

Pengaruh Suplementasi Minyak Ikan Lemuru Terhadap Status Kesehatan Ayam Petelur yang Diimunisasi Berulang

(Effect of Lemuru Fish Oil Supplementation in Health Status of Repeated Immunized Laying Hens)

Ronald Tarigan^{1*}, Aryani Sismin Satyaningtjas¹, Arif Darmawan², Dewi Prabuwati¹, Mutia Rahmah¹,
Tho'at Hamdi¹

(Diterima Mei 2016/Disetujui September 2016)

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian minyak ikan lemuru pada ayam yang diimunisasi secara berulang terhadap status kesehatan ayam petelur. Status kesehatan diketahui dengan melihat profil leukosit, indeks stres, profil eritrosit, dan kadar malonildehida di hati dan limpa. Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dan data yang diperoleh dianalisis dengan analisis sidik ragam dan dilanjutkan dengan uji Tukey untuk melihat perbedaan antar kelompok. Ayam petelur ras ISA Brown berumur 18 minggu sebanyak 30 ekor dibagi ke dalam lima kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan terdiri dari kelompok A (imunisasi dengan lipase pankreas dan ransum kontrol); B (imunisasi dengan lipase pankreas dan ransum minyak ikan lemuru 1%); C (imunisasi dengan lipase pankreas dan ransum minyak ikan lemuru 2%); D (imunisasi dengan lipase pankreas dan ransum minyak ikan lemuru 3%); dan E (tidak diimunisasi dan ransum kontrol). Imunisasi dilakukan sebanyak tiga kali dalam interval empat minggu, pengambilan dan analisis darah dilakukan dua minggu setelah imunisasi, dan analisis malonildehida dilakukan dua minggu setelah imunisasi ketiga. Hasil penelitian menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan ($P>0,05$) pada semua parameter status kesehatan yang diamati antara kelompok yang diberikan minyak ikan lemuru dan diimunisasi dibandingkan kelompok yang tidak diimunisasi dan tidak diberikan minyak ikan lemuru.

Kata kunci: gambaran darah, imunisasi, indeks stres, malonildehida, minyak ikan lemuru

ABSTRACT

The experiment was carried out to observe the effect of adding lemuru fish oil in immunized laying hens diet on the health status of chicken through leucocyte profile, stress index, erythrocyte profile, and malonyldehde concentration in liver and spleen. The research design was completely randomized and the obtained data was analyzed with analysis of variance and continued with Tukey's Post Hoc test for differences. The experiment used thirty 18 weeks hens ISA brown strain and were divided into five groups. The groups were: A (immunization with lipase and control diet); B (immunization with lipase, control diet + 1% lemuru fish oil); C (immunization with lipase, control diet + 2% lemuru fish oil); D (immunization with lipase, control diet + 3% lemuru fish oil); and E (unimmunized and control diet). The immunization was repeated three times with four weeks interval, blood was collected and analyzed two weeks after immunization and the malonyldehde concentration in liver and spleen was measured two weeks after third immunization. The results showed that there was no significant difference ($P>0.05$) on all variables. The conclusion of this research that lemuru fish oil supplementation did not affect the health status of immunized hens.

Keywords: blood profile, immunization, lemuru fish oil, malonyldehde, stress index

PENDAHULUAN

Telur ayam mengandung antibodi spesifik dalam jumlah besar sehingga menarik perhatian banyak peneliti sebagai sumber antibodi alternatif menggantikan antibodi asal mamalia (Dubie *et al.* 2014). Terdapat tiga kelas atau isotipe immunoglobulin di telur ayam, yaitu IgY, IgM, dan IgA. IgY ditemukan dalam

jumlah besar di kuning telur, sedangkan IgM dan IgA ditemukan di putih telur sebagai hasil sekresi mukosa oviduk (Kimijima *et al.* 1990, Schade *et al.* 1991).

Keuntungan penggunaan IgY adalah antibodi yang dihasilkan lebih spesifik terhadap protein mamalia dibandingkan mamalia karena perbedaan jarak filogenetik, metode koleksi yang tidak invasif, serta jumlah antibodi yang dihasilkan banyak sehingga memungkinkan untuk produksi antibodi dalam skala besar (Jensenius *et al.* 1981). IgY ditemukan dalam jumlah besar di telur (5–25 mg/ml), lebih banyak dibandingkan IgA dan IgM (0,7–0,15 mg/ml) (Rose *et al.* 1974; Schade *et al.* 1991; Li *et al.* 1998). IgY sudah banyak digunakan untuk imunoterapi, diagnosis, dan terapi kanker, *oral passive immunization* untuk infeksi pato-

¹ Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680.

² Departemen Nutrisi dan Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680.

* Penulis Korespondensi: E-mail: rontarigan@gmail.com

gen gastrointestinal yang sudah resisten terhadap antibiotik, serta sebagai imbuhan pakan untuk mencegah emisi nitrogen di peternakan ayam melalui inhibitor enzim urikase (Dubie *et al.* 2014).

Kemampuan sistem imun ayam untuk memproduksi antibodi sangat dipengaruhi oleh kecukupan berbagai nutrisi. Minyak ikan merupakan alternatif pakan sumber asam lemak n-3 (linolenat dan eikosa pentaenoat) yang merupakan prekursor dari prostaglandin E₃ (PGE₃) dan prostasiklin I₃ (PGI₃). Asam lemak n-3 juga dapat menekan efek metabolisme dari asam lemak n-6 yang merupakan prekursor dari prostaglandin E₂ (PGE₂) yang bersifat immunosupresif dan dapat menyebabkan atrofi organ limfoid (Lowenthal *et al.* 1994; Husband 1995; Rusmana *et al.* 2008).

Penambahan minyak ikan yang terlalu tinggi dalam pakan dapat mengakibatkan efek yang kurang menguntungkan, yaitu meningkatkan peroksidasi lemak dalam plasma dan menurunkan kadar vitamin E karena asam lemak tidak jenuh ganda (*Poliunsaturated Fatty Acid* = PUFA) sangat mudah untuk teroksidasi dan memudahkan masuknya radikal bebas eksogen kedalam sel serta meningkatkan keganasan radikal bebas endogen yang dapat menyerang DNA dan protein dan memicu stres oksidatif (Wander *et al.* 1997; Takahashi & Akiba 1999; Rahman 2003). Ayam yang diimunisasi secara berulang untuk mendapatkan IgY dalam jumlah yang besar di kuning telur mendapatkan tambahan stres karena sistem imun dipaksa bekerja keras untuk menghasilkan antibodi dalam jumlah tinggi. Faktor lain yang dapat memicu stres adalah transportasi, obat, dan manajemen kandang seperti gas amoniak, suhu, dan kelembapan kandang (Dhabhar & Viswanathan 2005, Yang *et al.* 2011).

Stres juga akan memengaruhi pertumbuhan organ dan berat badan, proliferasi limfosit, presentasi CD4+ dan CD8+, sitokin, respons terhadap antigen, mengganggu keseimbangan mikroflora usus sehingga meningkatkan kejadian penyakit enterik, dampaknya produktivitas menurun dan mortalitas meningkat (Yang *et al.* 2008; Lai *et al.* 2011; Marcq *et al.* 2011). Peternakan unggas di daerah tropika lembap juga dihadapkan dengan suhu lingkungan tinggi yang mengakibatkan ternak menderita stres panas (Tamzil 2014). Hal-hal tersebut yang harus diperhatikan dalam penggunaan immunostimulan untuk memacu produksi antibodi ayam sebagai pabrik biologis di daerah tropika lembap.

Penelitian ini bertujuan untuk melihat sejauh mana penambahan minyak ikan dapat meningkatkan stres oksidatif pada ayam petelur yang diimunisasi secara berulang dilihat dari parameter stres seperti profil hematologi dan kadar malonilدهيدا sehingga dapat melihat kelayakan penggunaan minyak ikan lemuru sebagai immunostimulan.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan pada 30 ekor ayam petelur betina ras ISA Brown berumur 16 minggu serta

menggunakan metode eksperimental dengan rancangan percobaan adalah rancangan acak lengkap dengan pola faktorial 5 × 4. Pemeliharaan dilakukan di Kandang Laboratorium Nutrisi Unggas, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor dengan Sertifikat Persetujuan Etik Hewan No: 035/KEH/SKE/VI/2015.

30 ekor ayam petelur betina ras ISA Brown berumur 16 minggu setelah diaklimatisasi selama dua minggu dibagi secara acak ke dalam lima perlakuan, A, B, C, D, dan E. Komposisi dan kandungan nutrisi ransum dapat dilihat pada Tabel 1 dan 2. Imunisasi pertama dilakukan pada umur 18 minggu menggunakan 1 ml larutan enzim lipase pankreas babi 2 mg/ml dalam PBS (Appli Chem #A9520) dan 1 ml adjuvant Quil-A 2 mg/ml (Sigma #S4521) dengan penyuntikan secara intramuskular di *M. pectoralis*. Perlakuan A merupakan kontrol positif yang diimunisasi dengan lipase 1 mg dan diberikan ransum kontrol, sedangkan perlakuan B, C, dan D juga diimunisasi dengan lipase 1 mg dan diberikan minyak ikan lemuru dalam pakan dengan konsentrasi masing-masing (1, 2, dan 3%), sedangkan perlakuan E tidak diimunisasi dan diberikan ransum kontrol. Imunisasi kedua dan ketiga dilakukan dengan interval empat minggu. Pengambilan darah dilakukan dua minggu setelah imunisasi dari *vena jugularis*, sedangkan pengambilan sampel hati dan limpa dilakukan dua minggu setelah imunisasi ketiga.

Analisis Parameter Hematologi

Analisis parameter hematologi dilakukan di Laboratorium Fisiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, parameter hematologi yang diukur adalah jumlah leukosit, jumlah eritrosit, hematokrit, kadar hemoglobin, dan diferensial leukosit. Pengukuran parameter hematologi dilakukan sesuai dengan metode pada Sastradipradja *et al.* (1989). Pembuatan sediaan apus darah dilakukan sesuai dengan metode Eggen *et al.* (2001) untuk diferensiasi butir darah putih dengan pewarnaan Giemsa 10%. Penghitungan indeks stres dilakukan dengan menggunakan perbandingan heterofil dengan limfosit (H/L) (Kannan *et al.* 2000).

Pengukuran Kadar Malonilدهيدا (MDA)

Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan metode TBARSC dengan mengukur konsentrasi *Thioarbituric Acid Reactive Substances* pada sampel hati dan limpa. Hati dan limpa digerus dengan mortar dalam keadaan dingin lalu ditambahkan 1,25 ml buffer fosfat yang mengandung 11,5 g/l kalium klorida dalam kondisi dingin pH 7,4. Kemudian disentrifus dengan kecepatan 4.000 rpm selama 10 menit, supernatan keruh yang diperoleh diambil dan disentrifus lagi selama 10 menit, 1 ml supernatan yang jernih diambil dan ditambahkan 1 ml campuran larutan HCl 0,25 N yang mengandung 15% asam trikloroasetat (w/v), 0,28% asam tiobarbiurat dan 0,5% butilat hidroksitoluen. Campuran larutan dan supernatan tersebut dipanaskan pada inkubator dengan suhu 80 °C selama 1 jam, kemudian didinginkan dengan air

Tabel 1 Komposisi ransum penelitian

Bahan makanan	R ₁ (%)	R ₂ (%)	R ₃ (%)	R ₄ (%)
Jagung	55,40	53,7	51,7	50
<i>Corn gluten meal</i>	5,00	5	4	4
Bungkil kelapa	19,80	19,5	21,5	22,2
Tepung ikan	8,00	9	9	8
Minyak sawit	2,00	2	2	2
Minyak ikan lemuru	0	1	2	3
CaCO ₃	9,00	9	9	10
NaCl	0,20	0,2	0,2	0,2
Premix	0,50	0,5	0,5	0,5
DL-methionin	0,10	0,1	0,1	0,1
	100	100	100	100

Keterangan: R₁: Ransum kontrol, R₂: Ransum dengan kandungan minyak ikan lemuru 1%, R₃: Ransum dengan kandungan minyak ikan lemuru 2%, dan R₄: Ransum dengan kandungan minyak ikan lemuru 3%.

Tabel 2 Kandungan nutrisi dan energi metabolis ransum

Nutrisi	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
EM (kkal/kg)	2.900,6	2.934,35	2.951,85	2.956,10
Protein kasar (%)	19,10	19,23	19,29	19,04
Lemak kasar (%)	4,49	4,44	4,35	4,27
Serat kasar (%)	2,18	2,14	2,13	2,10
Lisin (%)	1,17	1,21	1,27	1,24
Methionin (%)	0,48	0,49	0,50	0,49
Sistein (%)	0,31	0,31	0,33	0,32
Ca (%)	3,99	4,05	4,06	4,37
P (%)	0,46	0,49	0,50	0,46
Na (%)	0,15	0,16	0,16	0,15
Cl (%)	0,20	0,21	0,21	0,20
Asam linoleat (%)	1,40	1,38	1,35	1,30
Asam linolenat (%)	0,19	0,40	0,61	0,79

Keterangan: R₁: Ransum kontrol, R₂: Ransum dengan kandungan minyak ikan lemuru 1%, R₃: Ransum dengan kandungan minyak ikan lemuru 2%, dan R₄: Ransum dengan kandungan minyak ikan lemuru 3%.

mengalir dan disentrifuse 3.500 rpm selama 10 menit. Absorbansi supernatan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisis sidik ragam dua arah (ANOVA *two way*) pada taraf kepercayaan 95%, jika terdapat pengaruh nyata (P<0,05) maka dilanjutkan dengan uji wilayah berganda Tukey HSD untuk mengetahui letak signifikansi data. Uji ANOVA dan Tukey dilakukan menggunakan program IBM SPSS Statistics® 22.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Stres oksidatif merupakan salah satu faktor yang harus dipertimbangkan untuk menilai kelayakan penggunaan minyak ikan lemuru sebagai imunomodulator. Profil leukosit merupakan parameter fisiologis klasik untuk menilai status kesehatan, khususnya akibat stres. Keuntungan lain adalah metode ini ekonomis dan tidak bergantung pada waktu pengambilan sampel dibandingkan pengukuran glukokortikoid (Davis *et al.* 2008). Berbagai penelitian menunjukkan korelasi antara peningkatan kadar glukokortikoid dengan perubahan profil leukosit, yaitu peningkatan jumlah neutrofil (heterofil) dan penurunan jumlah limfosit, pemberian glukokortikoid juga mengakibatkan

neutrophilia dan limfopenia (Gross & Siegel 1983). Peningkatan kadar glukokortikoid juga akan menghambat produksi dan sekresi berbagai sitokin seperti interleukin-1 dan 2, interferon- γ , dan MHC kelas II yang berperan dalam respons kekebalan selular dan humoral sehingga produksi antibodi terganggu dan ayam akan lebih rentan terserang penyakit (Virden & Kidd 2009).

Hasil pengukuran jumlah leukosit disajikan pada Tabel 3, terlihat bahwa jumlah leukosit tidak mengalami perubahan yang signifikan (P>0,05) antar perlakuan dengan pemberian minyak ikan lemuru dengan berbagai tingkatan dan antar periode imunisasi. Hal serupa ditemukan juga oleh Rusmana *et al.* (2008), peranan minyak ikan lemuru sebagai imunomodulator baru terlihat pada peningkatan titer antibodi sekunder terhadap ND.

Pada pengukuran indeks stres (rasio heterofil dan limfosit), terlihat pada Tabel 4 terjadi penurunan indeks stres pada imunisasi pertama meskipun tidak secara signifikan (P>0,05), penurunan tersebut disebabkan peningkatan jumlah limfosit. Peningkatan jumlah limfosit tersebut disebabkan oleh aktivasi sistem imun akibat terpapar benda asing, yaitu lipase pankreas babi untuk kemudian memproduksi antibodi. Pada imunisasi kedua dan ketiga terjadi peningkatan rasio heterofil dan limfosit. Peningkatan indeks stres diakibatkan oleh peningkatan sekresi hormon glukokortikoid yang merangsang migrasi limfosit dari

Tabel 3 Rata-rata jumlah leukosit ($\times 10^3/\text{mm}^3$) antar periode imunisasi

Perlakuan	Pre imunisasi	Imunisasi ke-1	Imunisasi ke-2	Imunisasi ke-3
A	8,7 ± 1,4	9,6 ± 1,7	9,1 ± 1,2	9,4 ± 4,8
B	11,1 ± 1,8	10,4 ± 2,8	10,2 ± 1,4	9,5 ± 2,0
C	14,2 ± 6,3	14,2 ± 5,7	12,1 ± 1,6	14,4 ± 4,2
D	12,8 ± 3,8	12,1 ± 1,1	14,6 ± 4,3	12,6 ± 1,0
E	11,9 ± 0,9	10,1 ± 2,7	12,4 ± 7,7	11,9 ± 4,1

Keterangan: A: Imunisasi 1 mg lipase, B: Imunisasi 1 mg lipase dan minyak ikan lemuru (MIL) 1%, C: Imunisasi 1 mg lipase dan MIL 2%, D: Imunisasi 1 mg lipase dan MIL 3%, dan E: Tanpa imunisasi dan MIL.

^{ab}: Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata pada $p < 0,05$

^{xy}: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata pada $p < 0,05$

Tabel 4 Rata-rata indeks stres antar periode imunisasi

Perlakuan	Pre imunisasi	Imunisasi ke-1	Imunisasi ke-2	Imunisasi ke-3
A	0,18 ± 0,05 ^a	0,09 ± 0,02 ^a	0,35 ± 0,19 ^{ab}	0,78 ± 0,43 ^b
B	0,15 ± 0,03 ^a	0,12 ± 0,07 ^a	0,45 ± 0,25 ^{ab}	0,85 ± 0,47 ^b
C	0,20 ± 0,03 ^a	0,26 ± 0,17 ^a	0,41 ± 0,06 ^{ab}	1,26 ± 0,43 ^b
D	0,24 ± 0,21 ^{ab}	0,13 ± 0,07 ^a	0,54 ± 0,67 ^{bc}	0,86 ± 0,24 ^b
E	0,11 ± 0,03 ^a	0,17 ± 0,15 ^a	0,48 ± 0,05 ^{ab}	0,51 ± 0,05 ^{ab}

Keterangan: A: Imunisasi 1 mg lipase, B: Imunisasi 1 mg lipase dan minyak ikan lemuru (MIL) 1%, C: Imunisasi 1 mg lipase dan MIL 2%, D: Imunisasi 1 mg lipase dan MIL 3%, dan E: Tanpa imunisasi dan MIL.

^{ab}: Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata pada $p < 0,05$

^{xy}: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata pada $p < 0,05$

sirkulasi menuju jaringan, seperti limfonodus, limpa, hati, dan lain-lain, serta merangsang pelepasan heterofil dari sumsum tulang ke aliran darah dan menekan pelepasan heterofil ke jaringan serta regresi timus, limpa, dan bursa fabricius, hal yang sama juga dijumpai pada pemberian glukokortikoid eksogen (Nathan *et al.* 1977, Siegel 1995).

Setelah imunisasi ketiga terlihat peningkatan secara signifikan ($P < 0,05$) indeks stres pada perlakuan A, B, C, dan D, hal ini menunjukkan peningkatan indeks stres disebabkan imunisasi berulang yang dilakukan. Peningkatan indeks stres pada perlakuan yang diberikan minyak ikan lemuru meskipun lebih tinggi dibandingkan yang tidak diberikan minyak ikan lemuru (perlakuan A) tidak berbeda secara signifikan, hal ini menunjukkan peningkatan indeks stres lebih disebabkan imunisasi berulang dan bukan akibat pemberian minyak ikan lemuru.

Pada pengukuran jumlah eritrosit, terlihat bahwa jumlah eritrosit mengalami penurunan pada semua perlakuan, termasuk pada kontrol yang tidak diimunisasi dan tidak diberikan minyak ikan lemuru. Penurunan jumlah eritrosit yang signifikan ($P < 0,05$) ditemukan pada perlakuan B yang diberikan minyak ikan lemuru 1%. Penurunan jumlah eritrosit akan berdampak pada kurangnya asupan oksigen tubuh. Kejadian ini dapat memicu kerusakan sel dan jaringan pada organ tertentu, baik berupa nekrosis dan degenerasi (Tamzil 2014). Penurunan jumlah eritrosit direspons tubuh ayam dengan peningkatan kadar Hb yang signifikan ($P < 0,05$) di dalam darah untuk memastikan kecukupan suplai oksigen ke dalam jaringan.

Pada penelitian yang dilakukan Handayani *et al.* (2013), pemberian minyak ikan lemuru sampai kadar 7,5% tidak memberikan peningkatan jumlah eritrosit

yang signifikan karena konsumsi linoleat pakan relatif sama, di mana asupan pakan dengan kadar linoleat yang lebih tinggi akan lebih rendah. Penurunan nilai hematokrit yang signifikan ($P < 0,05$) ditemukan pada kelompok yang diimunisasi dan diberikan minyak ikan lemuru, hematokrit menunjukkan presentasi eritrosit yang ada di dalam darah (Tabel 5).

Profil malonilaldehid merupakan penanda kerusakan selular akibat akumulasi radikal bebas dan merupakan produk peroksidasi asam lemak (Franco 2004, Hansen *et al.* 2006). Peroksidasi lipid merupakan reaksi di mana PUFA yang mengandung sedikitnya tiga ikatan rangkap diserang oleh radikal bebas. Berbagai kondisi dapat mengakibatkan peningkatan produksi radikal bebas (*Reactive Oxygen Species* = ROS), yaitu peningkatan suhu dan kelembapan kandang dan peningkatan laju metabolisme tubuh akibat imunisasi dan sekresi glukokortikoid. Target utama peroksidasi oleh ROS adalah PUFA dalam lipid membran. PUFA didegradasi oleh radikal-radikal bebas membentuk MDA. Pemberian suplementasi minyak ikan lemuru dalam pakan sebagai imunostimulan memberikan risiko peningkatan peroksidasi lemak karena kandungan PUFA di minyak ikan lemuru yang tinggi sehingga meningkatkan risiko stres oksidatif.

Pada Tabel 6, terlihat pada perlakuan ayam yang diimunisasi dan diberikan minyak ikan lemuru memiliki kadar MDA di hati dan limpa yang lebih tinggi dibandingkan kontrol namun tidak berbeda secara signifikan ($P > 0,05$) karena peningkatan aktivitas hati untuk menyediakan sumber energi dan peningkatan proliferasi limfosit B di limpa. Hal ini menunjukkan respons stres oksidatif yang diakibatkan imunisasi berulang dan pemberian minyak ikan lemuru masih dapat ditolerir oleh tubuh.

Tabel 5 Rata-rata jumlah eritrosit, hematokrit, dan kadar hemoglobin antar periode imunisasi

Perlakuan	Parameter	Preimunisasi	Imunisasi ke-1	Imunisasi ke-2	Imunisasi ke-3
A	Jumlah BDM (x 10 ⁶ butir/mm ³)	3,0 ± 0,7 ^{ax}	2,6 ± 0,3 ^{ax}	2,5 ± 0,1 ^{ax}	3,0 ± 0,3 ^{ax}
	Hb (g%)	13,3 ± 1,9 ^{ax}	14,8 ± 2,5 ^{ax}	14,3 ± 2,5 ^{ax}	19,2 ± 2,9 ^{bx}
	Hematokrit (%)	31,9 ± 2,2 ^{ax}	27,4 ± 2,4 ^{bx}	23,1 ± 2,9 ^{cxy}	27,1 ± 1,2 ^{bx}
B	Jumlah BDM (x 10 ⁶ butir/mm ³)	3,1 ± 0,2 ^{ax}	2,5 ± 0,3 ^{bcx}	2,7 ± 0,3 ^{bcx}	2,6 ± 0,6 ^{cx}
	Hb (g%)	14,0 ± 2,3 ^{ab}	12,7 ± 2,1 ^{ax}	17,0 ± 2,2 ^{ab}	14,5 ± 2,3 ^{bx}
	Hematokrit (%)	28,1 ± 2,7 ^{axy}	23,5 ± 3,7 ^{ax}	23,5 ± 3,7 ^{axy}	21,3 ± 4,4 ^{axy}
C	Jumlah BDM (x 10 ⁶ butir/mm ³)	3,2 ± 0,4 ^{ax}	2,6 ± 0,4 ^{ax}	2,8 ± 0,1 ^{ax}	2,9 ± 0,5 ^{ax}
	Hb (g%)	14,0 ± 1,2 ^{ax}	12,3 ± 2,5 ^{ax}	15,3 ± 1,2 ^{ax}	17,3 ± 1,8 ^{ay}
	Hematokrit (%)	27,4 ± 1,8 ^{ay}	22,5 ± 3,3 ^{abx}	23,2 ± 1,6 ^{abxy}	21,3 ± 4,4 ^{by}
D	Jumlah BDM (x 10 ⁶ butir/mm ³)	3,2 ± 0,5 ^{ax}	2,6 ± 0,4 ^{bx}	2,8 ± 0,1 ^{abx}	2,9 ± 0,5 ^{abx}
	Hb (g%)	13,7 ± 1,1 ^{ax}	12,92 ± 2,04 ^{ax}	16,5 ± 4,4 ^{ax}	11,9 ± 3,7 ^{ax}
	Hematokrit (%)	28,7 ± 2,0 ^{axy}	22,0 ± 3,7 ^{bx}	25,8 ± 5,6 ^{ax}	20,5 ± 3,1 ^{by}
E	Jumlah BDM (x 10 ⁶ butir/mm ³)	3,6 ± 0,6 ^{ax}	2,8 ± 0,6 ^{ax}	2,6 ± 0,4 ^{ax}	2,8 ± 0,4 ^{ax}
	Hb (g%)	14,3 ± 1,1 ^{ax}	14,4 ± 1,6 ^{ax}	15,1 ± 1,7 ^{ax}	17,9 ± 1,5 ^{bx}
	Hematokrit (%)	26,8 ± 2,1 ^{ay}	23,3 ± 1,8 ^{abx}	19,2 ± 2,9 ^{by}	23,6 ± 0,5 ^{axy}

Keterangan: A: Imunisasi 1 mg lipase, B: Imunisasi 1 mg lipase dan minyak ikan lemuru (MIL) 1%, C: Imunisasi 1 mg lipase dan MIL 2%, D: Imunisasi 1 mg lipase dan MIL 3%, dan E: Tanpa imunisasi dan MIL.

^{ab}: Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata pada p<0,05

^{xy}: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata pada p<0,05

Tabel 6 Rata-rata kadar malonildehida pada organ hati dan limpa

Perlakuan	Kadar MDA (µg/gr)	
	Hati	Limpa
A	1.583 ± 1.181	5.556 ± 2.428
B	1.162 ± 0,157	3.638 ± 0,894
C	1.138 ± 0,639	4.975 ± 1.929
D	1.765 ± 1.197	5.565 ± 1.050
E	0,946 ± 0,163	3.682 ± 0,881

Keterangan: A: Imunisasi 1 mg lipase, B: Imunisasi 1 mg lipase dan minyak ikan lemuru (MIL) 1%, C: Imunisasi 1 mg lipase dan MIL 2%, D: Imunisasi 1 mg lipase dan MIL 3%, dan E: Tanpa imunisasi dan MIL.

^{ab}: Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata pada p<0,05

^{xy}: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata pada p<0,05

KESIMPULAN

Suplementasi minyak ikan lemuru dalam pakan pada ayam yang diimunisasi secara berulang tidak memengaruhi berbagai parameter stres seperti jumlah leukosit, rasio heterofil, dan limfosit, serta kadar malonildehida sehingga dapat dikatakan tidak memberikan tambahan stres oksidatif pada ayam yang diimunisasi secara berulang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia sesuai Surat Perjanjian No HK.05.01/1.I/1488/2015 dan 002/IT3.2/KS.PL/2015.

DAFTAR PUSTAKA

- Davis AK, Maney DL, Maerz JC. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*. 22(5): 760–772. <http://doi.org/c694wp>
- Dhabhar FS, Viswanathan K. 2005. Short-term stress experienced at time of immunization induces a long-lasting increase in immunologic memory. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 289(3): 738–744. <http://doi.org/d89rqk>
- Dubie T, Yimer S, Adugna M, Sisay T. 2014. The potential application of avian egg antibodies with emphasis on immunotherapeutic and immunodiagnostic purpose. *Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 1(3): 018–030.
- Eggen JW, Schrijver JG, Bins M. 2001. WBC content of platelet concentrates prepared by the buffy coat method using different processing procedures and storage solutions. *Transfusion*. 41(11): 1378–1383. <http://doi.org/dkxjqj>
- Franco DJ. 2004. Effect of heat stress of production, physiological and metabolic parameters in three varieties of laying hens. [Dissertation]. Lincoln (US): University of Nebraska.
- Gross WB, Siegel HS. 1983. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Diseases*. 27(4): 972–979. <http://doi.org/c2qx3j>

- Handayani L, Iriyanti N, Yuwono E. 2013. The Effect of Menhaden Fish Oil on Eritrocyte and Trombocyte Content of Local Chicken. *Jurnal Ilmiah Peternakan*. 1(1): 39–46.
- Hansen BH, Rømme S, Garmo ØA, Olsvik PA, Anderson RA. 2006. Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 143(3): 263–274. <http://doi.org/dq6t9m>
- Husband AJ. 1995. The immune system and intergrated homeostasis. *Immunology and Cell Biology*. 73: 377–382. <http://doi.org/bgz6k4>
- Jensenius JC, Andersen I, Hau J, Crone M, Koch C. 1981. Eggs: Conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *Journal of Immunological Methods*. 46(1): 63–68. <http://doi.org/cj7pq3>
- Lowenthal JW, Conaick TE, McWateres PG, York JJ. 1994. Development of T cells immune responsiveness in chicken. *Immunology and Cell Biology*. 72(2): 115–122. <http://doi.org/d5h578>
- Kannan G, Terrill T, Kouakou B, Gazal O, Gelaye S, Amoah EA, Samake S. 2000. Transportation of goats: Effects on physiological stress responses and live weight loss. *Journal of Animal Science*. 78(6): 1450–1457. <http://doi.org/brwk>
- Kimijima T, Hashimoto Y, Kitagawa H, Kon Y, Sugimura M. 1990. Localization of immunoglobulins in the chicken oviduct. *Nihon Juigaku Zasshi*. 52(2): 299–305. <http://doi.org/d73mh5>
- Lai HTL, Nieuwland MG, Kemp B, Aarnink AJ, Parmentier HK. 2011. Effects of repeated intratracheally administered lipopolysaccharide on primary and secondary specific antibody responses and on body weight gain of broilers. *Poultry Science*. 90(2): 337–351. <http://doi.org/b4qvwv>
- Li X, Nakano T, Sunwoo HH, Paek BH, Chae HS, Sim JS. 1998. Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens. *Poultry Science*. 77(2): 266–270. <http://doi.org/brvm>
- Marcq C, Cox E, Szalo IM, Théwis A, Beckers Y. 2011. *Salmonella* Typhimurium oral challenge model in mature broilers: Bacteriological, immunological, and growth performance aspects. *Poultry Science*. 90(1): 59–67. <http://doi.org/fmm48z>
- Nathan DB, Heller ED, Perek M. 1977. The Effect of Starvation on Antibody Production of Chicks. *Poultry Science*. 56(5): 1468–1471. <http://doi.org/brvn>
- Rahman I. 2003. Oxidative stress, chromatin remodelling and gene transcription in inflammation and chronic lung disease. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 36(1): 95–109. <http://doi.org/fpd35r>
- Rose ME, Orleans E, Buttress N. 1974. Immunoglobulin classes in the hen's eggs: their segregation in yolk and white. *European Journal of Immunology*. 4(7): 521–523. <http://doi.org/d45psr>
- Rusmana D, Piliang WG, Setiyono A, Budijanto B. 2008. The Lemuru Fish Oil and the Suplemen of Vitamin E in the Diet of Broiler Chicken as an Immunomodulator. *Animal Production*. 10(2): 110–116.
- Sastradipradja D, Sikar SHS, Widjajakusuma R, Ungerer T, Maad A, Nasution H, Suriawinata R, Hamzah R. 1989. *Penuntun Praktikum Fisiologi Veteriner*. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Schade R, Pfister C, Halatsch R, Henklein P. 1991. Polyclonal IgY antibodies from chicken egg yolk-an alternative to the production of mammalian IgG type antibodies in rabbits. *ATLA*. 19: 403–419.
- Takahashi K, Akiba Y. 1999. Effect of oxidized fat on performance and some physiological responses in broiler chickens. *Japanese Poultry Science*. 36(5): 304–310. <http://doi.org/b9rrx5>
- Siegel HS. 1995. Stress, strains and resistance. *British Poultry Science*. 36(1): 13–22. <http://doi.org/cd7zgb>
- Tamzil MH. 2014. Stres panas pada unggas: metabolisme, akibat dan upaya penanggulangannya. *Wartazoa*. 24(2): 57–66.
- Wander RC, Hall JA, Gradin JL, Du SH, Jewe DE. 1997. The Ratio of Dietary (n-6) to (n-3) Fatty Acids Influence Immune System Function, Eicosanoid Metabolism, Lipid Peroxidation and Vitamin E Status in Aged Dogs. *Journal of Nutrition*. 127(6): 1198–1205.
- Yang X, Guo Y, He X, Yuan J, Yang Y, Wang Z. 2008. Growth performance and immune responses in chickens after challenge with lipopolysaccharide and modulation by dietary different oils. *Animal*. 2(2): 216–223. <http://doi.org/cqhjwq>
- Yang XJ, Li WL, Feng Y, Yao JH. 2011. Effect of immune stress on growth performance, immunity, and cecal microflora in chickens. *Poultry Science*. 90(12): 2740–2746. <http://doi.org/bqbm8r>
- Virden WS, Kidd MT. 2009. Physiological stress in broilers: Ramifications on nutrient digestibility and responses. *The Journal of Applied Poultry Research*. 18(2): 338–347. <http://doi.org/fdq82m>