

SKRIPSI

PENGARUH PEMBERIAN CRUDE CHLORELLA DAN PROBIOTIK TERHADAP JUMLAH SEL LIMFOSIT PADA LIMPA AYAM BROILER YANG DIVAKSINASI AI (*Avian Influenza*)

KH 09/08

Wid
P



Oleh

AGUS WIDODO

NIM 060313229

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2007**

**PENGARUH PEMBERIAN CRUDE CHLORELLA
DAN PROBIOTIK TERHADAP JUMLAH SEL
LIMFOSIT PADA LIMPA AYAM BROILER
YANG DIVAKSINASI AI (*Avian Influenza*)**

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



Oleh

AGUS WIDODO
NIM 060313229

Menyetujui
Komisi Pembimbing

(Dr. Bambang Sektiari L, DEA., drh.)
Pembimbing Pertama


(Rahmi Sugihartuti, M.Kes., drh.)
Pembimbing Kedua

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul:

Pengaruh Pemberian *Crude Chlorella* dan Probiotik Terhadap Jumlah Sel Limfosit Pada Limpa Ayam Broiler Yang divaksinasi AI (*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 di tulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.



Surabaya , 2 Agustus 2007

AGUS WIDODO
NIM 060313229

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 2 Agustus 2007

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

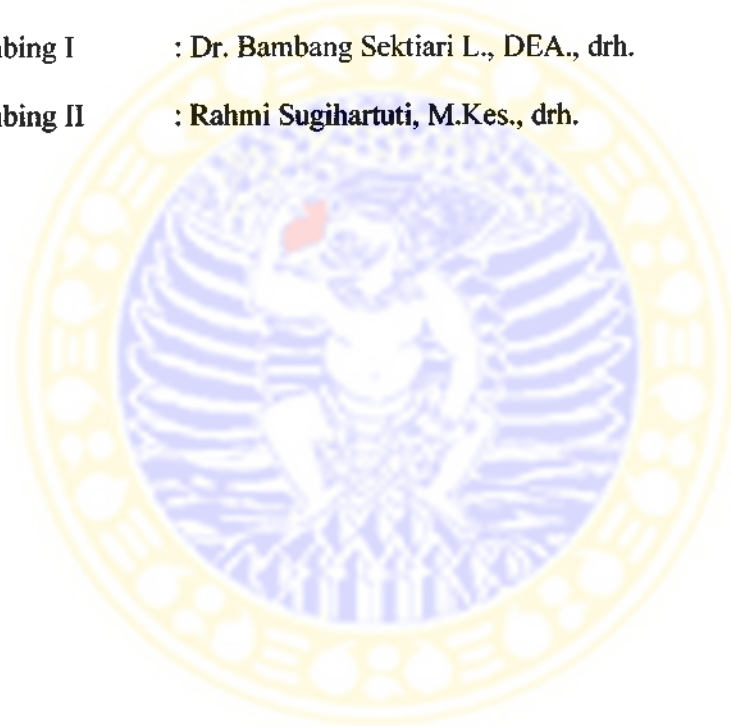
Ketua : Dr. Rahaju Ernawati, M.Sc., drh.

Sekretaris : Djoko Legowo, M.Kes., drh.

Anggota : Adriana Monica Sahidu, M.Kes., Ir.

Pembimbing I : Dr. Bambang Sektiari L., DEA., drh.

Pembimbing II : Rahmi Sugihartuti, M.Kes., drh.



Telah diuji pada

Tanggal : 13 Agustus 2007

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Dr. Rahaju Ernawati, M.Sc., drh.

Anggota : Adriana Monica Sahidu, M.Kes., Ir.
: Dr. Bambang Sektiari L., DEA., drh.
: Rahmi Sugihartuti, M.Kes., drh.

Surabaya, 15 Agustus 2007

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Hj. Romziah sidik, Ph.D., drh.

NIP. 130 687 305

**THE EFFECT OF CRUDE CHLORELLA AND PROBIOTIC ON THE
LIMFOSIT TOTAL AT SPLEEN OF AI (*Avian Influenza*)
VACCINATED BROILER CHICKEN**

Agus Widodo

ABSTRACT

The aim of this experiment was to know the effects of *crude chlorella* and probiotic on the limfosit total at spleen of AI vaccinated broiler chicken. It's used 45 DOC (Day Old Chicken) broilers strain CP 707 average weight 37 gram. It's Completolity Randomisid design with Factorial methode (3x3) by 5 replicant. First factor (Factor A) was *crude chlorell*, it has tree level 0 % , 5 % and 10 % which mixed on feed. The second one (Factor B) was probiotik, it has tree level 0 %, 0,2 % and 0,4 % on drinking water. The broiler chicken had been treated for 33 days. Then at the age of 27 day had been AI vaccinated. Section to splenotory done 14 day vaccinated. Observe on limfosit at spleen of broiler chicken use microscope and analized use Analysis of Variance (ANOVA) continued by Duncan test. The result showed that the treatment *crude chlorella* with 10 % on feed was significant different than 5 % or 0%. Probiotik treatment 0,4 % on drinking water soo that was significant different to the another probiotic treatment (0,2 % or 0 %). Whereas interaction treatments between the *crude chlorella* and probiotic was significantly differents on the limfosit total at spleen of AI vaccinated broiler chicken.

Key word : *Crude chlorella*, probiotic, limfosit, broiler chicken, vaccination.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas karunia dan rahmat yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul **Pengaruh Pemberian *Crude Chlorella* dan Probiotik Terhadap Jumlah Sel Limfosit Pada Limpa Ayam Broiler Yang Divaksinasi AI (*Avian Influenza*)**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Rhomziah Sidiq, PhD., drh. atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Dr. Bambang Sektiari L, DEA., drh. selaku pembimbing pertama dan Rahmi Sugihartuti, M.Kes., drh. selaku pembimbing kedua atas saran dan bimbingannya sampai dengan selesainya skripsi ini.

Ibu Tutik djuniastutik, M.Kes., drh. selaku dosen wali yang banyak memberikan saran dan bantuan bagi penulis selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Ibu Yeni Damayanti, M.Kes., drh. Selaku dosen pembimbing proyek penelitian yang telah banyak memberi saran dan ide-ide dalam pelaksanaan penelitian serta seluruh staf pengajar Fakultas kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada seluruh pegawai laboratorium patologi veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas bantuannya selama proses penelitian ini.

Ayah, ibu dan kakak-kakakku tercinta yang telah memberikan segalanya, bantuan doa, dorongan dan semangat serta teman-temanku seangkatan 2003 yang selalu bermurah hati untuk memberikan saran, kritik dan motivasi pada penulis agar cepat menyelesaikan tulisan ini.

Akhir dari ucapan terima kasih, penulis sampaikan kepada seluruh teman teman JMV (Jamaah Muslim Veteriner) FKH dan DLM-KM (Dewan Legislatif Mahasiswa-Keluarga Mahasiswa) Unair yang senantiasa memberikan dukungan dan semangat.

Surabaya, 2 Agustus 2007

Penulis

	Halaman
HALAMAN PERNYATAAN	ii
HALAMAN IDENTITAS	iii
ABSTRACT	v
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Landasan Teori	5
1.4. Tujuan Penelitian	6
1.5. Manfaat Penelitian	7
1.6. Hipotesis	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1. <i>Chlorella</i> (Ganggang Hijau)	9
2.1.1. Tinjauan Umum.....	9
2.1.2. Klasifikasi <i>Chlorella</i>	11
2.1.3. Kandungan <i>Chlorella</i>	11
2.1.3.1. Komposisi Umum Kandungan Zat Gizi <i>Chlorella</i>	11
2.1.3.2. Kandungan Protein <i>Chlorella</i>	12
2.1.3.3. Kandungan Vitamin dan Mineral <i>Chlorella</i>	13
2.1.3.4. Kandungan Dinding Sel <i>Chlorella</i>	15
2.1.3.4. Kandungan Klorofil <i>Chlorella</i>	15
2.1.4. Pengaruh <i>Chlorella</i> terhadap Kekebalan Tubuh	16
2.2. Probiotik	18
2.3. Gambaran Umum Sistem Kekebalan Tubuh	21
2.4. Organ Limfoid Ayam	22
2.5. Limpa	23
2.6. Fungsi Limpa	25
2.7. Limfosit	25
BAB 3 MATERI DAN METODE PENELITIAN	29
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	29
3.2. Materi Penelitian	29
3.3.1. Hewan Coban	29
3.3.2. Alat Penelitian	29
3.3.2. Bahan Penelitian	30

3.3. Metode Penelitian	30
3.3.1. Persiapan penelitian	30
3.3.2. Perlakuan pada Uewan Coba	31
3.3.3. Pembuatan Preparat Histologi	33
3.4. Jenis Rancangan Percobaan	33
3.5. Peubah yang diamati	34
3.6. Analisis Statistik	34
BAB 4 HASIL PENELITIAN	36
BAB 5 PEMBAHASAN	39
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	45
6.1. Kesimpulan	45
6.2. Saran	45
RINGKASAN	46
DAFTAR PUSTAKA	59
LAMPIRAN	52



Tabel	Halaman
2.1. Analisis umum kandungan <i>chlorella</i>	12
2.2. Kandungan asam amino <i>chlorella</i>	13
2.3. Kandungan vitamin <i>chlorella</i>	14
2.4. Kandungan mineral <i>chlorella</i>	14
2.5. Kandungan dinding sel <i>chlorella</i>	15
2.6. Jenis mikroba dalam probiotik	20
3.1. Rancangan percobaan berpola faktorial (3x3)	33
4.1. Rata-rata dan simpangan baku (SD) jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi AI (<i>Avian influenza</i>) setelah pemberian <i>crude chlorella</i> dan probiotik	36



Gambar	Halaman
3.1. Bagan Penelitian	35
4.1. Sel limfosit pada pulpa putih limpa ayam broiler (Pembesaran 400x; pewarnaan H.E)	38
4.2. Sel limfosit pada pulpa merah limpa ayam broiler (Pembesaran 400x; pewarnaan H.E)	38



Lampiran	Halaman
1. Gambar alat dan bahan penelitian	52
2. Kandungan pakan standart BR 1 dan BR 2	53
3. Prosedur pembuatan preparat histologi	54
4. Analisis data statistik jumlah sel limfosit	58



SINGKATAN DAN ARTILAMBANG

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

AI	= <i>Avian Influenza</i>
APC	= <i>Antigen Presenting Cell</i>
ANOVA	= <i>Analysis Of Variance</i>
CD	= <i>Cluster Differentiation</i>
CGF	= <i>Chlorella Growth Faktor</i>
DOC	= <i>Day Old Chicken</i>
Ig	= <i>Imunoglobulin</i>
IL	= <i>Interleukin</i>
MHC	= <i>Major Histocompatibility Complex</i>
PHSC	= <i>Pluripotent Hemopoetic Stem Cell</i>
PMSC	= <i>Pluripotent Myeloid Stem Cell</i>
RAL	= <i>Rancangan Acak Lengkap</i>
SD	= <i>Standard Deviasi</i>
T _{dth}	= <i>Tdelayed-type hypersensitivity</i>
TNF	= <i>Tumor Necrotic Faktor</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit *Avian Influenza* pada tahun 1983-1984 telah menjadi penyakit mematikan yang menyerang peternakan ayam di seluruh dunia. Lebih dari 17 juta ekor ayam dimusnahkan. Pada tahun 1997, di Hongkong dilaporkan virus *Avian Influenza* telah menyerang dengan ganas, bahkan menular ke manusia dan menimbulkan kematian. Hal ini terus berlanjut sampai pada penghujung tahun 2003 dan permulaan tahun 2004, virus *Avian Influenza* masih menjadi wabah di beberapa Negara diantaranya Cina, Vietnam, Thailand dan Jepang, termasuk Indonesia (Fadilah dan Polana, 2004).

Strategi penanggulangan penyakit *Avian Influenza* dapat dilakukan melalui berbagai cara antara lain dengan cara melaksanakan vaksinasi, mengisolasi *farm* atau peternakan yang terkena, memusnahkan semua ayam yang terinfeksi, melarang keluar masuk peralatan, orang dan kendaraan ke daerah peternakan yang terinfeksi AI, melakukan sanitasi secara ketat, serta mengistirahatkan *farm* yang terinfeksi (Fadilah dan Polana, 2004).

Indonesia pada awal tahun 2004 mulai melakukan vaksinasi sebagai strategi menaggulangi penyakit *Avian Influenza*, walaupun pada awalnya tindakan vaksinasi ini masih menjadi perdebatan di beberapa Negara (Poltry Indonesia, 2006).

Vaksinasi diyakini masih menjadi salah satu tindakan yang dapat mengontrol penyakit AI. Hal ini diperkuat oleh pernyataan Lazano (2004) bahwa

hasil penelitian dilapangan telah menunjukkan ayam yang tidak divaksin lebih rentan terkena penyakit AI dari pada ayam yang divaksin. Walaupun demikian dampak yang tidak diharapkan dari vaksinasi kadang terjadi antara lain timbulnya stress pada anak ayam. Stress yang berkepanjangan akan berdampak pada penurunan berat badan, penurunan efisiensi pakan dan kurang sempurnanya respon kekebalan (Fadilah dan Polana, 2004).

Dampak negatif yang sering timbul dalam vaksinasi menjadikan tindakan vaksinasi kurang optimal. Untuk itu perlu adanya upaya mencari *feed supplement* yang dapat mengoptimal vaksin dalam meningkatkan respon kekebalan tubuh ayam melalui peningkatan jumlah sel limfosit. Dengan adanya peningkatan jumlah sel limfosit diasumsikan antibodi yang terbentuk juga akan semakin meningkat.

Upaya tersebut dapat dilakukan melalui pemberian *crude chlorella* dan probiotik. Diharapkan pemberian *crude chlorella* dan probiotik secara sinergis dapat mendukung kerja vaksin dalam meningkatkan respon kekebalan individu melalui peningkatan sel limfosit.

Chlorella merupakan *feed supplement* yang secara sinergis dapat meningkatkan imunitas ayam. Sebagai *feed supplement chlorella* mempunyai komposisi 60% protein (terdiri dari 19 asam amino), 20% karbohidrat, 11% lemak, multivitamin dan mineral (Steenblock, 2000). Selain itu, *chlorella* juga mempunyai komponen yang berpengaruh terhadap sistem kekebalan tubuh antara lain dinding sel, beta karoten dan *Chlorella Growth Factor* atau CGF (Sukiman, 2002).

Dinding sel *chlorella* tebal dan sulit untuk dipecah. Kondisi ini berdampak pada rendahnya daya cerna terhadap *chlorella* sehingga nutrisi yang terkandung didalamnya menjadi sulit untuk dicerna. Oleh sebab itu pemberian probiotik sebagai salah satu bahan pakan tambahan yang mengandung mikroba diharapkan mampu memecah dinding sel *chlorella*. Mikroba selulolitik dalam probiotik diharapkan mampu memecah komponen serat dinding sel *chlorella* (Darmosuwito, 2001).

Pemberian probiotik juga diharapkan dapat mengurangi jumlah bakteri patogen dalam usus, serta meningkatkan respon kekebalan. Abidin (2003) menegaskan bakteri asam laktat yang biasa ada dalam probiotik seperti *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, dan *L. bulgaricus* mampu memicu pertumbuhan dan menstimulasi pembentukan sel-sel limfosit. Bakteri asam laktat tersebut mengadakan persaingan dengan bakteri-bakteri patogen dalam memperoleh makanan. Disisi lain suasana asam yang ditimbulkan oleh bakteri asam laktat dalam probiotik juga diyakini mampu membunuh bakteri-bakteri patogen.

Secara tidak langsung optimalisasi kerja vaksin *Avian Influenza* (AI) dalam meningkatkan respon imun tubuh ayam dapat di lihat melalui penghitungan jumlah sel limfosit pada pulpa putih dan pulpa merah limpa. Sel limfosit merupakan sel yang berperan dalam sistem kekebalan tubuh, terutama sistem kekebalan spesifik. Dipilihnya organ limpa untuk menghitung sel limfosit karena sebagian besar sel limfosit berada dalam organ limpa untuk mengalami proliferasi dan diferensiasi menghasilkan antibodi yang nantinya akan diedarkan bersama

darah keseluruh tubuh. Lawcett (2002) menyatakan bahwa sel limfosit dalam darah mengalami peredaran yang cepat meninggalkan aliran darah dan mendiami organ limfoid perifer, namun tak lama kemudian sel limfosit akan masuk kembali ke peredaran darah secara langsung atau melalui pembuluh limfe.

Berdasarkan uraian diatas maka dirasa perlu melakukan penelitian pengaruh pemberian *crude chlorella* dan probiotik terhadap jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi *Avian Influenza* (AI).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Apakah pemberian *crude chlorella* dapat meningkatkan jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi AI (*Avian Influenza*)?
2. Apakah pemberian probiotik dapat meningkatkan jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi AI (*Avian Influenza*)?
3. Apakah interaksi antara pemberian *crude chlorella* dan probiotik dapat meningkatkan jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi AI (*Avian Influenza*)?

1.3 Landasan Teori

Chlorella merupakan ganggang hijau (*green algae*) yang mempunyai beberapa komponen yang dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh. *Chlorella* direkomendasikan sebagai bahan tambahan pakan karena *chlorella* mengandung protein yang tinggi (sebanyak 60%). Pada umumnya protein ini berperan penting dalam pembentukan sistem kekebalan seluler maupun humoral yang ditunjukkan melalui peningkatan sel limfosit T, sel limfosit B dan antibodi (Keith dan jeejebhoy, 1997). *Chlorella* juga mempunyai komponen yang berpengaruh terhadap kekebalan tubuh antara lain dinding sel, beta karotin dan CGF (*Chlorella Growth Faktor*). Dinding sel dan beta karotin berfungsi merangsang makrofag untuk menskresikan sitokin yang dapat menstimulir proliferasi dan diferensiasi limfosit T. CGF (*Chlorella Growth Faktor*) memiliki sifat khusus dan hanya ada pada *chlorella*. CGF dapat merangsang pertumbuhan dan perbaikan jaringan pada hewan dan merangsang aktivitas limfosit T (*T_{Helper}*) yang pada akhirnya mempengaruhi sel limfosit B untuk berproliferasi dan berdiferensiasi (Sukiman, 2002).

Probiotik merupakan preparat yang terdiri dari mikroba hidup yang dimasukkan ke dalam tubuh manusia atau hewan secara oral (Schrezenmeir, 2004). Mikroba dalam probiotik dapat memproduksi enzim seperti enzim selulolitik, amilolitik, proteolitik, dan sakarolitik sehingga mampu meningkatkan daya cerna bahan pakan yang diberikan, termasuk *chlorella*. Disisi lain mikroba dalam probiotik berperan sebagai antigen lipopolisakarida yang diyakini dapat menginduksi reaksi pertahanan imunologik baik pada invertebrata maupun

vertebrata. Dengan adanya antigen lipopolisakarida ini sel limfosit B akan memusatkan antigen tersebut pada permukaan sel limfosit B secara spesifik, sehingga sel limfosit B dapat teraktivasi. Sel limfosit B yang teraktivasi akan berproliferasi dan kemudian berdiferensiasi menjadi sel memori atau menjadi sel plasma yang menghasilkan antibodi (Fedik, 2001).

Vaksinasi merupakan tindakan yang mempengaruhi sistem kekebalan spesifik yaitu dengan menginduksi sel limfosit T yang mengaktivasi sel limfosit B untuk berproliferasi dan berdiferensiasi sehingga menghasilkan antibodi spesifik dan sel memori yang berguna untuk proteksi jangka panjang. Selain rangsangan antigen dari vaksin, aktivasi dan proliferasi sel limfosit B dalam respon imun spesifik memerlukan keikutsertaan sel limfosit T *Helper* yang reseptornya diduga mengikat pada determinan berbeda pada imunogen sama. Sel limfosit T *Helper* akan mensekresi interleukin-2 (IL-2), yang dilepaskan untuk merangsang proliferasi sel limfosit-B aktif. Pada waktu yang sama, sel limfosit T *Helper* juga memaparkan reseptor IL-2 pada permukaannya dan berespons terhadap produksi interleukinnya sendiri dengan berproliferasi (Lawcett, 2002).

1.4 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah :

1. Membuktikan bahwa pemberian *crude chlorella* dapat meningkatkan jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi AI (*Avian Influenza*).

2. Membuktikan bahwa pemberian probiotik dapat meningkatkan jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi AI (*Avian Influenza*).
3. Membuktikan bahwa interaksi antara pemberian *crude chlorella* dan pemberian probiotik dapat meningkatkan jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi AI (*Avian Influenza*)

4

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah yang bermanfaat bagi peternak ayam dan industri perunggasan tentang *feed supplement* yang secara sinergis dapat mendukung kerja vaksin dalam meningkatkan respon imun. Penelitian ini juga diharapkan dapat bermanfaat bagi pengembangan penelitian dibidang ilmu peternakan khususnya dalam upaya penanggulangan penyakit pada unggas, terutama penyakit yang disebabkan oleh virus.

1.6 Hipotesis

Berdasarkan perumusan masalah di atas, hipotesis yang diajukan adalah sebagai berikut :

1. Pemberian *crude chlorella* dapat meningkatkan jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi AI (*Avian Influenza*).
2. Pemberian probiotik dapat meningkatkan jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi AI (*Avian Influenza*).

3. Terjadi interaksi antara pemberian *crude chlorella* dan pemberian probiotik dalam meningkatkan jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi AI (*Avian Influenza*).



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA**2.1. *Chlorella* (Ganggang Hijau)****2.1.1. Tinjauan Umum**

Nama *chlorella* diambil dari bahasa latin *chloros* yang berarti hijau dan *ella* yang berarti kecil. *Chlorella* merupakan suatu sel yang sangat kecil dan bewarna hijau. Warna hijau ini disebabkan *chlorella* kaya akan klorofil (sebanyak 3%). *Chlorella* berasal dari ganggang hijau yang merupakan kumpulan tumbuhan bersel satu, berkoloni, atau bersel banyak, tidak mempunyai akar, batang, atau daun sebenarnya (Steenblock, 2000).

Pertama kali ditemukan pada tahun 1980 oleh seorang mikrobiologi Belanda bernama Beyerinck. Selanjutnya banyak negara di dunia mulai mengembangkan penelitian *chlorella* dengan berbagai tujuan antara lain; untuk makanan, untuk kesehatan, untuk makanan keschatan, pertukaran gas O₂ dan gas CO₂, bahan bakar, pembersih pencemar, dan lain-lain (Sukiman, 2002).

Keberlangsungan hidup *chlorella* sampai ke zaman modern merupakan tanda kestabilan genetik serta bentuk, ukuran dan sifat dinding sel yang kuat. Hal ini yang membuat *chlorella* mudah menyesuaikan diri terhadap pengaruh luar dalam waktu yang lama sehingga *chlorella* bisa ditemukan di perairan tropik, subtropik, dan kutub (Suriawiria, 2002).

Chlorella dapat dijumpai pada permukaan air laut, pada sedimen-sedimen di dasar di dasar laut, permukaan batu karang, di bawah permukaan tanah, pada permukaan kulit kayu atau kulit organisme yang lain, atau bahkan pada

permukaan salju. Jenis tanaman bersel tunggal ini dapat hidup pada habitat yang berkadar garam mulai dari 0 hingga 35 ppt. Namun, *chlorella* akan berkembang dengan baik pada kondisi salinitas optimum, yaitu pada perairan dengan kadar garam 10-20 ppt (Starr and Taggart, 1995).

Chlorella memiliki bentuk bervariasi, disamping bentuk bulat ada juga yang berbentuk lonjong dengan ukuran diameter sebesar 2-8 mikron, mempunyai inti dan bersel tunggal. Ukuran diameter inti sel *chlorella* 0,3-0,5 mikron. *Chlorella* berkembangbiak secara aseksual dengan cara membelah diri dan membentuk autospora. Proses pembentukan autospora diawali dengan pembelahan sel dewasa menjadi 2-4-8 (jarang sampai 16). Kemudian masing-masing sel berkembang menjadi autospora (Suriawiria, 2002). Dikatakan pula bahwa *chlorella* dapat dibiakkan dalam medium sederhana dengan waktu pembelahan yang relatif singkat, sekitar 4-14 jam.

Proses pembelahan yang terjadi melalui empat tahap, yaitu : Tahap pertama merupakan fase pembelahan (*growth phase*), yang ditandai dengan terjadinya peningkatan autospora sebagai hasil peningkatan produk fotosintesis. Tahap kedua merupakan fase pemasakan awal (*early ripening phase*), yang merupakan persiapan pembelahan sel. Tahap ketiga merupakan pemasakan akhir (*post ripening phase*), sel membelah menjadi dua. Tahap keempat merupakan fase pembelahan (*division phase*), autospora di bebaskan (Suriawiria, 2002).

Dinding sel *chlorella* sangat tebal (14 nanometer) dan tersusun dari tiga lapisan, yaitu lapisan luar banyak mengandung banyak selulosa, lapisan tengah

merupakan lapisan paling tebal dan lapisan dalam. Hal ini menjadikan *chlorella* sulit dicerna karena adanya dinding sel yang kuat tersebut (Steenblock, 2000).

2.1.2. Klasifikasi *Chlorella*

Chlorella dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Isnasetyo, 1995) :

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Phylum	: <i>Chlorophyta</i>
Kelas	: <i>Chlorophceae</i>
Ordo	: <i>Chlorococcales</i>
Famili	: <i>Clorellaceae</i>
Genus	: <i>Chlorella</i>
Species	: <i>Chlorella minutisimma</i>
	: <i>Chlorella vulgaris</i>
	: <i>Chlorella pyrenoidosa</i>
	: <i>Chlorella virginica</i>

2.1.3. Kandungan *Chlorella*

2.1.3.1. Komposisi Umum Kandungan Zat Gizi *Chlorella*

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

Tabel 2.1. Analisis umum kandungan *chlorella*

Kandungan	Kadar
Air	3,6%
Protein	60,5%
Lipid	11,0%
Karbohidrat	20,1%
Serat	0,20%
Abu	4,60%
Klorofil	1,7%
Kalori	421,0 Kkal/100g

Sumber : Steenbock, 2000

2.1.3.2. Kandungan Protein *Chlorella*

Sesuatu yang penting untuk diketahui pada *chlorella* adalah kandungan protein yang tinggi dengan keseimbangan asam amino yang baik. Steenblock (2000) menyatakan bahwa protein *chlorella* mengandung seluruh asam amino yang penting bagi manusia dan hewan dimana dalam hal ini komposisi asam amino, ternyata kualitas protein *chlorella* setara dengan protein hewani.

Protein *chlorella* tersusun atas 19 macam asam amino, baik asam amino essensial maupun non essensial yang diperlukan oleh tubuh. Kebutuhan akan asam amino essensial harus diusahakan dari luar tubuh yaitu dengan cara menyediakan dalam pakan hewan. Asam amino non essensial juga diperlukan dalam pakan hewan sebab sebagian kecil asam amino tersebut tidak dapat disintesis dalam waktu yang cepat untuk pertumbuhan maksimum.

Kandungan protein dalam *chlorella* jauh lebih banyak bila dibandingkan dengan biji-bijian dan kacang-kacangan. Jensen (1987) menyebutkan kandungan

protein dalam kedelai hanya 39%, sedangkan gandum, jagung, dan beras kandungannya jauh lebih rendah lagi, berturut-turut hanya 10%, 9%, dan 7%.

Susunan asam amino *Chlorella* dapat dilihat pada tabel 2.2.

Tabel 2.2. Susunan asam amino *chlorella*

Jenis	Kadar (%)	Jenis	Kadar (%)
Lisin*	3,46	Sistin	0,38
Histidin	1,29	Valin*	3,64
Arginin	3,64	Metionin*	1,45
Asam aspatik	5,20	Isoleusin*	2,63
Treonin*	2,10	Leusin*	5,28
Serin	2,18	Tirosin	2,09
Asam glutamat	6,29	Penilalanin*	3,08
Prolin	2,93	Ornitin	0,06
Glisin	3,40	Triptofan	0,59
Alanin	4,80		

Ket * : Asam amino essensial

Sumber : Steenblock, 2000

2.1.3.3. Kandungan Vitamin dan Mineral *Chlorella*

Chlorella mengandung vitamin dan mineral yang sangat dibutuhkan oleh manusia dan hewan. Vitamin A dari *chlorella* terutama terdapat dalam bentuk beta karotin. Sunoto (1991) menyebutkan bahwa kandungan beta karotin *chlorella* 18-20 kali lebih tinggi dari wortel. Beta karotin pada *chlorella* juga telah terbukti dapat menghancurkan sel kanker, meningkatkan kekebalan dengan memproduksi makrofag dan sebagai stimulator sel limfosit T (T_{Helper}). *Chlorella* kaya akan vitamin dan mineral yang dapat dilihat pada tabel 2.3. dan 2.4.

Tabel 2.3. Kandungan vitamin *chlorella*

Jenis Vitamin	Kadar (mg/100g)
Vitamin A aktif	51,30 IU
Tiamin (vit. B ₁)	1,70
Riboflavin (vit. B ₂)	4,30
Piridoksin (vit. B ₆)	1,40
Vitamin B ₁₂	0,13
Vitamin C	10,40
Vitamin E	1,50
Niasin	23,80
Asam Pantotenat	1,10
Asam Folat	26,9
Biotin	0,20
Inositol	132,00
Asam Folat	0,09

Sumber : Jensen, 1987

Tabel 2.4. Kandungan mineral *chlorella*

Jenis Mineral	Kadar (mg/100g)
Kalsium (Ca)	203,0
Fosfor (P)	989,0
Iodium (I)	600,0
Magnesium (Mg)	315,0
Besi (Fe)	167,0
Seng (Zn)	71,0
Tembaga (Cu)	0,08

Sumber : Steenblock, 2000

2.1.3.4. Kandungan Dinding Sel *Chlorella*

Chlorella mempunyai dinding sel yang tersusun dari *selulosa*, *hemiselulosa* dan *lignin* merupakan sumber serat yang dibutuhkan untuk hewan dan manusia, terutama untuk mencegah terjadinya kanker usus. Sunoto (1991) menerangkan pula bahwa sumber serat dibutuhkan hewan untuk membantu proses pencernaan makanan, memproduksi sel-sel kekebalan dalam saluran pencernaan sehingga hewan tidak mudah terkena diare maupun infeksi pada saluran pencernaannya. Analisa kimiawi dinding sel *chlorella* menunjukkan kandungan bahan seperti pada Tabel 2.5.

Tabel 2.5. Kandungan dinding sel *chlorella*

Jenis Kandungan	Prosentase (%)
Protein	27,0
Lipid	9,2
Selulosa	15,4
Hemiselulosa	31,0
Glikosamin	3,3
Abu	5,2

Sumber : Steenbock, 2000

2.1.3.5. Kandungan Klorofil *Chlorella*

Chlorella banyak mengandung klorofil bila dibandingkan dengan tanaman lain. Klorofil dalam *chlorella* dibentuk dari prekursor yaitu *protopropirin* dan *magnesium protopropirin*. *Protopropirin* ini identik dengan *heme*, penyusun *hemoglobin* darah (Steenblock, 2000). Pada tahun 1955 Kephart telah melakukan

penelitian dengan memanfaatkan *chlorella* pada penderita anemia, hasilnya menunjukkan bahwa kemampuan usus untuk menyerap unsur besi (Fe) dari makanan meningkat dan menyebabkan produksi sel darah merah bertambah (Stenbloock, 2000).

2.1.4 Pengaruh *Chlorella* terhadap Kekebalan Tubuh

Sukiman (2002) menyebutkan *chlorella* memiliki beberapa komponen yang berpengaruh terhadap kekebalan tubuh antara lain; dinding sel, beta karoten dan CGF (*Chlorella Growth Factor*).

1. Dinding sel *Chlorella* memiliki komposisi yang terdiri dari 27 % Protein ; 9,2 % lemak ; 15,4% selulosa ; 31% hemiselulosa ; 3,3 % glukosamin dan abu yang mengandung besi serta kapur.

Khasiat dinding sel ini adalah :

- a. Merangsang kekebalan tubuh sehingga tidak mudah terserang penyakit yang disebabkan virus (batuk, pilek), dan bakteri (disentri, tifus).
 - b. Membantu mengikat racun yang berasal dari bahan kimia dan makanan maupun bakteri.
 - c. Membantu merangsang produksi sel-sel kekebalan saluran cerna sehingga tidak mudah terserang infeksi saluran cerna (enteritis) dan tidak mudah sakit perut atau diare.
2. Beta karotin, dimana jumlahnya 18-20 kali lebih banyak dari kadar beta karotin dalam wortel, pepanya, atau tomat.

Beta karotin memiliki beberapa manfaat antara lain: dapat berperan sebagai anti oksidan yang dapat mengikat radikal bebas; membantu tubuh untuk memproduksi suatu zat yang disebut *Tumor Necrotic Faktor (TNF)*; merupakan sumber vitamin A berkhasiat yang berperan dalam meningkatkan daya tahan tubuh; meningkatkan kekebalan tubuh dengan merangsang pembentukan makrofag serta menstimulasi makrofag untuk memproduksi interleukin 1 dan sel limfosit T *Helper* untuk memproduksi interleukin 2 yang nantinya dapat merangsang sel limfosit untuk membentuk antibodi. Selain itu, beta karoten terbukti dapat sebagai stimulator sel limfosit T *Helper*. Sel T *Helper* ini akan menghasilkan zat-zat yang dapat merangsang aktifitas kekebalan tubuh salah satunya adalah sel limfosit B yang mampu membentuk antibodi (Sukiman, 2002).

3. *Chlorella Growth Factor (CGF)*.

Chlorella Growth Faktor (CGF) dalam *chlorella* ditemukan pada tahun 1957. Pemakaian CGF pada hewan menurut Jensen (1987) juga dapat merangsang pertumbuhan dan perbaikan jaringan. Disebutkan bahwa CGF terkonsentrasi di dalam substansi genetik dan merupakan kompleks nukleopeptida yang mengandung belerang dan enam molekul gula. Penyusun peptidanya adalah asam amino, asam glutamate, alanin, prolin, manosa, rhamnosa, arabinosa dan silosa (Steenblock, 2000). Suriawiria (2002) menyebutkan bahwa dalam sel *chlorella* memiliki 5% CGF. Disebutkan pula CGF dapat menstimulasi sel limfosit T *Helper* untuk aktif. Sel limfosit T *Helper* yang aktif akan mensekresi interleukin yang merupakan protein atau peptida

yang berfungsi merangsang sel limfosit lain. Sebagai contohnya, interleukin-2 (IL-2) yang membantu proliferasi dan diferensiasi sel limfosit B menjadi sel plasma yang menghasilkan antibodi. Peristiwa dihasilkannya interleukin-2 (IL-2) selain untuk merangsang sel lain, ternyata juga memiliki umpan positif bagi sel limfosit T *Helper* sendiri untuk mensekresi interleukin yang lebih banyak lagi. Dengan cara ini sel limfosit T *Helper* memodulasi respon kekebalan humoral (sel limfosit B) maupun respon kekebalan yang di perantarai sel (sel limfosit T) (Campbell *et al.*, 2004).

2.2. Probiotik

Menurut Winarno (1997) yang dikutip dari Lokapirnasari dan Sabdoningrum (1998) probiotik mulai dikenal tahun 1965 sejak Lily dan Sillwell mempopulerkannya, walaupun sebenarnya konsep probiotik telah digunakan sejak tahun 1900-an. Probiotik merupakan preparat yang terdiri dari satu atau campuran beberapa mikroba yang dipercaya dapat memberikan efek yang bagus bagi kesehatan tubuh (Ghoofur *et al.*, 2005). Schrezenmeir (2004) menyebutkan pemberian probiotik mempunyai fungsi antara lain : untuk mengurangi jumlah bakteri patogen dalam usus, menstimulasi respon kekebalan dan menjaga kesehatan.

Penelitian berkaitan dengan pemberian probiotik terhadap pakan ternak telah banyak dilakukan. Pemberian probiotik pada sapi terbukti meningkatkan pertambahan berat badan dan efisiensi makanan, sementara tingkat kematiannya turun dari 7,5% menjadi 1,5%. Pada ternak ayam pemberian probiotik

meningkatkan penambahan berat badan 491,3 g/hari dibandingkan dengan kontrol 459.6 g/hari. Namun, penelitian pada babi pengaruh probiotik terlihat jelas apabila temak tersebut dalam kondisi stress (Samadi, 2002). Cuaca lingkungan yang terlalu panas, tempat dan kandang yang terlalu sesak turut memicu timbulnya stress pada babi. Pada saat stres babi terlihat gelisah dan tidak tenang, nafsu makan dan frekuensi makan cenderung mengalami penurunan (Benjamin, 2005)

Mikroba dalam probiotik menghasilkan enzim proteolitik, amilolitik dan lipolitik yang akan membantu mengubah protein, karbohidrat serta lemak makanan menjadi lebih mudah untuk diserap (Risch, 2000). Mikroba dari probiotik yang telah masuk ke dalam saluran pencernaan selanjutnya dapat berperan sebagai *imunodulator* yang mengaktifkan respon imun. Dengan demikian pemberian probiotik pada anak ayam dapat digunakan untuk mencegah dan mengontrol terjadinya penyakit (Kostiuk *et al.*, 1992; Koenen *et al.*, 2004).

Probiotik yang digunakan sebagian besar mengandung beberapa bakteri asam laktat yang termasuk dalam spesies *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. plantarum*) dan *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. thermophilum*), di samping itu terdapat juga bakteri *Streptococcus lactis*. *Saccharomyces cerevisi* dan *Saccharomyces boulardii* merupakan jenis fungi yang sering ditambahkan dalam probiotik. Kesemua mikroba tersebut tidak patogen, aman dan bersifat menyehatkan serta membantu meningkatkan efisiensi pencernaan (Ghafoor *et al.*, 2005). Pemanfaatan probiotik yang merupakan campuran berbagai spesies mikroorganisme yang mampu memecah komponen serat (*cellulocytic microorganism*) pakan yang pada akhirnya dapat meningkatkan produktivitas

ternak. Hal ini berkaitan dengan peningkatan kecepatan cerna serat pakan pada waktu proses pencernaan yang secara tidak langsung juga mempengaruhi ketersediaan energi yang diperlukan untuk produktivitas ternak (Balai Penelitian Ternak, 1995).

Havenaar and Spanhaak (1994) melaporkan bahwa probiotik dapat mensimulasi respon imun ayam melalui dua cara: (a) mikroba dari probiotik yang masuk ke dalam usus selanjutnya akan melakukan hambatan pertumbuhan terhadap mikroba lain yang patogen, (b) atau juga bisa melalui absorpsi antigen mikroba probiotik yang kemudian menstimulasi sistem kekebalan. Stimulasi sistem kekebalan ini melalui beberapa cara antara lain: melalui peningkatan aktivitas dan kemampuan fagositosis makrofag; melalui peningkatan produksi antibodi biasanya imunoglobulin G dan imunoglobulin M; melalui peningkatan antibodi lokal pada mukosa dinding usus yaitu imunoglobulin A. Adapun jenis mikroba yang sering ada dalam probiotik dapat dilihat pada tabel 2.6. dibawah ini

Tabel 2.6. Jenis Mikroba dalam Probiotik

Jenis Mikrobia	Jumlah Cfu/ml
Bakteri Asam Laktat	$1,25 \times 10^4$
<i>Rhizobium</i>	$9,00 \times 10^4$
<i>Azotobacter</i>	$2,50 \times 10^4$
<i>Jamur selulolitik</i>	$1,00 \times 10^5$
<i>Actinomyces</i> selulolitik	$6,00 \times 10^4$

Sumber : Darmosuwito, 2001

2.3. Gambaran Umum Sistem Kekebalan Tubuh

Sistem kekebalan tubuh merupakan suatu sistem yang tersusun dari beberapa sel dan molekul yang bertanggung jawab terhadap kekebalan tubuh. Sistem kekebalan tubuh ini terbagi menjadi dua bagian besar, yaitu sistem kekebalan spesifik dan sistem kekebalan nonspesifik. Karakter dari sistem kekebalan nonspesifik adalah kapasitas yang terbatas dalam membedakan mikroba yang satu dengan lainnya dan sel-sel yang secara alami hampir sama.

Dalam perkembangannya sistem kekebalan nonspesifik sering dikaitkan dengan adanya kekebalan alami yang dimiliki oleh masing-masing individu secara alami, dimana bentuk kekebalan alami tersebut biasa disebut dengan istilah "barrier tubuh". Manifestasi barrier tubuh ayam sebagai sistem kekebalan nonspesifik (*natural immunity*) adalah sebagai berikut :

1. Temperatur tubuh

Tingginya temperatur tubuh pada ayam merupakan respon awal terhadap masuknya agen penyebab penyakit.

2. Bulu dan kulit

Secara anatomis bulu berfungsi sebagai barrier tubuh yang melindungi tubuh dari kemungkinan penetrasi organisme penyebab penyakit. Sedangkan kulit mengeluarkan sekresi mucus (*lisosim*) yang dapat mengeliminasi organisme penyebab penyakit.

3. Mikroflora normal tubuh

Usus secara normal terdapat mikroba yang dapat membantu dalam proses pencernaan, namun sebaliknya bisa juga menjadi patogen bila jumlahnya berlebihan.

4. Silia pada saluran respirasi

Disepanjang saluran respirasi terdapat silia yang dapat menangkap dan mengeliminasi mikroorganisme patogen yang memasuki saluran respirasi. Kerja silia menjadi lebih berat dan kurang efektif jika kualitas udara jelek, terutama karena banyaknya debu dan amonia pada areal peternakan (Butcher *et al.*, 2006).

Sistem kekebalan spesifik merupakan sistem pertahanan tubuh yang terjadi apabila sistem kekebalan nonspesifik tidak mampu mengeliminasi agen penyakit. Hal ini terjadi jika sistem kekebalan nonspesifik tidak bisa mengenali agen infeksi, sebab hanya sedikit reseptor yang cocok untuk agen infeksius atau agen tidak bertindak sebagai faktor antigen terlarut yang aktif. Jika hal ini terus-menerus maka akan diperlukan molekul spesifik yang akan berikatan langsung dengan agen infeksius yang dikenal dengan antibodi dan selanjutnya akan terjadi proses fagositosis (Fedik, 2003).

2.4. Organ limfoid Ayam

Sistem kekebalan merupakan sebuah jaringan kerja antara organ limfoid primer, organ limfoid sekunder dan produk-produk yang dihasilkannya. Carpenter (2004) membagi organ limfoid pada ayam menjadi organ limfoid primer dan organ limfoid sekunder. Organ limfoid primer merupakan organ yang diperlukan

untuk pematangan sel limfosit T dan sel limfosit B sehingga menjadi sel limfosit yang dapat mengenal antigen. Organ limfoid primer pada ayam terdiri dari Timus (*Thymus Gland*) dan bursa Fabrisius. Kedua organ tersebut mempunyai fungsi mengatur produksi dan diferensiasi sel limfosit. Timus adalah bagian yang paling aktif dalam mengadakan proliferasi sel limfosit. Timus merupakan bagian yang membangun dan mematangkan sel limfosit T yang berasal dari sumsum tulang dan mengalir melalui darah. Sedangkan Bursa fabrisius adalah bagian yang membangun dan mematangkan sel limfosit B.

Organ limfoid yang lain disebut organ limfoid sekunder yang mempunyai fungsi terutama untuk proliferasi dan diferensiasi sel limfosit yang disensitasi oleh antigen spesifik. Organ limfoid sekunder juga sangat responsif terhadap stimulasi antigenik meliputi limpa dan simpul limfe. Limpa merupakan tempat respons imun utama terhadap antigen yang berada pada aliran darah. Individu yang hidup tanpa limpa akan menjadi rentan terhadap infeksi penyakit (Baratawidjaja, 2006).

2.5. Limpa

Limpa merupakan kumpulan jaringan limfoid terbesar dalam organisme. Karena banyak mengandung sel fagosit dan ada kontak erat antara darah dan sel-sel ini, maka limpa merupakan alat pertahanan penting terhadap mikroorganisme yang menerobos masuk sirkulasi. Limpa juga merupakan tempat destruksi bagi banyak sel darah merah dan tempat pembentukan sel limfosit yang disensitasi

oleh antigen dalam darah. Limpa akan bereaksi dengan antigen yang terbawa oleh darah dan merupakan organ tempat pembentukan antibodi (Junqueira., 1997).

Limpa terletak disebelah kanan atas tepatnya diantara proventikulus dan ventrikulus. limpa berbentuk lonjong bewarna merah coklat kenyal, ukurannya bervariasi tergantung dari umur ayam. Limpa dikelilingi oleh kapsul jaringan ikat, dari kapsul ini tumbuh trabekule-trabekule ke dalam. Bagian dalam (pulpa) terdiri dari dua macam jaringan yaitu pulpa putih dan pulpa merah. Pulpa putih berisi limfonoduli dan merupakan tempat utama produksi sel limfosit dalam limpa. Folikel-folikel kecambah (*germinal*) mengandung sel limfosit B sehingga disebut sebagai jaringan *ekuivalen bursa*, sedang sel limfosit lainnya yang mengelilingi folikel dan selaput periarteriolar mengandung sel limfosit T sehingga disebut sebagai tergantung timus (*Tymic dependent regio*). Pulpa merah mengelilingi pulpa putih dan ditemukan sejumlah besar eritrosit (Bellanti, 1993).

Limpa memiliki jaringan retikular yang banyak mengandung sel limfoid dan makrofag, sehingga menjadikan limpa sebagai organ yang penting dalam mekanisme pertahanan tubuh. Limpa juga berperan penting sebagai tempat fagositosis benda-benda asing yang hidup atau mati dalam darah. Adanya benda-benda asing ini dalam limpa menimbulkan proses reaktif yang secara makroskopis terlihat sebagai bengkak limpa. Ini terlihat jelas terutama ketika hewan terserang suatu penyakit (Ressang, 1984).

2.6. Fungsi limpa

Fungsi utama limpa adalah menyimpan darah yang tidak ikut dalam peredaran darah. Disamping itu limpa mempunyai fungsi-fungsi lain seperti pendewasaan sel-sel darah merah yang pematangannya dilakukan pada sumsum tulang dan sel-sel RES hati dan tempat pendewasaan sel darah putih, yaitu sel limfosit yang ada hubungannya dengan pembentukan antibodi (Ressang, 1984).

Antibodi akan terbentuk apabila ada rangsangan antigen yang memasuki organ limpa. Proses pembentukan antibodi diawali dengan adanya ikatan antigen dengan makrofag yang menyebabkan dikeluarkannya sitokin sebagai media yang menstimulasi pergerakan sel limfosit. Makrofag yang berikatan dengan antigen akan mengeluarkan interleukin-1 untuk menstimulasi sel-sel limfosit *T_{Helper}*. Kemudian sel limfosit *T_{Helper}* akan berproliferasi dan melepaskan interleukin-2 (IL-2) untuk meningkatkan respons sel limfosit B. Pada akhirnya sel limfosit B yang responsif akan membesar dan membelah diri berulang kali menjadi dua kelompok sel. Kelompok sel yang menghasilkan antibodi disebut sel plasma, sedang yang lain berperan sebagai sel memori (Tizard, 1988).

2.7. Limfosit

Sel limfosit merupakan sel yang berperan utama dalam sistem kekebalan spesifik. Sel limfosit dapat dikelompokkan menjadi dua tipe, yaitu sel limfosit T dan sel limfosit B. Kedua sel limfosit tersebut berasal dari sel-sel prekursor atau progenitor yang sama yaitu *pluripotent haemopoetic stem cell* (PHSC) yang diproduksi dalam sumsum tulang belakang. Produksi sel-sel tersebut melalui suatu proses proliferasi yang disebut *haemopoiesis*. Salah satu sel tersebut akan

berkembang menjadi sistem mieloid atau *pluripotent myeloid stem cell* (PMSC), sedang sel yang lain akan berkembang menjadi sistem limfoid (Fedik, 2001). Dari sistem mieloid dihasilkan eritrosit monosit, granulosit dan megakariosit, sedangkan dari sistem limfoid akan dihasilkan sel limfosit T dan sel limfosit B (Junqueira dkk., 1997).

Sel limfosit T dan sel limfosit B mempunyai peran penting dalam sistem kekebalan spesifik. Sel limfosit T bekerja pada sistem kekebalan spesifik yang bersifat seluler, sedangkan sel limfosit B bekerja pada sistem kekebalan spesifik yang bersifat humoral. Pada kekebalan humoral, sel limfosit T (terutama sel limfosit T_{Helper}) berinteraksi dengan sel limfosit B dan merangsang proses proliferasi dan differensiasi sel limfosit B. Pada kekebalan seluler, sel limfosit T (sel limfosit T_{Helper}) mengaktifkan makrofag untuk menghancurkan mikroba intraseluler yang menginfeksi sel. Kedua sistem kekebalan ini bekerja sangat erat satu dengan yang lain (Baratawidjaja, 2006).

Pematangan sel limfosit B terjadi dalam beberapa tahap. Fase-fase pematangan sel limfosit B berhubungan dengan Imunoglobulin (Ig) yang diproduksi. Pada unggas, sel limfosit B berkembang pada *bursa Fabrisius*. Dalam tahap perkembangannya mula-mula *progenitor limfoid* (Sel asal) akan berkembang menjadi sel pre-B dengan membentuk Ig M dalam sitoplasmanya. Stadium selanjutnya, Ig M akan bergerak ke arah membran sel dan kemudian dijadikan sebagai reseptor monomerik permukaan sel limfosit. Pada tahap ini untuk pertama kalinya sel limfosit dapat mengenali antigen. Dalam perkembangan selanjutnya, di bentuk Ig D yang kemudian juga bergerak ke arah membran sel.

Sel limfosit yang sudah memiliki Ig M dan Ig D sebagai reseptor pada permukaannya di anggap sebagai sel limfosit B yang telah matang. Selanjutnya sel limfosit B yang telah matang memerlukan rangsangan sel lain (sel limfosit T_{Helper} dan rangsangan lain) untuk dapat teraktivasi. Sel limfosit B yang telah matang akan berkembang menjadi limfoblas. Limfoblas ini selanjutnya akan berkembang menjadi dua kelompok sel. Beberapa kelompok sel yang matang (sel plasma) mampu memproduksi antibodi bebas. Sedang kelompok sel lainnya berkembang menjadi sel memori (Stanes *et al.*, 1993).

Sel limfosit T tidak memproduksi antibodi seperti halnya sel limfosit B. Pematangan sel limfosit T berada pada organ limfoid primer yaitu timus. Dalam perkembangannya sel limfosit T dan sel limfosit B berasal dari prekursor yang sama yaitu progenitor limfoid. Walaupun berasal dari progenitor yang sama, sel limfosit T lebih banyak jenisnya dibandingkan sel limfosit B. Pematangan sel limfosit melibatkan peningkatan dan pengurangan jumlah molekul permukaan sel atau yang lebih di kenal dengan sebutan sitokin. Sel limfosit T yang teraktivasi akan berkembang dan berdiferensiasi dengan memproduksi sitokin yang bermacam-macam. Sitokin ini sangat penting terutama untuk membedakan jenis dan tipe limfosit T. Berdasarkan molekul permukaan (sitokin) yang dibentuk, Sel limfosit T dapat dibedakan menjadi beberapa jenis dan tipe. Tipe pertama yaitu limfosit T_{Helper} adalah sel limfosit T yang mengekspresikan molekul permukaan CD_4 . Sel limfosit T_{Helper} sangat penting terutama dalam mengaktivasi sel limfosit B untuk berproliferasi dan berdiferensiasi. Tipe yang kedua adalah sel limfosit $T_{suppresor}$ yang mengekspresikan CD_8 pada permukaannya dan berperan dalam

menjaga keseimbangan regulasi respon imun. Tipe yang ketiga adalah sel limfosit $T_{\text{cytotoxic}}$. Sel limfosit ini berperan terutama pada membunuh sel-sel infeksi yang disebabkan oleh infeksi virus. Walaupun pembentukannya tidak reguler, namun sel limfosit $T_{\text{cytotoxic}}$ sudah mampu menghambat virus untuk bereplikasi. Tipe yang keempat yaitu sel limfosit T_{ah} mengekspresikan CD_4 dan berperan dalam respon kekebalan terutama pada reaksi hipersensitifitas tipe 4, penyakit autoimun, dan respon terhadap transplantasi organ (Stanes *et al.*, 1993).



BAB 3 MATERI DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di kandang Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga mulai tanggal 21 Juli 2006 sampai tanggal 31 Agustus 2006. Pembuatan preparat dan pemeriksaan histologi organ limpa, serta pemotertan hasil pengamatan dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

3.2.1. Materi Penelitian

3.2.1. Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah 45 ekor anak ayam Broiller umur sehari, galur CP 707 dengan berat rata-rata 37 gram yang berasal dari PT. Charoen Pokphan.

3.2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan selama penelitian ini antara lain kandang dari kayu yang dilengkapi dengan tempat pakan dan minum, *sprayer* untuk menyemprot, timbangan digital untuk menimbang pakan, timba dan tampon (wadah) untuk mencampur pakan (lampiran 1.), gunting, pinset dan *scalpel* untuk melakukan seksi dan pengambilan organ limpa. Pot plastik untuk tempat organ limpa sebelum dibuat preparat, *obyek glass* dan *cover glass* untuk pembuatan preparat histologi, mikroskop untuk memeriksa dan menghitung jumlah sel limfosit, serta alat dokumentasi untuk mendokumentasikan hasil pemeriksaan.

3.2.3 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan selama penelitian ini antara lain: vaksin AI produksi Medion dengan strain virus H₅N₁, *crude chlorella* untuk suplementasi pakan diambil dari Balai Pembibitan Air Payau (BPAP) Desa Pecaron Kabupaten Situbondo. Probiotik (merk X), desinfektan yang digunakan rodalon (produksi P.T. Pyridam Veteriner) dan formalin 10% untuk pengawetan organ limpa sebelum dibuat preparat histologi.

Selain itu, bahan-bahan lain yang digunakan untuk penelitian adalah bahan untuk pembuatan preparat histologi antara lain: alkohol 70 %, 80 % , 90 % dan 96 %, paraffin dan *Hematoxylin Eosin* sebagai bahan pewarnaan preparat histologi serta minyak emersi yang digunakan saat pemeriksaan sel limfosit.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Persiapan Penelitian

Persiapan penelitian dimulai dengan melakukan persiapan pembuatan kandang dan penyemprotan kandang dengan rodalon seminggu sebelum ayam datang. Ketika anak ayam datang dilakukan pengecekan fisik. Kemudian ke 45 anak ayam tersebut diadaptasikan selama satu minggu pada kandang yang terbuat dari kayu. Kandang diberi alas koran dan pemanas yang menggunakan lampu (65 Watt) sebanyak dua buah. Selama masa adaptasi, anak ayam tersebut hanya diberikan pakan standart Produksi P.T. Wonokoyo jaya corporindo (Lampiran.2) dan minuman.

Persiapan lainnya adalah pembuatan kandang baterai individu sebanyak 45 buah yang dilengkapi dengan tempat pakan dan minum. Selanjutnya dilakukan penyemprotan dengan menggunakan rodalon.

3.3.2 Perlakuan Pada Hewan Coba

Setelah diadaptasikan selama satu minggu, hewan coba sebanyak 45 ekor secara acak di tempatkan pada kandang baterai individu dan dibagi menjadi 9 macam perlakuan selama 33 hari. Perlakuan tersebut antara lain:

Perlakuan A_0B_0 : Pemberian pakan dan minum standart (kontrol)

Perlakuan A_1B_0 : Pemberian *crude chlorella* 5 % pada pakan setiap hari (tanpa pemberian probiotik).

Perlakuan A_2B_0 : Pemberian *crude chlorella* 10 % pada pakan setiap hari (tanpa pemberian probiotik).

Perlakuan A_0B_1 : Pemberian probiotik 0,2 % melalui air minum 2 hari sekali (tanpa pemberian *crude chlorella*).

Perlakuan A_1B_1 : Pemberian *crude chlorella* 5 % pada pakan setiap hari dan probiotik 0,2 % melalui air minum 2 hari sekali.

Perlakuan A_2B_1 : Pemberian *crude chlorella* 10 % pada pakan setiap hari dan probiotik 0,2 % melalui air minum 2 hari sekali.

Perlakuan A_0B_2 : Pemberian probiotik 0,4 % melalui air minum 2 hari sekali (tanpa pemberian *crude chlorella*)

Perlakuan A_1B_2 : Pemberian *crude chlorella* 5 % pada pakan setiap hari dan probiotik 0,4 % melalui air minum 2 hari sekali.

Perlakuan A_2B_2 : Pemberian *crude chlorella* 10 % pada pakan setiap hari dan probiotik 0,4 melalui air minum 2 hari sekali.

Setelah hewan coba tersebut berumur 27 hari dilakukan vaksinasi AI (*Avian Influenza*) dengan dosis 0,2 ml secara subcutan. Kemudian pada hari ke 14 setelah vaksinasi (umur 41 hari), hewan coba dikorbankan untuk pengambilan organ limpa.

Perlakuan pemberian *crude chlorella* (Faktor A) dalam pakan dilakukan tiap hari. Jumlah *crude chlorella* yang ditambah dan dicampurkan pada pakan ayam broiler tergantung dari konsentrasi *crude chlorella* dalam pakan. Pada penelitian ini ada 3 macam konsentrasi *crude chlorella* yang di persiapkan yaitu :

- Pakan A_0 : 0% *crude chlorella* dalam pakan (tanpa mendapatkan penambahan *crude chlorella*).
- Pakan A_1 : 5% *crude chlorella* dalam pakan (950 gram pakan ditambah 50 gram *crude chlorella*).
- Pakan A_2 : 10% *crude chlorella* dalam pakan (900 gram pakan ditambah 100 gram *crude chlorella*).

Perlakuan pemberian probiotik pada air minum (Faktor B) dilakukan 2 hari sekali. Ada 3 macam penambahan probiotik yang dilakukan pada penelitian ini yaitu :

- Minuman B_0 : 0 ml probiotik dalam 1000 ml air minum (0 %).
- Minuman B_1 : 2 ml probiotik dalam 1000 ml air minum (0,2 %).
- Minuman B_2 : 4 ml probiotik dalam 1000 ml air minum (0,4 %).

3.3.3 Pembuatan Preparat Histologi

Organ limpa yang didapat dimasukkan dalam pot plastik yang berisi larutan formalin 10% dan didiamkan selama 24 jam. Kemudian dilakukan pembuatan preparat histologi dengan menggunakan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (Lampiran 3).

3.4 Jenis Rancangan Percobaan

Penelitian ini termasuk eksperimental murni yang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) berpola factorial dengan dua macam faktor. Faktor pertama (Faktor A) adalah perlakuan pemberian *crude chlorella* (A_0 , A_1 , dan A_2) pada pakan masing-masing sebesar 0 %, 5 % dan 10 %. Faktor kedua (Faktor B) adalah perlakuan pemberian probiotik (B_0 , B_1 dan B_2) melalui air minum masing-masing sebesar 0 %, 0,2 % dan 0,4 %. Untuk masing-masing perlakuan digunakan 5 (lima) ulangan.

Tabel. 3.1 Rancangan percobaan berpola factorial (3x3)

Perlakuan	A_0	A_1	A_2
B_0	A_0B_0	A_1B_0	A_2B_0
B_1	A_0B_1	A_1B_1	A_2B_1
B_2	A_0B_2	A_1B_2	A_2B_2

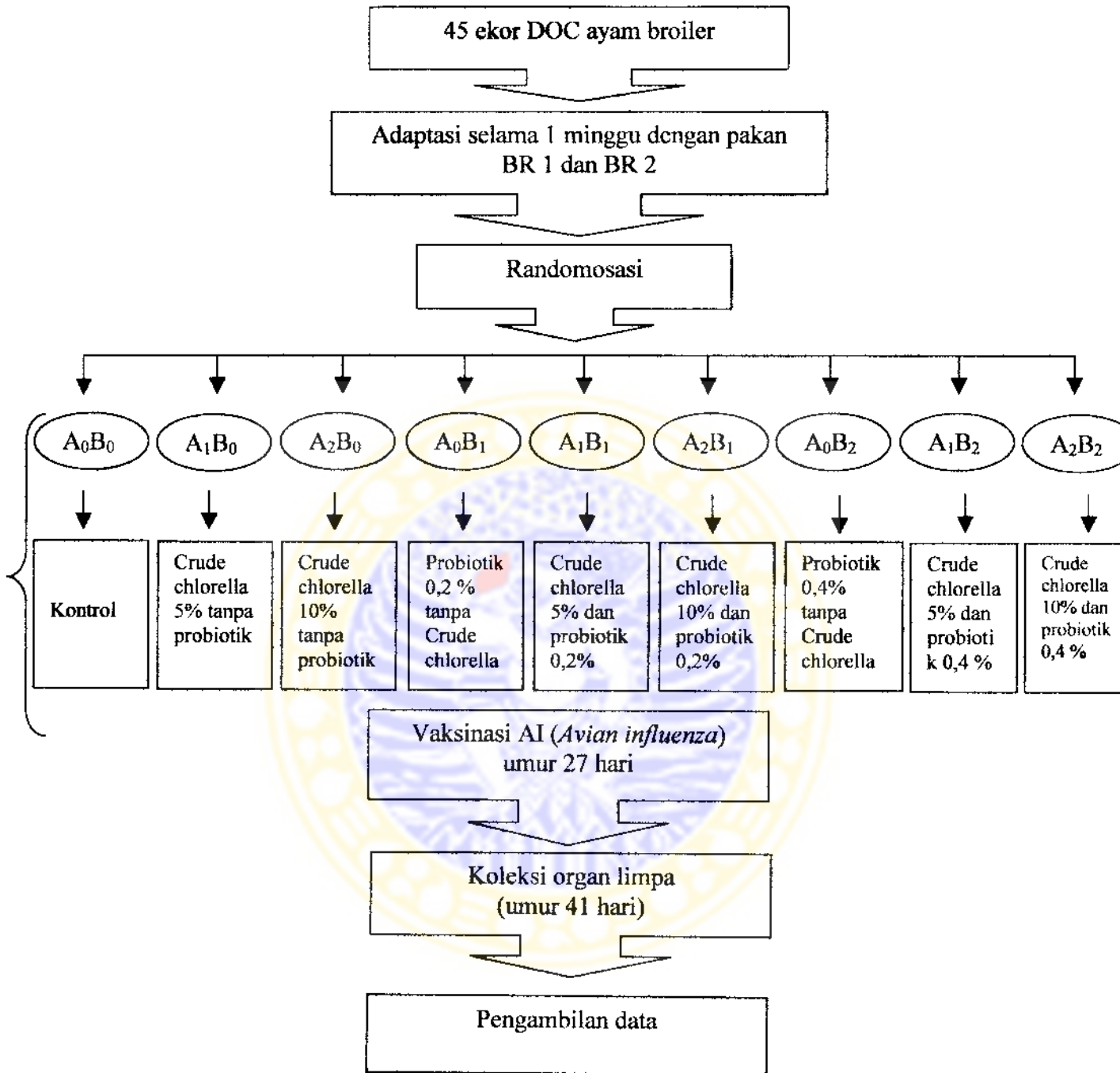
Keterangan : A_0 : *Crude chlorella* 0 %
 A_1 : *Crude chlorella* 5 %
 A_2 : *Crude chlorella* 10 %
 B_0 : Probiotik 0 %
 B_1 : Probiotik 0,2 %
 B_2 : Probiotik 0,4 %

3.5 Peubah yang diamati

Pengamatan secara mikroskopis ditujukan pada jumlah sel limfosit pada pulpa putih dan pulpa merah limpa ayam broiler pada suatu lapangan pandang. Setiap preparat dilakukan pengamatan masing-masing sebanyak lima lapangan pandang pada pulpa putih dan pulpa merah yang dipilih secara acak dengan menggunakan mikroskop (pembesaran 1000X). Hasil penghitungan kemudian dijumlah dan dirata-rata.

3.6 Analisis Statistik

Dalam penelitian ini uji statistik yang digunakan adalah uji *Anova* untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian *crude chlorella* dan probiotik terhadap jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler. Bila terdapat perbedaan yang sangat nyata, maka dilanjutkan dengan uji *Duncan* ($\alpha = 0,01$) untuk mengetahui perlakuan yang terbaik (Kusriningrum, 1990).



Gambar 3.1. Bagan Penelitian

BAB 4 HASIL PENELITIAN

Pada penelitian ini, penghitungan jumlah sel limfosit dilakukan pada bagian pulpa putih dan pulpa merah limpa ayam broiler. Selanjutnya jumlah sel limfosit dari kedua bagian tersebut dijumlah dan kemudian di rata-rata. Pada pemeriksaan dengan menggunakan mikroskop perbesaran 1000x, didapatkan hasil rata-rata dan simpangan baku jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler sesuai tabel 4.1. di bawah ini :

Tabel 4.1. Rata-rata (\bar{X}) dan simpangan baku (SD) jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi AI (*Avian influenza*) setelah pemberian *crude chlorella* dan probiotik.

Perlakuan	A ₀ (<i>Chlorella</i> 0%)	A ₁ (<i>Chlorella</i> 5%)	A ₂ (<i>Chlorella</i> 10%)	$\bar{X} \pm SD$
B ₀ (Probiotik 0 %)	103,86 ^f ±4,23	119,68 ^e ± 4,02	128,96 ^d ±5,88	123,66 ±15,90
B ₁ (Probiotik 0,2 %)	126,71 ^d ±1,11	145,81 ^c ±2,91	169,89 ^b ±2,97	143,47 ±19,57
B ₂ (Probiotik 0,4 %)	140,40 ^e ±3,69	164,92 ^b ± 5,07	180,80 ^a ±2,98	159,88 ±23,43
$\bar{X} \pm SD$	117,50 ±11,60	147,47 ±18,43	162,04 ±17,60	142,34 ±24,52

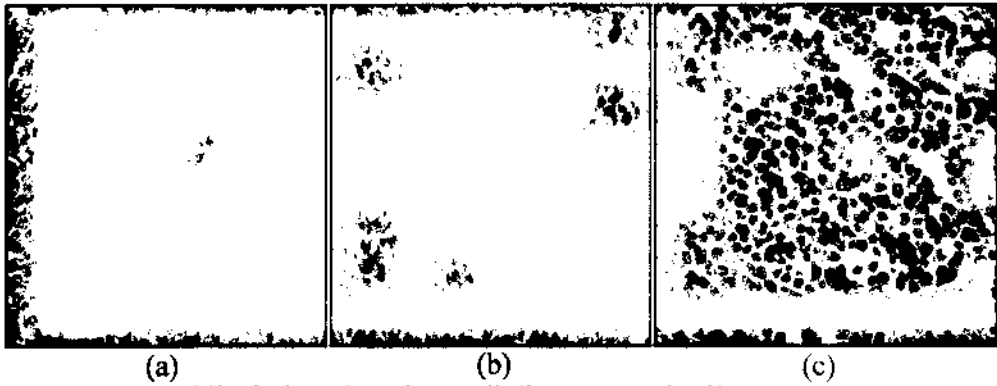
Keterangan : superskrip yang berbeda pada rata-rata jumlah sel limfosit menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata antara perlakuan ($p < 0,01$).

Hasil uji *Anova* yang telah dilakukan terhadap jumlah sel limfosit limpa ayam broiler yang divaksinasi *Avian Influenza* seperti (lampiran.4) menunjukkan bahwa pemberian *crude chlorella* berpengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) dimana dari hasil penghitungan jumlah sel limfosit (tabel.4.1) terlihat bahwa perlakuan pemberian *crude chlorella* 10 % pada pakan menunjukkan jumlah sel limfosit

tertinggi dibandingkan pemberian *crude chlorella* 5 % dan yang tidak diberi *crude chlorella*. Pemberian probiotik melalui air minum juga memberikan pengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi *Avian Influenza*. Pemberian probiotik 0,4 % melalui air minum menunjukkan peningkatan jumlah sel limfosit tertinggi dibandingkan dengan pemberian probiotik 0,2 % dan yang tidak diberi probiotik. Demikian pula interaksi perlakuan antara pemberian *crude chlorella* dan pemberian probiotik berpengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap terhadap jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi *Avian Influenza*. Dari interaksi perlakuan antara pemberian *crude chlorella* dan probiotik terlihat bahwa jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi *Avian Influenza* tertinggi ditunjukkan pada perlakuan A_2B_2 yaitu interaksi antara pemberian *crude chlorella* 10 % pakan dan pemberian probiotik 0,4 % melalui air minum, dimana perlakuan ini berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) dengan perlakuan lain. Jumlah sel limfosit terendah ditunjukkan pada perlakuan A_0B_0 sebagai kontrol.

Hasil pemotretan sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi *Avian influenza* setelah pemberian *crude chlorella* dan probiotik dapat dilihat pada gambar 4.1. dan gambar 4.2.

Sel limfosit pada pulpa putih limpa ayam broiler (Gambar 4.1) terlihat sebagai kumpulan sel, dimana dengan pewarnaan *Hematoxylin eosin* (H.E) inti sel limfosit memberikan warna ungu atau kebiruan (*basofilik*) dan sitoplasma yang bewarna merah (*acidofilik*). Demikian juga sel limfosit pada pulpa merah limpa ayam broiler (gambar 4.2.).



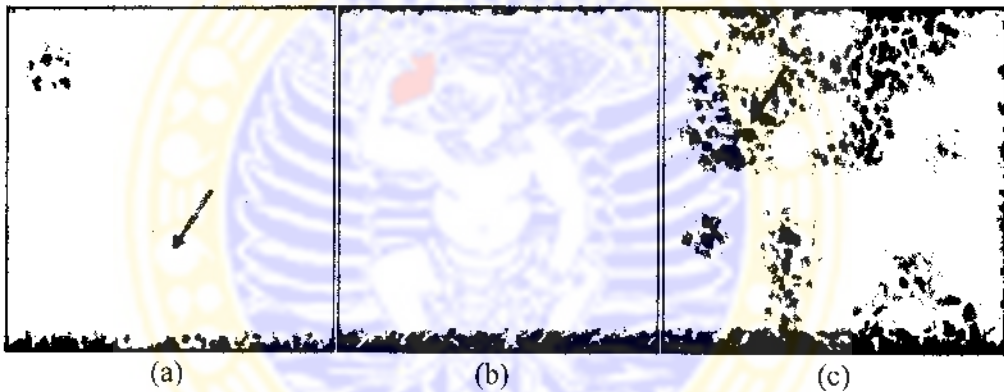
Gambar 4.1. Sel limfosit pada pulpa putih limpa ayam broiler

(Perbesaran 400x; pewarnaan IIE).

Keterangan : (a) Kontrol A_0B_0 : tanpa pemberian *Crude chlorella* dan probiotik

(b) Perlakuan A_2B_1 : *Crude chlorella* 10 % dan probiotik 0,2 %

(c) Perlakuan A_2B_2 : *Crude chlorella* 10 % dan probiotik 0,4 %



Gambar 4.2. Sel limfosit pada pulpa merah limpa ayam broiler

(Perbesaran 400x; pewarnaan IIE).

Keterangan : (a) Kontrol A_0B_0 : tanpa pemberian *Crude chlorella* dan probiotik

(b) Perlakuan A_2B_1 : *Crude chlorella* 10 % dan probiotik 0,2 %

(c) Perlakuan A_2B_2 : *Crude chlorella* 10 % dan probiotik 0,4 %

BAB 5 PEMBAHASAN

Secara normal sel limfosit pada limpa terletak dan bergerombol disepanjang untaian pulpa putih. Sel limfosit ini membentuk suatu bentukan yang dikenal dengan folikel limpa atau nodus limpa. Sel limfosit T maupun sel limfosit B pada limpa terletak pada daerah yang berbeda. Sel limfosit T terletak berdekatan dengan arteri sentralis dalam selubung limfatik (folikel limpa), sedangkan sel limfosit B terletak terutama pada pulpa putih (Lesson, 1996).

Apabila ada antigen memasuki organ limpa akan ditangkap oleh sel limfosit. Penangkapan antigen oleh sel limfosit disebabkan adanya interaksi antigen dengan makrofag yang menyebabkan disekresikannya sitokin yang mempengaruhi pergerakan sel limfosit. Makrofag yang terikat antigen akan mengeluarkan interleukin-1 untuk mengaktifkan sel-sel limfosit T_{Helper}. Kemudian sel limfosit T_{Helper} akan berproliferasi dan melepaskan interleukin-2 (IL-2) untuk meningkatkan respon sel limfosit B terhadap antigen. Pada akhirnya sel limfosit B tersebut akan membesar dan membagi diri berulang kali menjadi dua populasi sel yaitu populasi sel plasma yang mampu menghasilkan antibodi dan populasi sel memori yang tidak mampu menghasilkan antibodi (Tizard, 1988).

Berdasarkan hasil pemeriksaan dan penghitungan jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi AI (*Avian Influenza*) terbukti bahwa perlakuan pemberian *crude chlorella* pada pakan dapat meningkatkan jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi AI. Perlakuan pemberian probiotik melalui air minum juga terbukti dapat meningkatkan jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi AI. Demikian pula interaksi perlakuan

antara pemberian *crude chlorella* dan pemberian probiotik terbukti dapat meningkatkan jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi AI.

Berdasarkan uji anova (lampiran 4) terlihat bahwa perlakuan pemberian *crude chlorella* 10 % dapat meningkatkan jumlah sel limfosit tertinggi dan berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) dibandingkan dengan pemberian *crude chlorella* 5% dan yang tanpa diberi *crude chlorella*. Hal ini dapat terjadi karena protein *chlorella* yang cukup tinggi (sebanyak 60%) berperan penting dalam pembentukan sistem kekebalan seluler maupun humoral yang ditunjukkan melalui peningkatan jumlah sel limfosit T, sel limfosit B dan antibodi (Keith dan jeejbhoy, 1997). Abdulakalykova and Ruizferia (2006) menyatakan bahwa arginin merupakan protein yang dapat menstimulasi sel limfosit T_{Helper} dan diikuti sekresi interleukin 2 sehingga proliferasi dan diferensiasi sel limfosit B dapat berlangsung. Steenblock (2000) juga menyatakan bahwa *chlorella* mengandung arginin sebesar 3,64%. Arginin ini merupakan protein yang terkandung dalam *chlorella* berfungsi mengaktifkan makrofag memproduksi beberapa sitokin (protein yang terlarut). Makrofag aktif berperan sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC) yang menyajikan antigen yang telah dikenali dengan dimunculkannya *Major Histocompatibility Complex- II* (MHC-II) kepada sel limfosit T_{Helper} sehingga sel ini menjadi aktif. Sel limfosit T_{Helper} yang aktif akan melepaskan Interleukin 2 (IL-2) yang selanjutnya akan mengaktifkan sel limfosit B untuk berproliferasi dan berdiferensiasi. APC juga memproduksi dan melepaskan interleukin 1 (IL-1) yang mampu merangsang sel limfosit T untuk berproliferasi dan berdiferensiasi. Sel limfosit T yang teraktifasi akan memproduksi IL-4 yang

berfungsi mengaktifasi sel limfosit B, IL-5 untuk merangsang produksi sel limfosit B dan IL-6 untuk merangsang diferensiasi sel limfosit B. Sehingga dengan adanya proliferasi dan diferensiasi sel limfosit tersebut maka sel limfosit akan bertambah banyak dan antibodi yang terbentuk juga akan meningkat. Proliferasi dan pematangan sel-sel prekursor pada sumsum tulang belakang sebagai sel induk pembentukan darah termasuk limfosit, dapat dirangsang oleh sitokin. Sitokin ini diproduksi oleh makrofag dan sel-sel stroma dalam sumsum tulang belakang, sehingga menjadikan lingkungan lokal untuk hematopoiesis. Sitokin yang lain juga mendukung proliferasi dan pematangan sel keturunan (derivat) dari sel prekursor (Fedik, 2001)

Pada perlakuan pemberian probiotik terlihat bahwa pemberian probiotik 0,4 % melalui air minum dapat meningkatkan jumlah sel limfosit tertinggi dan berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) dibandingkan dengan pemberian probiotik 0,2 % dan yang tanpa diberi probiotik. Peningkatan jumlah sel limfosit tersebut disebabkan oleh peran bakteri nonpatogen dalam probiotik. Bakteri nonpatogen ini merupakan antigen lipopolisakarida yang dapat menginduksi reaksi pertahanan imunologik pada ayam broiler. Reaksi imunologik pada suatu individu ditandai dengan peningkatan aktifitas sel limfosit untuk berproliferasi supaya jumlahnya banyak dan kemudian berdiferensiasi menjadi sel memori atau menjadi sel plasma yang menghasilkan antibodi (Fedik, 2001). Adanya antigen lipopolisakarida dapat merangsang makrofag menjadi lebih aktif dan memiliki kemampuan lebih untuk fagositosis. Penambahan produksi antibodi melalui rangsangan proliferasi sel limfosit juga terjadi sehingga pada akhirnya akan terbentuk suatu antibodi.

Biasanya antibodi yang dihasilkan antara lain Imonoglobulin M dan Immunoglobulin G (Havenarr and spanhaak, 1994).

Pada interaksi perlakuan antara pemberian *crude chlorella* dan pemberian probiotik juga dapat meningkatkan jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi *Avian Influenza*. Interaksi perlakuan antara pemberian *crude chlorella* 10% pada pakan dan pemberian probiotik 0,4 % melalui air minum merupakan interaksi perlakuan yang dapat meningkatkan jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi *Avian Influenza* tertinggi dan berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) dengan perlakuan yang lain. Peningkatan jumlah sel limfosit terjadi karena ayam mengkonsumsi *crude chlorella* dan probiotik. *Crude chlorella* mempunyai komponen khusus yang berpengaruh terhadap kekebalan tubuh antara lain dinding sel, beta karotin dan CGF (*Chlorella Growth Faktor*). Dinding sel dan beta karotin mengaktifkan makrofag, sedangkan pemakaian CGF selain merangsang pertumbuhan dan perbaikan jaringan pada hewan ternyata juga dapat merangsang aktivitas limfosit T (T_{Helper}) dan mempengaruhi sel limfosit B untuk berproliferasi dan berdiferensiasi (Sukiman, 2002). Mula-mula CGF yang telah terserap akan diedarkan melalui peredaran darah ke keseluruhan bagian tubuh (termasuk limpa). Sel limfosit T (sel T_{Helper}) akan teraktivasi sehingga memproduksi interleukin-2 (IL-2) yang selanjutnya akan merangsang sel limfosit B berproliferasi untuk meningkatkan jumlahnya dan berdiferensiasi untuk menghasilkan antibodi. Selain menghasilkan IL-2, sel limfosit T_{Helper} juga memaparkan reseptor IL-2 pada

permukaanya dan berespon terhadap produksi interleukinnya sendiri dengan berproliferasi.

Pemberian probiotik diasumsikan membantu pemecahan dinding sel *chlorella* sehingga semua komponen dan zat-zat yang terkandung dalam *chlorella* dapat tercerna. Pemberian probiotik diasumsikan juga membantu menjaga keseimbangan mikroorganisme pada ayam yang sedang divaksin AI karena vaksinasi yang diberikan sedikit banyak memberikan efek stres. Pada saat ternak mengalami stress, keseimbangan mikroorganisme dalam saluran pencernaan bisa terganggu. Hal ini mengakibatkan sistem pertahanan tubuh menurun dan bakteri-bakteri patogen berkembang dengan cepat. Probiotik yang digunakan sebagian besar mengandung beberapa bakteri asam laktat yang termasuk dalam spesies *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. plantarum*) dan *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. thermophilum*). Bakteri tersebut dalam usus akan melakukan hambatan pertumbuhan terhadap bakteri lain yang patogen dan kemudian juga bisa menstimulasi sistem kekebalan melalui absorpsi antigen dari bakteri probiotik sendiri (lipopolisakarida). Sukiman (2002) menyebutkan bahwa klorofil *chlorella* dapat menghambat bakteri anaerob yang berlebihan dalam usus besar. Klorofil tidak secara langsung membunuh bakteri anaerob tersebut, tetapi klorofil menciptakan suasana yang tidak menguntungkan bagi bakteri anaerob sehingga bakteri tersebut jumlahnya menurun. Silov dkk., (1969) yang dikutip oleh Sukiman (2002) juga menyatakan bahwa klorofil *chlorella* selain dapat menurunkan jumlah bakteri anarob dalam usus ternyata juga dapat menguntungkan bagi bakteri aerob sehingga jumlahnya meningkat. Bakteri aerob

tersebut antara lain *Lactobacilli*, *Streptococci* dan *Bofidobacteria* merupakan bakteri yang biasa dipakai dalam probiotik.



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil suatu kesimpulan antara lain :

1. Pemberian *crude chlorella* berpengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) dalam meningkatkan jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi AI (*Avian Influenza*).
2. Pemberian probiotik berpengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) dalam meningkatkan jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi AI (*Avian Influenza*).
3. Terjadi interaksi antara pemberian *crude chlorella* dan pemberian probiotik berpengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) dalam meningkatkan jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi AI (*Avian Influenza*).

6.2. Saran

1. Melakukan penelitian lebih lanjut dengan menghitung titer antibodi pada ayam yang telah mendapatkan suplementasi *chlorella* dan probiotik yang divaksinasi *Avian Influenza*.
2. Perlu diteliti juga mengenai efek sinergis yang ditimbulkan oleh *crude chlorella* dan probiotik dengan menggunakan vaksin yang lain seperti ; vaksin ND dan vaksin yang lain.

Dalam dunia peternakan khususnya peternakan unggas upaya pencegahan suatu penyakit biasanya dilakukan melalui tindakan vaksinasi, terutama pada penyakit yang disebabkan oleh virus. Demikian juga dalam upaya pencegahan penyakit AI (*Avian Influenza*) dapat dilakukan melalui vaksinasi.

Indonesia pada awal tahun 2004 mulai melakukan vaksinasi sebagai strategi menanggulangi penyakit *Avian Influenza*, walaupun pada awalnya tindakan vaksinasi ini masih menjadi perbatasan di beberapa Negara (Poltry Indonesia, 2006).

Vaksinasi diyakini masih menjadi salah satu tindakan yang dapat mengontrol penyakit AI. Hal ini diperkuat oleh pernyataan Lazano (2004) bahwa hasil penelitian dilapangan telah menunjukkan ayam yang divaksin AI memperlihatkan jumlah virus yang dikandung lebih sedikit dari pada ayam yang tidak divaksin. Walaupun demikian dampak yang tidak diharapkan dari vaksinasi kadang terjadi antara lain timbulnya stress pada anak ayam. Stress yang berkepanjangan akan berdampak pada terhambatnya berat badan, penurunan efisiensi pakan dan kurang sempurnanya respon kekebalan (Fadilah dan Polana, 2004).

Dampak negatif yang sering timbul dalam vaksinasi menjadikan tindakan vaksinasi kurang optimal. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa pemberian *crude chlorella* pada pakan, pemberian probiotik melalui air minum dan interaksi antara kedua perlakuan tersebut dapat mendukung kerja vaksin AI dalam meningkatkan respon kekebalan tubuh ayam yang diidentifikasi melalui

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

penghitungan jumlah sel limfosit pada limpa. Adanya peningkatan sel limfosit diasumsikan juga akan meningkatkan jumlah antibodi pada hewan coba.

Penelitian ini termasuk eksperimental murni yang menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) berpola faktorial. Faktor pertama (Faktor A) adalah perlakuan pemberian *crude chlorella* (A_0 , A_1 dan A_2) pada pakan masing-masing sebesar 0 %, 5 % dan 10 %. Sedangkan faktor kedua (Faktor B) adalah pemberian probiotik (B_0 , B_1 dan B_2) melalui air minum masing-masing sebesar 0 %, 0,2 % dan 0,4 %. Untuk masing-masing perlakuan digunakan 5 (lima) ulangan. Setelah hewan coba mengalami adaptasi selama satu minggu perlakuan tersebut kemudian diberikan selama 33 hari. Pada saat hewan coba berumur 27 hari dilakukan vaksinasi *Avian Influenza* dengan dosis 0,2 ml secara subcutan. Kemudian pada hari ke 14 setelah vaksinasi (umur 41 hari), hewan coba dikorbankan untuk pengambilan organ limpa.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian *crude chlorella* pada pakan berpengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) dalam meningkatkan jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi *Avian Influenza*. Jumlah limfosit tertinggi ditunjukkan pada pemberian *crude chlorella* 10 % dibandingkan dengan pemberian *crude chlorella* 5 % dan yang tanpa diberi *crude chlorella*. Pemberian probiotik melalui air minum juga berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) dalam meningkatkan jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi *Avian Influenza*. Jumlah limfosit tertinggi ditunjukkan pada perlakuan pemberian probiotik 0,4 % dibandingkan dengan pemberian probiotik 0,2 % dan yang tanpa diberi probiotik. Interaksi perlakuan antara pemberian *crude chlorella* dan pemberian probiotik berpengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) dalam meningkatkan

jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi *Avian Influenza* (AI). Jumlah limfosit tertinggi ditunjukkan pada perlakuan A₂B₂ yaitu pemberian crude *chlorella* 10 % pada pakan dan probiotik 0,4 melalui air minum.

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa pemberian crude *chlorella* pada pakan berpengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) dalam meningkatkan jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi *Avian Influenza*. Pemberian probiotik melalui air minum berpengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) dalam meningkatkan jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi *Avian Influenza*. Demikian juga terjadi interaksi perlakuan antara pemberian crude *chlorella* dan pemberian probiotik berpengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) dalam meningkatkan jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi *Avian Influenza*. Berdasarkan hasil penelitian ini disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut dengan menghitung titer antibodi.

- Abdukalykova, S and C.A. Ruizferia. 2006. Arginine and Vitamin E Improve The Cellular and Humoral Imunc Respons of Broiler Chickens. *International Jurnal of Poultry Science* 5 (2): 121-127
- Abidin, Z. 2003. Meningkatkan Produktifitas Ayam Ras Pedaging. Agromedia Pustaka. Jakarta. Hal 12-18
- Benjamin, M. 2005. Pig trucking & Hanling- Stress and Fatigued Pig. *Elanco Animal*. 16: 57-62
- Poltry Indonesia. 2006. AI, Virus vs Vaksinasi. Browsing. <http://www.poultryindonesia.com/modules> [Selasa, Agustus 08 @ 15:32:03 WIB October 2, 2006]
- Balai Penelitian Ternak, 1995. Probiotik Pemanfaatannya dalam Pakan Ternak. Bogor.6 :12-14
- Baratawidjaja, K.G. 2006. Imunologi Dasar. Edisi ke-7. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Hal 21-22
- Bellanti, A.J. 1993. Imunologi III. Gadjah Mada University Press. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. Hal 39-41
- Butcher, G.D., and Miles.R.D. 2006. The Avian Imune System. University of Florida.[http://www. Edis.ifas.ufl.edu/pdf files](http://www.Edis.ifas.ufl.edu/pdf files).
- Campbell. N.A, Reece. J.B and Mitchell.L.G. 2004. Biology. Fifth edition. Alih bahasa : wasmen, M. Erlangga. Jakarta. Hal 80-85
- Carpenter, S. 2004. The Avian Immune System. Browsing. <http://THE%20AVIAN%20IMMUNE%20SYSTEM.htm#dsc>. [5October, 2006:39:02 WIB]
- Darmosuwito, S. 2001. Hasil Analisa Mikrobiologi Probiotik. Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Djatkowati, T.F.2003. Pengaruh Pemberian Tablet Chlorella Terhadap Berat Karkas dan Berat Limpa Ayam Pedaging yang Divaksin N.D [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Fadilah, R dan Polana, A. 2004. Aneka Penyakit Pada Ayam Ras Pedaging. Agromedia Pustaka. Jakarta. Hal 34-35, 64-66

- Fedik, A. R. 2003. **Metode Imunologi**. Airlangga University Press. Surabaya. Hal 3-5
- Fedik, A. R. 2001. **Komunikasi Sel Imun**. Laboratorium Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. Hal 6-7, 27-28
- Ghafoor, A., Nasem, S., Younus. M. and Nazir. J. 2005. **Immunodulatory Effects of Multistrain Probiotics (ProteinTM) on Broiler Chicken Vaccinated Against Avian Influenza Virus (H9)**. *International Journal of Poultry Science* 4 (10) : 777-780
- Havenarr, R and Spanhaak.S.1994. **Probiotics from an Immunological point of view** *curr. Opin Biotechcal.*, 5 : 320-5.
- Isnasetyo, A dan kurniastuti. 1995. **Teknik Kultur Phytoplankton & Zooplankton. Pakan Alami untuk Pembenihan Organisme Laut**. Penerbit kanisius. Yogyakarta. Hal 141-147
- Jensen, B.1987.**Chlorella Germ of Orient the Dynamic Food Discovery Health and Healing**.1st Ed. Benard jensen. Escandido. Hal 12-14
- Junqueira, L.C., Carneiro. J and Kelly R.O. 1997. **Histologi Dasar**. Alih bahasa dr. Jan Tambayong. Penerbit Buku Kedokteran ECG. Jakarta. Hal 271-272
- Keith, MF and K.N. Jeejebhoy. 1997. **Immunonutrition**. University of Toronto Ontario. Canada. Hal 112-119
- Koenen, M.E., J. Kramer, R. Van der Hulst, L. Heres, S.H. Jeunssen and W.J. Boersma. 2004. **Immunodulation by Probiotik Lactobacilli in layer and meat type chickens**.*Br.poult.Sci.*45:356-366.
- Kostiuk, O.P.,C.Z.cherry shora and A.P.Volakha. 1992. **The current concepts of the Influence of Lactobacilli on the human body**.*Fiziol.Zn.*,43:106-115.
- Kusriningrum, R. 1990. **Perancangan percobaan : Rancangan Acak Kelompok, Rancangan Bujur Sangkar Latin dan Percobaan Faktorial**. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. Hal 23-26
- Lokapimasari, W.P. dan Sabdoningrum, E.K. 1998. **Efek Pemanfaatan Bakteri Asam Laktat Terhadap Kecernaan Proten Kasar Pada Ayam Pedaging Jantan**. *Media Kedokteran Hewan*. 16 (3): 170-174.
- Lamella, A.1971. **Introduction to Medical Laboratory Method** 1 st ed. Medical Departement Herper and Row Publisher. New York. Hal. 228-247.
- Lesson, C. Ronald. 1996. **Buku Ajar Histologi**. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hal. 298-304.

Lawcett, D. 2002. **Buku Ajar Histologi Edisi 12, EGC, Jakarta. Hal. 367-304.**
ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

Lazano, F. 2004. Vaksinasi salah satu alternative mengontrol AI. Poltry
Indonesia. 290: 22-23.

Rich, A. 2000. Bio H+ dapat mengatasi kanibal pada anak Ayam Broiller. Poultry
Indonesia. 246 : 52-53.

Ressang. 1984. Patologi khusus Veteriner. Edisi ke dua. Penerbit Universitas
Indonesia (UI-Press). Jakarta. Hal 173-174,180-181

Samadi. 2002. Probiotik Pengganti Antibiotik Pakan Ternak.
(<http://www.kompas.com/kompas-cetak/0209/13/iptek/prob48.htm>.
[4 Mei, 2007: 14:13 WIB]

Schrezenmeir, J. 2004. Manfaat probiotik. Browsing.
<http://www.kompas.com/kompas-cetak/0411/06/Jendela/1367460.htm>
[5 October, 2006:22:03 WIB].

Starr, C and Taggart. 1995. Biology- the unity and diversity of life. Ed. 7
Wadsworth Publ. Comp. Washington. Hal 121-122

Stanes, N.A., Brostoff, J., and James K. 1993. Introducing immunology. Scand
edition. China translation and printing serviced limited. Hongkong. Hal
23-27

Steenblock, D. 2000. Chlorella makanan sehat alami. Cetakan ke Tuju. Penerbit.
P.T. Gramedia Pustaka. Jakarta. Hal 12-23

Sukiman, W. 2002. Chlorella Makanan Kesehatan Global Alami Buku II. Cetakan
Pertama. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Hal 12-18

Sunoto. 1991. Peranan Chlorella Pada Tumbuh Kembang Anak (Simposium:
Peran gizi Keluarga Dalam meningkatkan Kesehatan Ibu dan Anak
Menuju manusia Berkualitas). Kampus Usakti. Jakarta.

Suriawiria, U. 2002. Chlorella. Browsing. [http:// www.kompas.com/](http://www.kompas.com/) [15:20:01
WIB @ November 2, 2006]

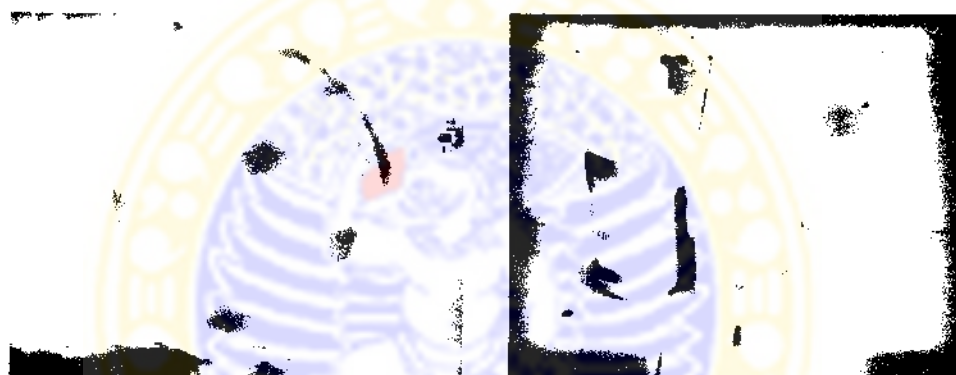
Tizzard, I. 1988. Pengantar Imunologi Veteriner. Edisi-2. Airlangga University
Press. Surabaya. Hal 91-106

Lampiran 1. Gambar alat dan bahan penelitian



(a)

(b)



(c)

(d)

Keterangan :

- (a) Timbangan elektrick, timba, dan sprayer.
- (b) Mikroscope.
- (c) *Crude chlorella*.
- (d) Probiotik, vaksin AI, dan rodalon.

Lampiran 2. Kandungan pakan standart BR 1 dan BR 2.

Kandungan pakan standart BR 1.

Kandungan	Kadar
Air	Max 12.0 %
Protein kasar	Min 21.0 %
Lemak Kasar	Min 5.0 %
Serat kasar	Min 4.0 %
Abu	Max 6.5 %
Kalsium	0.9- 1.2 %
Fosfor	0.7-0.9 %
Antibiotik	+
Coccidiostat	+

Kandungan pakan standart BR 2.

Kandungan	Kadar
Air	Max 12.0 %
Protein kasar	Min 19.0 %
Lemak Kasar	Min 5.0 %
Serat Kasar	Max 4.5 %
Abu	Max 6.5 %
Kalsium	0.9- 1.2 %
Fosfor	0.7-0.9 %
Antibiotik	+
Coccidiostat	+

Lampiran 3 : Prosedur pembuatan preparat histologi

Prosedur pembuatan preparat histologis organ limpa (Lamella, 1971) adalah sebagai berikut :

a. Fikasasi dan Pencucian

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

Cara kerja :

1. Setelah diseksi, organ limpa diambil dan dimasukkan dalam formalin 10% sekurang kurangnya 24 jam.
2. Organ limpa dipotong dengan ketebalan 0,5 cm.
3. Dilakukan pencucian dengan air mengalir selama 30 menit.

b. Dehidrasi dan Clearing

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

Cara kerja :

1. Organ yang telah dicuci dengan air, masukkan kedalam reagen dengan urutan alcohol 70 %, 80 %, 90 %, 96 % masing-masing 30 menit.
2. Selanjutnya masukkan juga kedalam alkohol absolute I, II 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 :

1. Organ organ limpa dimasukkan dalam paraffin I yang masih cair.
2. Dimasukkan kedalam oven pada suhu 60° selama 30 menit dan dipindahkan ke paraffin II yang masih cair.
3. Selanjutnya dimasukkan kedalam oven pada suhu 60° selama 30 menit.

d. Pembuatan blok paraffin

Bertujuan supaya jaringan mudah dipotong.

Cara kerja :

1. Terlebih dahulu disiapkan beberapa cetakan besi yang diolesi dengan gliserin supaya nantinya paraffin tidak melekat pada besi.
2. Besi cetakan diisi paraffin cair.
3. Organ limpa selanjutnya dimasukkan kedalam cetakan dan ditunggu sampai paraffin membeku atau mengeras.

e. Pengirisan dengan mikrotom

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

Cara kerja :

1. Blok paraffin yang telah mengeras diiris dengan mikrotom dengan ketebalan 4-7 mikron.
2. Jaringan dicelupkan kedalam air hangat dengan suhu 42-45⁰ C sampai jaringan mengembang dengan baik.
3. Gelas obyek diolesi dengan egg albumin.
4. Selanjutnya jaringan diletakkan pada gelas obyek dan dikeringkan diatas hot plate.

f. Pewarnaan

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

Cara kerja :

1. Jaringan yang telah dikeringkan dimasukkan kedalam xylol I selama 3 menit dan xylol II selama satu menit
2. Jaringan secara berturut turut dimasukkan kedalam alcohol absolute I,II, alcohol 96 %, 90 %, 80 %, 70 % dan air selama satu menit
3. Selanjutnya jaringan dimasukkan kedalam zat warna Harris selama 5-10 menit
4. Setelah itu jaringan masukkan juga kedalam air kran selama lima menit

5. Jaringan tersebut dicelupkan ke dalam alcohol asam sebanyak 3-10 kali celupan dan dicelupkan juga kedalam air kran sebanyak empat kali celupan.
6. Selanjutnya jaringan tersebut dicelupkan kedalam amoniak sebanyak enam kali celupan dan dimasukkan kedalam air kran selama 10 menit dilanjutkan kedalam aquadest selama 5 menit.
7. Jaringan secara berturut-turut dimasukkan kedalam alcohol 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, alcohol absolute I, II, masing masing 0,5 menit dan dimasukkan juga kedalam xylol I dan II, masing-masing dua menit
8. Langkah terakhir dilakukan pembersihan dari sisa pewarnaan.

g. Mounting

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

Tabel.1. Jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi *Avian Influenza* setelah diberi *crude chlorella* dan probiotik

A	B	Ulangan					Total	Rata-rata	SD
		1	2	3	4	5			
A ₀	B ₀	106.40	97.20	108.40	104.00	103.32	519.32	103.86	4.23
	B ₁	116.00	117.60	126.40	120.00	118.41	598.41	119.68	4.02
	B ₂	129.60	137.70	121.20	128.00	128.29	644.79	128.96	5.88
A ₁	B ₀	127.60	125.20	127.60	127.30	125.87	633.57	126.71	1.11
	B ₁	144.80	150.40	142.40	145.87	145.58	729.05	145.81	2.91
	B ₂	168.40	167.20	170.40	168.67	174.80	849.47	169.89	2.97
A ₂	B ₀	143.20	143.20	134.20	140.53	140.86	701.99	140.40	3.69
	B ₁	170.10	157.20	168.80	163.87	164.65	824.62	164.92	5.07
	B ₂	185.20	176.80	180.40	180.80	180.80	904.00	180.80	2.98
							6,405.22		

Ket. : Faktor A : pemberian crude chlorella pada pakan (A₀ = 0 %, A₁ = 5% dan A₂ = 10%)
 Faktor B : Pemberian probiotik pada air minum (B₀ = 0 %, B₁ = 0,2 % dan B₂ = 0,4 %)

Tabel 2. Total limfosit tiap perlakuan pemberian Crude chlorella dan Probiotik

Faktor B (probiotik)	A (Crude Chlorella)			Total	Rata-rata	SD
	A ₀ (0 %)	A ₁ (5 %)	A ₂ (10 %)			
B ₀ (0 %)	519.32	633.57	701.99	1,854.88	123.66	15.90
B ₁ (0,2 %)	598.41	729.05	824.62	2,152.08	143.47	19.57
B ₂ (0,4 %)	644.79	849.47	904.00	2,398.26	159.88	23.43
Total	1,762.52	2,212.09	2,430.61	6,405.22		
Rata-rata	117.50	147.47	162.04			
SD	11.60	18.43	17.60			

Penghitungan untuk menentukan sidik ragam

$$\begin{aligned}\text{Faktor koreksi (FK)} &= \frac{y_{..}^2}{axbxn} \\ &= \frac{(6405,220)^2}{3 \times 3 \times 5} = 911707,63\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Jumlah kuadrat (JK) total} &= \sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^n y_{ij}^2 - \text{FK} \\ &= (106,40)^2 + (97,20)^2 + \dots + (180,80)^2 - \text{FK} \\ &= 26447,80\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Jumlah kuadrat (JK) perlakuan} &= \sum_{i=1}^t \frac{y_{i.}^2}{n} - \text{FK} \\ &= \frac{519,32^2 + 598,41 + \dots + 904^2}{5} \\ &= 25906,40\end{aligned}$$

JK.Perlakuan diuraikan menjadi 3 komponen penyusunnya yaitu :

$$\begin{aligned}\text{J.K. (A)} &= \frac{1762,52^2 + 2212,09^2 + 2430,61^2}{5 \times 3} - \text{FK} \\ &= 15471,30\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{J.K. (B)} &= \frac{1854,88^2 + 2152,08^2 + 2398,26^2}{5 \times 3} - \text{FK} \\ &= 9870,98\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{JK (A.B)} &= \text{JK perlakuan} - \text{JK faktor A} - \text{JK faktor B} \\ &= 25906,40 - 15471,30 - 9870,98 \\ &= 14464,12\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{JK sisa} &= \text{JK total} - \text{JK perlakuan} \\ &= 26447,80 - 25906,40 \\ &= 541,4\end{aligned}$$

Tabel.3. Sidik ragam pengaruh pemberian *Crude chlorella* dan probiotik terhadap jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi *Avian Influenza*

Sk	d.b	Jk	Kt	F hit.	F tabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	$(axb)-1= 8$	25906,40	3238,30			
Chlorella (A)	$(a-1) = 2$	9870,98	4935,49	328,16**	3,27	5,25
Probiotik (B)	$(b-1) = 2$	15471,30	7735,65	514,34**	3,27	5,25
A.B	$(a-1)(b-1) = 4$	14464,12	3616,03	240,43**	2,64	3,90
Sisa	$a.b(n-1)=36$	541,40	15,04			
Total	$(n \times axb)-1= 44$	26447,80				

Keterangan : a = banyaknya taraf faktor A
 b = banyaknya taraf faktor B
 Ax B = interaksi faktor A dengan faktor B
 n = ulangan

F hitung interaksi > F tabel 0,01 sehingga dapat disimpulkan bahwa intraksi perlakuan *crude chlorella* (A) dan probiotik (B) memberikan pengaruh yang sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap jumlah sel limfosit pada limpa ayam broiler yang divaksinasi *Avian influenza*. Untuk mengetahui perlakuan yang terbaik maka dilanjutkan dengan uji jarak Duncan ($\alpha = 0,01$)

Uji jarak Duncan

$$s.e = \sqrt{\frac{KTS}{tn}}$$

$$LSR = SSR \times s.e$$

Keterangan :
 SSR : Significant Studentized Range
 LSR : Last Significant Range
 s.e : Standart error
 t : perlakuan
 n : ulangan

Perlakuan A (*Crude chlorella*)

$$s.e = \sqrt{\frac{KTS}{bn}} = \sqrt{\frac{1504}{35}} = 1$$

$$LSR = SSR \times s.e$$

Tabel.4.Perbedaan rata-rata perlakuan A (*Crude chlorella*) berdasarkan uji jarak Duncan

Perlakuan	Rata rata (\bar{X})	Beda		P	SSR ($\alpha=0,01$)	LSR
		$\bar{X} - A_0$	$\bar{X} - A_1$			
A ₂ (10%)	162,04 ^a	44,54 *	14,57*	3	4,03	4,03
A ₁ (5%)	147,47 ^b	29,97*		2	3,86	3,86
A ₀ (0%)	117,50 ^c					

Dari tabel.4. dapat ditarik kesimpulan bahwa sel jumlah limfosit tertinggi diperoleh pada perlakuan A₂ yang berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) dengan perlakuan A₁ dan A₀.

Perlakuan B (Probiotik)

$$s.e = \sqrt{\frac{KTS}{an}} = \sqrt{\frac{1504}{35}} = 1$$

$$LSR = SSR \times s.e$$

Tabel.5.Perbedaan rata-rata perlakuan B(Probiotik) berdasarkan uji jarak Duncan

Perlakuan	Rata rata (\bar{X})	Beda		P	SSR ($\alpha=0,01$)	LSR
		$\bar{X} - B_0$	$\bar{X} - B_1$			
B ₂ (4 ml)	159,88 ^a	36,22 *	16,41*	3	4,03	4,03
B ₁ (2 ml)	143,47 ^b	19,81*		2	3,86	3,86
B ₀ (0 ml)	123,66 ^c					

Dari tabel.5. dapat ditarik kesimpulan bahwa jumlah sel limfosit tertinggi diperoleh pada perlakuan B₂ yang berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) dengan perlakuan B₁ dan B₀.

Perlakuan interaksi antara A₀ (*Chlorella*) dan B₀ (Probiotik)

$$s.e = \sqrt{\frac{KTS}{n}} = \sqrt{\frac{1504}{5}} = 1,73$$

$$LSR = SSR \times s.e$$

Tabel.6.Perbedaan rata-rata perlakuan interaksi antara A dan B berdasarkan uji jarak Duncan

Perlakuan	Rata rata (\bar{X})	Beda								P	SSR	LSR
		$\bar{X} - A_0B_0$	$\bar{X} - A_0B_1$	$\bar{X} - A_1B_0$	$\bar{X} - A_0B_2$	$\bar{X} - A_2B_0$	$\bar{X} - A_1B_1$	$\bar{X} - A_2B_1$	$\bar{X} - A_2B_2$			
A ₂ B ₂	180,80 ^a	76,94 *	61,12*	54,09*	51,84*	40,40*	34,99*	15,88*	10,91*	9	4,41	7,63
A ₁ B ₂	169,89 ^b	66,03*	50,21*	43,18*	40,93*	29,49*	24,08*	4,97		8	4,38	7,57
A ₂ B ₁	164,92 ^b	61,06*	45,24*	38,21*	35,96*	24,08*	19,11*			7	4,34	7,51
A ₁ B ₁	145,81 ^c	41,96*	26,13*	19,10*	16,85*	5,41				6	4,28	7,40
A ₂ B ₀	140,40 ^c	36,54*	20,72*	13,69*	11,44*					5	4,22	7,30
A ₀ B ₂	128,96 ^d	25,10*	9,28*	2,25						4	4,14	7,16
A ₁ B ₀	126,71 ^d	22,85*	7,03*							3	4,03	6,97
A ₀ B ₁	119,68 ^e	15,82*								2	3,86	6,68
A ₀ B ₀	103,86 ^f											

Keterangan : subskrip yang digunakan adalah $\alpha = 0,01$

Dari tabel 6. dapat ditarik kesimpulan bahwa jumlah sel limfosit yang tertinggi diperoleh pada perlakuan A₂B₂ yang berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) dengan perlakuan yang lain. Hasil jumlah sel limfosit terendah diperoleh pada perlakuan A₀B₀ (kontrol)