

Gambaran Mikroskopis Nekrosa Sel dan Depleksi Folikel Limfoid Bursa Fabricius Ayam Broiler Pasca Pemberian Probiotik B-mix dan Infeksi *Salmonella enteritidis*

Eni Rohyati

Program Studi Kesehatan Hewan Politeknik Pertanian Negeri Kupang
Jl. Adi Sucipto Penfui, P. O. Box. 1152, Kupang 85011

ABSTRACT

Profile of Microscopic Necrosis Cells and Depilation of Lymphoid Follicle of Bursa of Broiler after Probiotic B Mix Administration and Enteritic salmonella Infection. Research to determine the incidence of necrosis cells and depletion of lymphoid follicles of bursa of fabricius after administration of B-mix probiotic and infection of *Salmonella enteritidis* (SE) was performed on 16 of broiler chickens strain abor across divided into 4 groups; control group (IA), infected by SE (IB), Probiotics without SE infection (2A) and probiotic with infected SE (2B). Probiotic was daily administered at a dose 2 ml/litre of drinking water start at DOC (day old chick) to 6 weeks old chicken. Infection performed at the 4 weeks old chicken with dose 10^8 CFU/ml of drinking water. Observation and statistical tests has indicate that the groups were administration with B-mix probiotic could be increase the proliferation of lymphocyte cell so that cells of lymphoid follicles is more dense than in the control group, while administration of B-mix probiotic in chickens had been infected by SE, can reduce the incidence of depletion of lymphoid follicles and nekrosa cells.

Key words: Bacillus, probiotic, Salmonella enteritidis, bursa fabricius, depletion

PENDAHULUAN

Dewasa ini pemakaian antibiotik didunia peternakan ayam sangat tinggi dengan tujuan mengatasi penyakit yang disebabkan oleh mikroba yang peka terhadap antibiotikadan dengan tujuan penggunaan sebagai pemacu pertumbuhan (*antibiotic growth promotor*) yang disebut AGP. Pemakaian antibiotik sebagai antimikrobia dikalangan peternak dilakukan untuk mengatasi infeksi primer maupun sekunder penyakit-penyakit ayam yang semakin kompleks, sedangkan tingginya pemakaian antibiotik sebagai AGP dilakukan sebagai pilihan untuk memacu pertumbuhan ayam guna mengimbangi naiknya harga pakan. Menurut Sudarwanto (2000) pemakaian antibiotik secara terus menerus dan berlebihan akan menimbulkan masalah baru yaitu terjadinya peningkatan resistensi mikroba patogen dalam tubuh ternak dan adanya residu antibiotik dalam produk peternakan yang dapat membahayakan konsumen. Selain itu, menurut Adil *et al* (2011) pemakaian antibiotik sebagai pemacu pertumbuhan juga sangat dekat hubungannya

dengan resistensi antibiotik, karena itu beberapa tahun belakangan ini beberapa Negara telah melarang pemakaian AGPs.

Tingginya perhatian terhadap masalah resistensi antibiotik beberapa strain bakteri dan residu antibiotik dalam beberapa produk pangan asal hewan menyebabkan terpacunya para peneliti untuk mencari alternatif. Salah satu alternatif adalah mengefektifkan pemakaian makanan imbuhan (*feed additive*) dengan menggunakan bakteri. Menurut Utomo (2002) dan Adil *et al* (2011), sistem pengendalian bakteri dalam tubuh sebagai alternatif pengganti AGPs sebenarnya ada Empat cara yaitu prebiotik, probiotik, acidifier dan enzim. Alternatif yang paling mudah dilakukan dengan biaya yang relatif murah adalah probiotik. Hal ini didukung oleh Fuller (1992) dan Gibson *et al* (1997) yang menyatakan bahwa probiotik merupakan makanan tambahan berupa mikroorganisme yang mempunyai pengaruh menguntungkan bagi induk semangnya melalui peningkatan keseimbangan mikroorganisme usus. Penggunaan probiotik akan memberikan pengaruh seperti terjadinya peningkatan berat badan dan efisiensi pakan, nafsu makan, keseimbangan mikroorganisme usus, sintesis vitamin dan peningkatan sistem kekebalan tubuh atau bersifat immunostimulan.

Bursa fabricius adalah organ limfoid yang menjadi sistem immune humoral spesies unggas dan burung melalui sekresi immunoglobulin (antibodi) oleh limfosit B dan merupakan organ yang berisi sel plasma dan makrofag yang sangat memegang peranan penting dalam respon pertahanan tubuh terhadap benda asing yang masuk tubuh serta merupakan organ yang digunakan untuk membedakan gen immunoglobulin (Toivanen *et al.*, 1987; Riddel, 1987; Tizard, 1987).

Salmonella enteritidis (SE) merupakan salah satu strain *Salmonella* yang menyebabkan salmonellosis yang bersifat zoonosis dan merupakan penyakit yang sering menyerang ternak ayam (Gast, 1997).

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui efek pemberian probiotik B-mix dan infeksi SE terhadap gambaran nekrosa sel dan deplesi folikel limfoid bursa fabricius dan mengetahui pengaruh pemberian probiotik B-mix terhadap SE.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan penelitian yang digunakan dikelompokkan dalam 4 kelompok bahan yaitu hewan percobaan, preparat probiotik, isolat Salmonella dan bahan-bahan lain.

Hewan percobaan yang digunakan adalah ayam broiler strain Abor arcres 16 ekor yang berumur ± 1 hari dan dipelihara sampai 6 minggu. 16 ekor ini dibagi dalam 4 kelompok dengan distribusi masing-masing 4 ekor. Pemeliharaan dilakukan dengan cara mengkondisikan ayam sesuai dengan keadaan di peternakan komersial dan diberi makan dan minum sesuai aturan pemeliharaan ayam.

Preparat probiotik yang adalah probiotik B-mix yang merupakan campuran dari 6 jenis Bacillus yang berbeda dan dengan kontribusi dosis yang berbeda-beda yang diisolasi dari saluran pencernaan ayam. Jenis Bacillus dan dosis (Colony Forming Unit = CFU. mL⁻¹) serta komposisi masing-masing jenis yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Jenis Bacillus dan komposisinya dalam B-mix

Jenis Bacillus	Dosis (CFU. mL ⁻¹)
Bacillus apiaries	0.6 x 10 ⁷
Bacillus alvei	6 x 10 ⁷
Bacillus brevis	2 x 10 ⁷
Bacillus circulans	5 x 10 ⁷
Bacillus laterophilus	5 x 10 ⁷
Bacillus coagulans	4 x 10 ⁷
Total	2.26 x 10 ⁸

Salmonella yang digunakan dalam penelitian ini adalah Salmonella enteritidis (SE) 10⁸ CFU/ml yang diisolasi dari saluran pencernaan ayam. Bahan-bahan lain yang digunakan adalah BNF (buffer netral formalin) 10%, bahan pembuat preparat histopatologi, bahan pewarnaan hematoxilin (HE), kertas label dan kertas tissue. Alat-alat yang digunakan adalah kandang pemeliharaan, tempat makan, tempat minum, pisau potong, pin penomoran ayam, tabung film untuk menyimpan organ, timbangan, peralatan pembuatan dan pewarnaan preparat histopatologi dan micrometer.

Metode Penelitian

Penelitian dilaksanakan dalam beberapa tahap kegiatan yaitu persiapan dan pengelompokan ayam, pemberian preparat probiotik dan infeksi Salmonella, nekropsi dan pemeriksaan patologi anatomi, pembuatan dan pewarnaan preparat histopatologi, pengamatan preparat histopatologi dan analisa data.

Kegiatan persiapan ayam dilaksanakan melalui pemeliharaan DOC (day old chick) sejumlah 400 ekor yang dikelompokkan dalam 40 kelompok dengan distribusi masing-masing 10 ekor. Pada tiap kelompok diambil 96 ekor secara acak dan dipisahkan serta dikelompokkan dalam 12 kelompok dengan distribusi masing-masing 8 ekor. Pada penelitian ini diambil secara acak 4 kelompok, kemudian dari tiap kelompok yang terpilih diambil secara acak sebanyak 4 ekor, maka kelompok ayam yang digunakan adalah 4 kelompok dengan distribusi masing-masing 4 ekor. 4 kelompok tersebut terdiri dari kelompok kontrol (IA), kelompok yang diinfeksi dengan SE (IB), kelompok probiotik tanpa SE (2A) dan kelompok probiotik yang diinfeksi dengan SE (2B).

Ayam pada kelompok 2A dan 2B diberikan probiotik B-mix 10^8 CFU. mL⁻¹ dengan cara dicampurkan kedalam air minum dengan dosis 2 cc. L⁻¹ air minum tiap hari mulai dari DOC sampai 6 minggu. Ayam pada kelompok IB dan 2B pada umur ± 4 minggu diinfeksi dengan SE 10^8 CFU/ml dengan dosis 0.5 cc/ekor per oral.

Nekropsi atau pembedahan setelah mati dilakukan 2 kali yaitu 1 minggu pasca infeksi (PI) dan 2 minggu pasca infeksi (PI) dengan terlebih dahulu dilakukan penimbangan berat hidup. Setelah nekropsi dilakukan pengamatan perubahan patologi anatomi, pengambilan/pengamatan dan penimbangan organ bursa fabricius. Selanjutnya bursa fabricius dimasukkan dalam tabung sampel dan difiksasi dengan BNF 10 % dan selanjutnya dibuat preparat histopatologi dan diberi pewarnaan hematoxilin eosin (HE).

Pengamatan terhadap preparat histopatologi bursa fabricius dengan pewarnaan HE dilakukan dibawah mikroskop dengan pembesaran obyektif 10x dan 40x dan dengan okuler 2.5x. Pengamatan dilakukan dengan cara memilih 3 plika bursa fabricius secara acak dari tiap preparat, kemudian jumlah folikel limfoid dalam tiap plika tersebut dihitung dan dilakukan pengamatan dan

perhitungan secara teliti terhadap kejadian/parameter nekrosa sel dan deplesi folikel limfoid. Kedua parameter pengamatan ini dianggap ada jika kehadirannya dalam folikel limfoid adalah >30 % dan sebaliknya, jika kehadirannya <30 % dalam tiap folikel limfoid maka parameter tersebut dianggap tidak ada. Keberadaan parameter tersebut dalam tiap plika ditentukan dengan rumus;

Keterangan;

a = jumlah keberadaan parameter tersebut dalam tiap plika

b = jumlah folikel limfoid dalam 1 plika

c = total keberadaan parameter pengamatan dalam 1 plika

Data hasil pengamatan histopatologi atau mikroskopis di analisa lebih lanjut dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan Uji Beda Nilai Tengah Tukey.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan mikroskopis dan analisis statistik pengaruh pemberian probiotik B-mix dan infeksi *Salmonella enteritidis* terhadap nekrosa sel dan deplesi folikel limfoid bursa fabricius dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Gambaran Nekrosa Sel Dan Deplesi Folikel Limfoid Bursa Fabricius

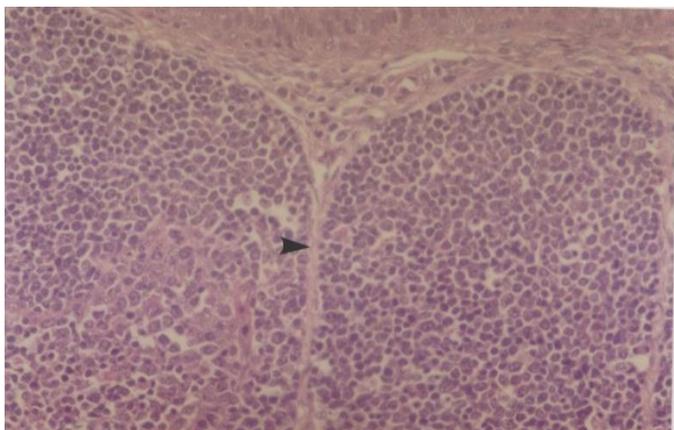
Kelompok	Nekrosa Sel		Deplesi Folikel Limfoid	
	1 Minggu PI	2 Minggu PI	1 Minggu PI	2 Minggu PI
IA	6.167^c	5.037^c	3.91^b	4.58^b
IB	77.990^a	91.08^a	3.26^b	45.33^a
2A	1.670^c	40.840^b	1.30^b	12.70^{ab}
2B	37.335^b	44.032^b	5.67^b	18.47^{ab}

Keterangan: 1). Huruf yang berbeda pada kelompok dan waktu pada kolom dan baris yang sama menunjukkan berbeda nyata (p<0.05), 2). Kelompok; Kontrol (IA), yang diinfeksi SE (IB), probiotik tanpa infeksi SE (2A), probiotik dengan infeksi SE (2B) dan 3). PI berarti pasca infeksi

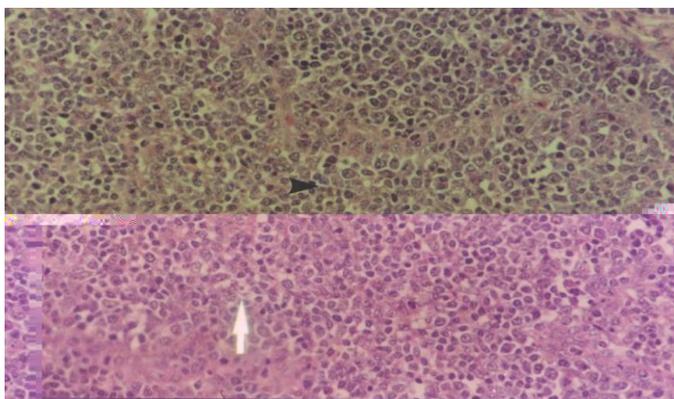
Hasil pengamatan mikroskopis dan analisa statistik terhadap jumlah nekrosa sel dalam folikel limfoid bursa fabricius menunjukkan bahwa antara kelompok IA dan 2A pada 1 minggu PI secara statistik tidak berbeda nyata (p>0.05), sedangkan pada minggu yang sama antara kedua kelompok (IA dan 2A) dengan kelompok IB dan 2B menunjukkan perbedaan nyata (p<0.05). Kelompok 2A, selain terlihat tidak berbeda nyata dengan IA juga merupakan kelompok dengan rataaan nekrosa sel yang paling kecil dan bahkan secara numerik lebih sedikit dari kelompok IA sebagai kelompok kontrol. Hal ini

$$\Sigma c = \frac{\Sigma a}{\Sigma b} \times 100 \%$$

disebabkan karena probiotik B-mix dapat meningkatkan jumlah Bakteri Asam Laktat (BAL) dalam saluran pencernaan yang pada aktifitasnya mempunyai kemampuan memodulasi produksi sitokin sebagai metabolit penghasil antibody dari makrofag monosit, mitogen dan antigen yang mendorong proliferasi limfosit dan sel *natural killer* (NK) (Famularc *et al.*,1997). Ditambahkan pula oleh Perdigon and Alvarez (1992), bahwa BAL juga mempunyai fungsi merangsang sel T untuk melepaskan limfokin yang sangat penting peranannya dalam proses proliferasi dan diferensiasi sel B. Menurut Roitt (1972) dan Vertel (2002), sel B merupakan sel yang dihasilkan bursa fabricius dan bertanggung jawab dalam sintesa antibody. Tiga pernyataan diatas dapat menjelaskan mengapa kejadian nekrosa paling sedikit terjadi pada kelompok probiotik. Proliferasi sel B tersebut menyebabkan sel-sel dalam folikel limfoid secara mikroskopis terlihat kompak



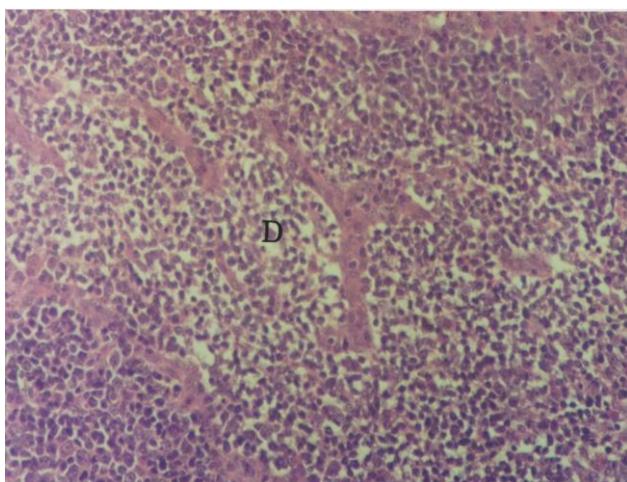
Gambar. 1 Bursa fabricius kelompok probiotik; sel-sel dalam folikel limfoid terlihat kompak dan padat (●). Pewarnaan HE (300x)



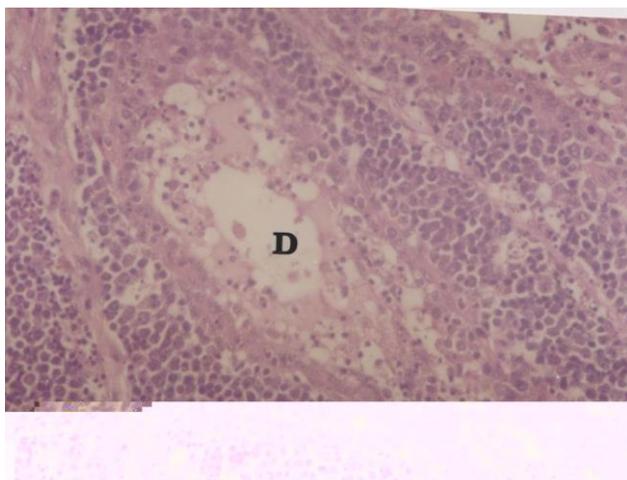
Gambar. 2 Bursa fabricius kelompok probiotik; sel-sel dalam folikel limfoid terlihat kompak dan padat (●). Pewarnaan HE (300x)

dan padat, sehingga menyebabkan jaringan interstitium antara folikel limfoid menjadi tipis dan jarak antar folikel limfoid terlihat hampir bersentuhan, sehingga gambaran mikroskopis proliferasi sel dalam folikel lifoid kelompok probiotik (Gambar 1) akan terlihat hampir sama dengan gambaran mikroskopis proliferasi sel dalam folikel limfoid kelompok kontrol (IA) (Gambar 2). Selain itu agen infeksius seperti *Salmonella* ini dapat menyebabkan inang menjadi stress. Tubuh dalam keadaan stress akan memberikan respon dengan jalan merangsang kerja pusat kelenjar adrenal pituitary

hipotalamus, termasuk tanggapan dari otak dengan melepaskan corticotrophin releasing factor (CRF) di hipotalamus dan vasopresi yang menstimulasi pituitary anterior untuk mensekresi adenocorticotrophic hormone (ACTH). Sirkulasi ACTH akan menyebabkan korteks adrenal memproduksi glucocorticoid (GC) yang mempunyai efek sitotoksin terhadap sel limfosit, sehingga sel-sel dalam folikel limfoid lebih cepat mengalami nekrosa yang pada akhirnya menyebabkan



Gambar. 3. Bursa Fabricius kelompok SE Dua minggu PI; sel-sel dalam folikel limfoid mengalami deplesi (D) dan nekrosa sel (→).Pewarnaan HE (750 x)



Gambar. 4. Bursa Fabricius kelompok SE Dua minggu PI; sel-sel dalam folikel limfoid mengalami deplesi (D) dan nekrosa sel (→).Pewarnaan HE (750 x)

terjadinya imunosupresi (Dohms dan Metz, 1991).

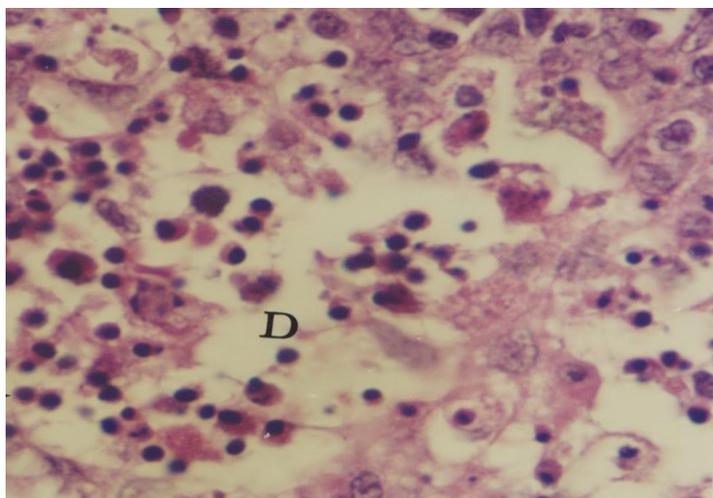
Tingginya level GC juga terjadi pada kondisi stress emosional seperti yang terjadi pada kelompok 2B 2 minggu pascainfeksi yang mengalami stress akibat pengaruh pengambilan contoh/sampel ayam pada minggu pertama pascainfeksi, sehingga secara statistik terjadi peningkatan jumlah rata-rata sel nekrosa secara nyata ($P < 0.05$) pada kelompok 2B dua minggu pascainfeksi.

Hasil pengamatan mikroskopis dan analisa statistik terhadap kejadian deplesi folikel limfoid menunjukkan bahwa pada minggu pertama pascainfeksi tidak ada perbedaan nyata ($P > 0.05$) antara semua kelompok. Pada 2 minggu pascainfeksi kelompok 1B secara numerik lebih banyak dibanding kelompok lain baik di

minggu pertama atau kedua pascainfeksi dan secara statistik berbeda nyata ($p < 0.05$) dengan kelompok IA 1 dan 2 minggu pascainfeksi dan dengan kelompok

IB, 2A serta 2B 1 minggu pascainfeksi, sedangkan dengan kelompok 2A dan 2B 2 minggu pascainfeksi kelompok ini tidak berbeda nyata ($P>0.05$).

Banyaknya sel yang mengalami nekrosa akan sangat mempengaruhi tingkat keparahan deplesi yang diderita folikel limfoid tersebut, karena menurut Nakamura *et al* (1986), Deplesi merupakan peluruhan sel-sel dalam folikel limfoid bursa fabricius. Pada hasil pengamatan terhadap folikel limfoid kelompok yang diinfeksi *Salmonella enteritidis* terlihat adanya proses peluruhan dan pengurangan sel-sel dalam folikel limfoid yang biasanya dimulai dan diawali dari bagian medulla, kemudian berlanjut pada bagian korteks dan pada akhirnya terjadi peluruhan secara total yang berakibat atrofi dan hilangnya folikel limfoid tersebut. Hal ini akan menyebabkan jumlah total folikel limfoid dalam bursa



fabricius tersebut menjadi berkurang, sedangkan menurut Toivanen *et al*, (1987), jumlah total folikel limfoid dalam bursa fabricius pada ayam dewasa dalam kondisi normal berkisar antara 8000-12000.

Gambar. 6. Bursa Fabricius, Kelompok probiotik yang SE Dua Minggu PI; folikel limfoid mengalami deplesi ringan (D). Pewarnaan HE (300x).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Pemberian Probiotik B-mix secara mandiri dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit sehingga sel-sel folikel limfoid lebih padat dari pada kelompok kontrol.
 2. Pemberian probiotik B-mix pada ayam yang diinfeksi SE, dapat mengurangi kejadian deplesi dan nekrosa sel.
-

Saran

Disarankan untuk melakukan penelitian lanjutan dengan mengatur komposisi mikroba probiotik B-mix atau menggunakan probiotik yang berisi mikroba jenis lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Adil S., M. T. Bandy, G. A. Bhat and M. S. Mir. 2011. *Alternative Strategies to Antibiotic Growth Promoters - A review*. Vol. 6 No. 1, Article 76. Department of Livestock Production and Management. Department of Veterinary Pathology Faculty of Veterinary Sciences and Animal Husbandry Sher-e-Kashmir University of Agricultural Sciences & Technology of Kashmir, Shuhama-190006, India
- Dohns, J. E dan A Metz, 1991. *Stress Mechanism of Immunosuppression*. Vet. Immune and Immunophatol. 30: 89-109
- Fuller, R. 1992. *History and Development of Probiotics*. In, *Probiotics the Scientific Basis*. Edited by R. Fuller. Champman & Hall. Pp:135-157.
- Gast, R.K. 1997. *Salmonella Infection*. In. *Diseases Poultry*. 10nd Ed. Edited by B.W. Calnek. Iowa State University Press. Ames, Iowa. USA. Pp; 8-96
- Gibson, G.R, J.M. Saavendra, S. Macfarlane. 1997. *Probiotics and Intestinal Infections*. In. *Probiotics 2; Aplication and Practical Aspect*. Edited by R. Fuller. Champman & Hall. Pp; 10-39
- Jawetz, E., J.L.Manick, dan E.A. Adelberg. 1980. *Review of Medical Microbiology*. 14nd Edition Printed. Hunstman offset printing Pte Ltd, Singapore.
- Perdigon G dan S. Alvarez, 1992. *Probiotics and the Immune State*. In *Probiotic the Scientific Basis*. Edited by R. Fuller. Chapman & Hall. Pp. 145-180
- Nakamura, K., Y. Imada, and M.Maeda. 1986. *Lymphocytic Depletion of Bursa Fabricius and Thymus in Chicken Inoculated With E. coli*. Vet. Pathol. 23;712-717
- Riddel, C. 1987. *Avian Histopathology*. American Association of Avian Pathologists. University of pennyslavia, New Boston Center. Pennyslavia. Pp: 390-393
- Roitt, I. M. 1972. *Essensial Immunology*. 2nd Printing, London
- Sudarwanto, M. 2000. *Mastitis Ditinjau dari Kesehatan Masyarakat Konsumen*. Ed ke-2. Dunia Veteriner Indonesia.
- Tizard, I. 1988. *Pengantar Immunologi Veteriner*. Cetakan ke-2. Penerjemah Partadireja. M. Airlangga Universitas Press, Surabaya. Pp; 497
- Toivanen, P., A. Naukkarinen dan O. Vanio. 1987. *What is the Function of Bursa of Fabricius?*. In *Avian Immunology: Basic and Practice Vol.I*. Edited by A.A. Toivanen. CRC Press, Florida. Pp: 79-94
- Utomo, D. B. 2002. *Apakah Probiotik itu; Pemanfaatan Bakteri untuk Kesejahteraan Hewan Ternyata Banyak Ragamnya*. Infonet. Ed 094
-