362	1237	1139	3738	1246
	3	1173	1361	1325	3864	1288
	4	1112	1249	1056	3417	1139
	5	1365	1193	1480	4038	1346
P3	1	2164	1383	1631	5178	1726
	2	1285	1453	1636	4770	1590
	3	1357	1578	1829	4758	1586
	4	1907	1530	1363	4800	1600
	5	1501	1463	1641	4605	1535

Lampiran 3**Rata-rata jumlah Sel Limfosit**

Perlakuan	Ulangan					Total	Rata-rata
	1	2	3	4	5		
P0	1930	2096	1958	2015	2117	101,16	20,232
P1	3808	3951	4106	3868	3944	196,77	39,354
P2	1318	1246	1288	1139	1346	63,37	12,674
P3	1726	1590	1586	1600	1535	8037	16,074
						441,67	

Rata-rata Jumlah Sel Limfosit setelah di Transformasikan ($\sqrt{}$)

Perlakuan	Ulangan					Total	Rata-rata
	1	2	3	4	5		
P0	43,93	45,78	44,25	44,49	46,01	224,46	44,89
P1	61,71	62,86	64,08	62,19	62,80	313,64	75,29
P2	36,30	35,30	35,89	33,75	36,69	177,93	35,58
P3	41,54	39,87	39,82	40	39,18	200,41	40,08
						916,44	

Lampiran 4**Analisa Statistik Menggunakan ANOVA (*Analysis Of Variance*)**

Perlakuan	Ulangan					Total	Rata-rata
	1	2	3	4	5		
P0	43,93	45,78	44,25	44,49	46,01	224,46	44,89
P1	61,71	62,86	64,08	62,19	62,80	313,64	75,29
P2	36,30	35,30	35,89	33,75	36,69	177,93	35,58
P3	41,54	39,87	39,82	40	39,18	200,41	40,08
						916,44	

Tahap selanjutnya, menghitung jumlah kuadrat

$$FK = \frac{(916,44)^2}{20} = 41933,1137$$

$$JKT = (43,93)^2 + \dots (39,18)^2 - 41933,1137$$

$$= 2197,0525$$

$$JKP = \frac{(224,46)^2 + (313,64)^2 + (177,93)^2 + (200,41)^2}{5} - 41933,1137$$

$$= 1900,5171$$

$$JKS = JKT - JKP$$

$$= 21,97,0525 - 1900,5171$$

$$= 296,5354$$

$$KTP = \frac{1900,5171}{4-1}$$

$$= 633,5057$$

$$KTS = \frac{296,5354}{4(5-1)}$$

$$= 18,5335$$

$$F_{hitung} = \frac{633,5057}{18,5335}$$

$$= 34,1816$$

SK	db	JK	KT	F hitung	F tabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	3	1900,5171	633,5057	34,1816	3,24	5,29
Sisa	16	296,5354	18,5335			
Total	19	2197,0525				

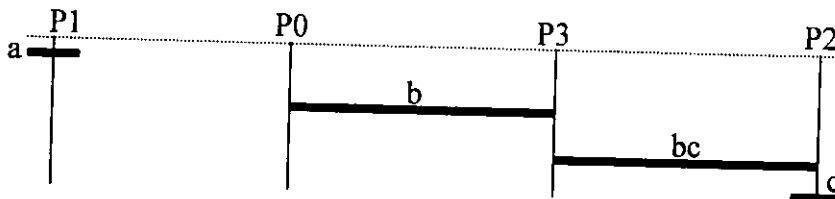
Kesimpulan : $F_{hitung} > F_{tabel}$, maka dapat disimpulkan bahwa diantara perlakuan terdapat perbedaan yang sangat nyata.

Lampiran 5**Analisa Statistik menggunakan Uji BNT 5%**

$$\begin{aligned}
 \text{BNT 5\%} &= t_{\alpha \text{ 5\% (db sisa)}} \times \sqrt{\frac{2 KTS}{n}} \\
 &= 2,120 \times 2,72 \\
 &= 5,77
 \end{aligned}$$

Perlakuan	Rata-rata	Beda			BNT 5%
		(X- P2)	(X-P3)	(X-P0)	
P1 (S-V+)	75,29 ^a	39,71*	35,21*	30,40*	5,77
P0 (S-V-)	44,89 ^b	9,31*	4,81		
P3 (S+V+)	40,08 ^{bc}	4,5			
P2 (S+V-)	35,58 ^c				

Notasi Sistem Jarak :



Kesimpulan :

- Hasil tertinggi diperoleh pada perlakuan P1 yang berbeda nyata dengan perlakuan yang lain.
- Hasil terendah diperoleh pada perlakuan P2 yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan P3
- Antara perlakuan P0 dan P3 juga tidak berbeda nyata.