

## **-Total dan Diferensial Leukosit Ayam Petelur Pascavaksinasi Tetelo dan Flu Burung**

*(TOTAL AND DIFFERENTIAL LEUKOCYTES OF LAYER CHICKENS AFTER  
NEWCASTLE DISEASE AND AVIAN INFLUENZA VACCINATION)*

**Gusti Ayu Yuniati Kencana<sup>1</sup>, Anak Agung Sagung Kendran<sup>2</sup>,  
Luh Dewi Anggreni<sup>2</sup>, Ni Wayan Helpina Widyasanti<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorium Virologi Veteriner,

<sup>2</sup>Laboratorium Diagnosis Klinik dan Patologi Klinik Veteriner,

<sup>3</sup>Mahasiswa Pendidikan Dokter Hewan

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,

Jln. Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia

Telpon: 0361-223791, Email: [yuniati\\_kencana@unud.ac.id](mailto:yuniati_kencana@unud.ac.id)

### **ABSTRAK**

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui jumlah total dan differensial leukosit ayam petelur pascavaksinasi dengan vaksin kombinasi antara vaksin tetelo atau *Newcastle Disease* (ND) dan flu burung atau *Avian Influenza* (AI). Penelitian dilakukan pada peternakan ayam petelur komersial di Desa Denbatas, Kecamatan Tabanan, Kabupaten Tabanan, Bali. Sebanyak 30 ekor ayam petelur digunakan untuk sampel penelitian. Vaksinasi dilakukan dengan vaksin kombinasi ND-AI yang merupakan gabungan vaksin ND strain Lasota dengan vaksin AI subtype H5N1. Vaksin kombinasi ND-AI merupakan vaksin inaktif. Ayam divaksinasi pada umur 18 minggu yaitu menjelang masa bertelur. Vaksinasi dilakukan dengan satu dosis (0,5 mL) melalui injeksi pada otot paha. Pengambilan sampel darah ayam dilakukan sebanyak dua kali yakni dua minggu dan tiga minggu pascavaksinasi. Pemeriksaan jumlah total leukosit dilakukan dengan kamar hitung, sedangkan differensial leukosit diperiksa dari preparat hapusan darah dengan pengecatan Giemsa. Data hasil pemeriksaan total dan differensial leukosit dianalisis secara deskriptif kuantitatif. Hasil penelitian menyimpulkan bahwa ayam petelur mengalami leukopenia dan heteropenia.

Kata-kata kunci : ayam petelur; vaksin ND-AI; total dan differensial leukosit

### **ABSTRACT**

The purpose of this study was to determine total and differential leukocyte of layer chickens after vaccinated with Newcastle Disease (ND) and Avian Influenza (AI) combination vaccine. The research was conducted on commercial layer breeding in Denbatas Village, Tabanan Sub-district, Bali. This study used 30 layer samples. Vaccination was done with ND-AI combination vaccine which was a combination of ND vaccine strain Lasota with AI vaccine subtype H5N1. ND-AI combination vaccine was an inactive vaccine. Chicken was vaccinated at 18 weeks of age before laying eggs. Vaccination was done with one dose (0.5 ml) through thigh muscle injection. Chicken blood sampling was done twice ie, two weeks and three weeks after vaccination. The examination of the total leukocytes was performed by count chamber, whereas the differential leukocyte was examined from a blood smear preparation by Giemsa staining. Data of total and differential leukocyte examination were analyzed by descriptively quantitative method. The results concluded that layer has leukopenia and heteropenia which were probably caused by hormonal factors and stress due to blood collection.

Key words: layer; ND-AI vaccine; total and differential leukocyte

## PENDAHULUAN

Secara umum peternakan ayam di Indonesia seringkali terkendala oleh penyakit menular, di antaranya adalah penyakit tetelo atau *Newcastle Disease* (ND) dan flu burung atau *Avian Influenza* (AI). Kedua penyakit tersebut bersifat endemis di Indonesia. Morbiditas dan mortalitas kedua penyakit virusi ini dapat mencapai 100% (Kencana, 2012) sehingga dapat menimbulkan kerugian ekonomi yang tinggi di sektor perunggasan (Kumar *et al.*, 2008).

Penyakit virusi pada ayam tidak hanya dapat menimbulkan kerugian ekonomi, namun ada juga yang bersifat zoonosis yakni penyakit *Avian Influenza* yang di Indonesia lebih dikenal dengan sebutan Flu Burung (Kencana, 2012). Penularan penyakit AI dapat terjadi dari unggas ke manusia dan memungkinkan untuk menimbulkan masalah kesehatan di masyarakat yang cukup besar dan signifikan serta dikhawatirkan menjadi pandemi (Agunos *et al.*, 2016; Causey dan Edwards, 2008; Kim *et al.*, 2016).

Penyakit virusi tidak dapat diobati dengan antibiotik, dengan demikian tindakan pencegahan merupakan faktor utama yang harus dilakukan. Pencegahan terhadap penyakit ND dan AI dilakukan dengan vaksinasi secara teratur. Vaksinasi adalah proses pemberian antigen non virulen kepada individu dengan tujuan untuk meningkatkan derajat imunitas terhadap agen penyakit tertentu. Derajat imunitas yang merupakan respons imun awal ditandai dengan terjadinya peningkatan sel darah putih atau leukosit dalam darah yang muncul pascavaksinasi (Amer *et al.*, 2013).

Leukosit adalah sel darah putih yang memiliki peran dalam sistem pertahanan tubuh, terdiri dari eosinofil, basofil, heterofil, monosit, dan limfosit. Respons imun yang diperankan oleh leukosit sifatnya spesifik dan non spesifik. Respons imun yang spesifik diperankan oleh sel limfosit sedangkan respons imun non spesifik diperankan oleh monosit atau makrofag, eosinofil, basofil, dan heterofil. Respons imun non spesifik mampu menghadapi berbagai agen penyakit, namun tidak menunjukkan spesifisitas agen penyakit tertentu. Respon imun spesifik mampu menghasilkan spesifitas terhadap agen penyakit tertentu karena limfosit mampu memproduksi antibodi sekaligus memiliki fungsi efektor atau

sitotoksik langsung. Meskipun demikian, respons imun spesifik dan nonspesifik memiliki peran yang saling berhubungan (Hewajuli dan Dharmayanti, 2015).

Respons imun pascavaksinasi ND-AI dapat dideteksi dengan pemeriksaan titer antibodi menggunakan uji serologi hemaglutinasi dan hambatan hemaglutinasi (HA/HI) dan ELISA (Ali, 2015; Comin *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2011, Kencana *et al.*, 2016). Respons imun yang muncul pascavaksinasi adalah respons imun spesifik yang diperankan oleh limfosit (Amer *et al.*, 2013). Hasil penelitian terdahulu dengan vaksin ND-AI diperoleh titer antibodi ayam petelur pada pemeriksaan pada minggu ke-2, 3 dan 4 pascavaksinasi ND-AI mengalami peningkatan dengan titer ND tertinggi sebesar 8, 73 HI log 2 sedangkan titer AI 8.4.7 HI unit yang ditemukan pada periode tiga minggu pascavaksinasi (Kencana *et al.*, 2016). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respons ayam petelur pasca-vaksinasi dengan vaksin ND-AI yang diukur berdasarkan atas jumlah total dan differensial leukositnya.

## METODE PENELITIAN

Sebanyak 30 ekor ayam petelur dipelihara sejak umur satu hari. Ayam petelur sudah pernah divaksinasi ND dan AI pertama kali pada saat berumur satu minggu. Penelitian ini merupakan vaksinasi yang kedua (vaksinasi ulangan) yang diberikan pada umur 18 minggu yakni saat ayam menjelang bertelur. Vaksin yang digunakan adalah vaksin kombinasi ND-AI inaktif yang mengandung virus AI subtype H5N1 dan virus ND strain Lasota. Vaksinasi dilakukan pada ayam dengan injeksi vaksin sebanyak 0,5 mL/ekor secara intramuskuler melalui otot paha. Pengambilan sampel darah ayam dilakukan sebanyak 2 kali yakni dua minggu dan tiga minggu pascavaksinasi ND-AI. Pengambilan darah sebanyak 0,5 mL dilakukan melalui vena brakialis dengan menggunakan spuit 3 mL, kemudian ditampung pada tabung yang berisi antikuagulan *ethylene diamine tetra acetic acid* (EDTA). Pemeriksaan total leukosit dilakukan di Balai Besar Veteriner Denpasar, sedangkan pemeriksaan diferensial leukosit dilakukan di Laboratorium Diagnosis Klinik dan Patologi Klinik Veteriner, FKH Unud, di Denpasar.

Perhitungan jumlah total leukosit pada penelitian ini menggunakan metode yang sudah

rutin dilakukan oleh Balai Besar Veteriner Denpasar. Darah yang sudah berisi EDTA diisap dengan pipet Thoma sampai tanda 0,5 kemudian ditambahkan dengan aquades sampai tanda 11, dengan demikian terjadi pengenceran 20 kali. Perhitungan leukosit dilakukan pada kamar hitung. Lensa objektif yang digunakan adalah objektif 10 kali (10 x). Penghitungan total leukosit dilakukan dengan mengalikan jumlah leukosit yang tampak pada kamar hitung dengan 50 (Total leukosit = jumlah leukosit x 50).

Pembuatan preparat hapusan darah dilakukan dengan metode hapusan darah cepat. Darah yang sudah tercampur dengan antikoagulan diambil menggunakan pipet lalu diteteskan pada salah satu ujung dari gelas objek. Gelas penghapus diletakkan dekat dengan tetesan darah membentuk sudut 30-45<sup>o</sup> dengan gelas objek, kemudian digeser ke arah tetesan darah sehingga darah tersebar ke seluruh permukaan gelas penghapus. Dengan cepat kemudian gelas ditarik berlawanan dengan arah tadi sehingga darah akan merata di atas gelas objek sebagai lapisan tipis (Woronzoff-Dashkoff, 2002). Hapusan darah segera dikeringkan dengan cara mengangin-anginkan di udara. Preparat hapusan darah selanjutnya difiksasi dengan methanol dan diangin-anginkan selama lima menit. Setelah itu preparat dikeringkan dan dilanjutkan dengan pewarnaan Giemsa selama 25-30 menit (Petithory *et al.*, 2005). Preparat hapusan darah kemudian diperiksa di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1.000 kali untuk menentukan jumlah masing-masing sel leukosit. Hasil penghitungan jumlah total dan differensial leukosit selanjutnya dianalisis secara deskriptif kuantitatif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan pada periode dua minggu pascavaksinasi ND-AI total leukosit ayam mengalami penurunan dibandingkan dengan nilai normalnya. Total leukosit ayam normal adalah 12.000-30.000 sel/ $\mu$ L, sedangkan hasil penelitian menunjukkan total leukosit adalah sebanyak 10.855 sel/ $\mu$ L. Hasil pemeriksaan total leukosit periode tiga minggu pascavaksinasi nilainya berada pada kisaran standar normal, yakni 12.530 sel/ $\mu$ L. Hasil analisis rataan total leukosit dengan waktu pengambilan sampel darah pascavaksinasi ND-AI disajikan pada Gambar 1.

Persentase differensial leukosit dua minggu

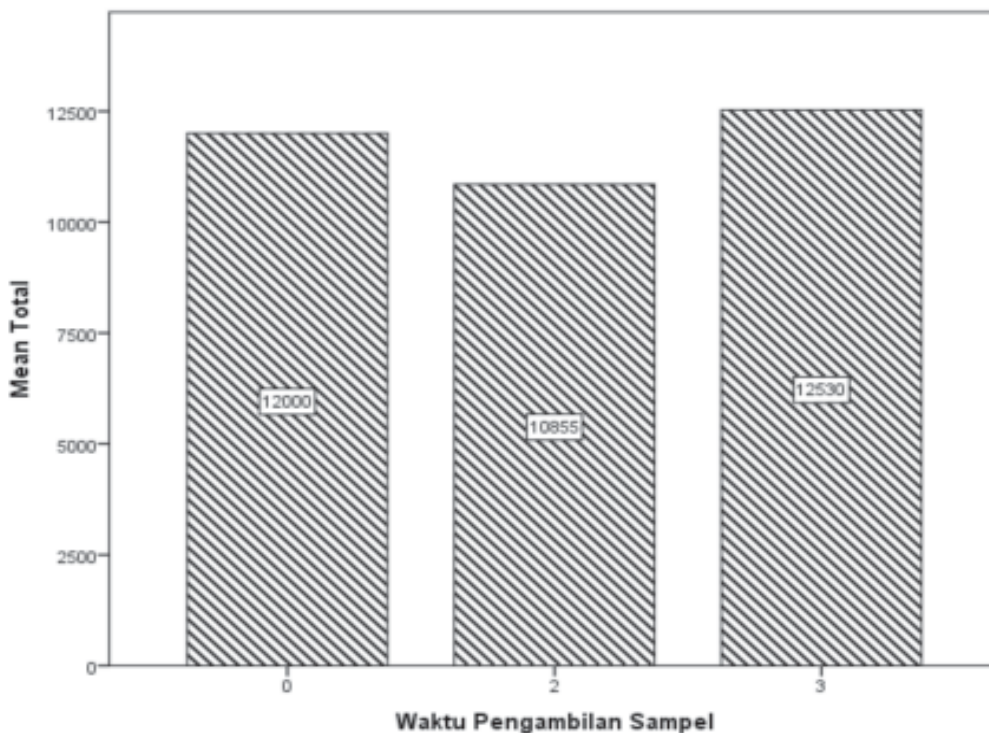
pascavaksinasi adalah sebagai berikut: limfosit 65,5%, eosinofil 0,3%, basofil 0,5%, heterofil 20,1%, dan monosit 13,6%, sedangkan persentase leukosit tiga minggu pascavaksinasi adalah limfosit 61,1%, basofil 0,1%, heterofil 26,1%, eosinofil 0,7 %, dan monosit 12%. Hasil analisis differensial leukosit periode dua dan tiga minggu pascavaksinasi ND-AI disajikan pada Gambar 2.

Hasil perhitungan total leukosit ayam dua minggu pascavaksinasi ND-AI nilainya berada di bawah standar normal. Pada kondisi normal, leukosit ayam adalah 12.000 sel/ $\mu$ L, sedangkan pada penelitian total leukosit ayam sebesar 10.855 sel/ $\mu$ L. Penurunan total leukosit diikuti dengan penurunan jumlah heterofil dengan demikian kemungkinan besar heterofil menyebabkan leukopenia. Heterofil ayam berkisar antara 3.000-6.000 sel/ $\mu$ L, sedangkan hasil penelitian menunjukkan jumlah heterofil ayam adalah sebesar 2.277,30 sel/ $\mu$ L.

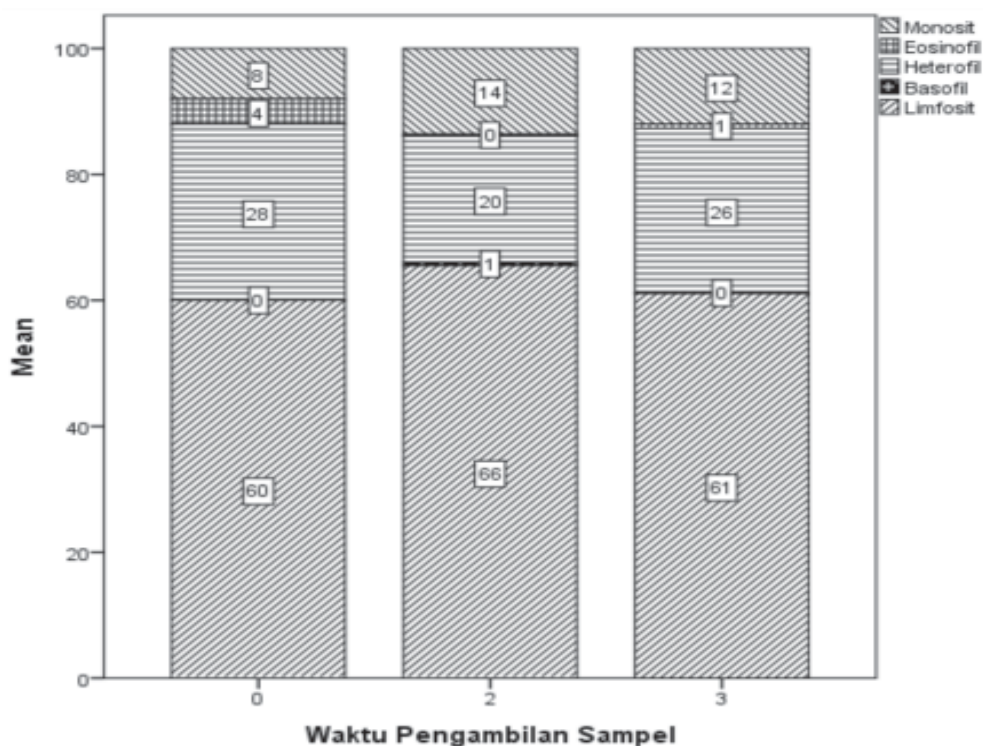
Akan tetapi, menurut Amer *et al.* (2013) leukositosis pascavaksinasi ditandai dengan peningkatan jumlah limfosit akibat adanya efek imunostimulator dari vaksin yang digunakan. Leukositosis adalah jumlah leukosit yang nilainya di atas standar normal, sedangkan limfositosis ditandai dengan meningkatnya jumlah sel limfosit dari standar normal. Limfosit merupakan sel darah yang berperan dalam respons imun spesifik yang dapat memicu pembentukan antibodi pascavaksinasi. Hal ini sesuai dengan laporan Siswanto *et al.* (2016) yang menunjukkan bahwa jumlah limfosit dan titer antibodi mengalami peningkatan pascavaksinasi ND pada ayam pedaging. Demikian juga dengan vaksinasi ND-EDS mampu menghasilkan titer antibodi protektif pada ayam petelur (Kencana *et al.*, 2017).

Beberapa faktor yang kemungkinan dapat memengaruhi penurunan total leukosit dan heterofil adalah obat-obatan (Bhatt dan Saleem, 2004; Pick dan Nystrom., 2014), infeksi mikro (McGuirk dan Peek, 2015; Santos *et al.*, 2002), pemberian hormon dan akibat stress (Whalan, 2015). Penggunaan obat-obatan jenis antibiotik dapat mengakibatkan heteropenia (Scheetz *et al.*, 2007), namun heteropenia pada penelitian ini kemungkinan tidak disebabkan oleh obat-obatan karena antibiotik tidak diberikan. Khattab *et al.* (2010) menyatakan bahwa antibiotik memiliki *withdrawal time* selama tujuh hari, sehingga residu antibiotik tidak ada pada saat pengambilan sampel.

Selain obat-obatan, kemungkinan lain yang



Gambar 1. Hubungan nilai total leukosit pascavaksinasi ND-AI dengan waktu pengambilan darah (0= total leukosit ayam normal, 2 = dua minggu pascavaksinasi, 3= tiga minggu pascavaksinasi).



Gambar 2. Hubungan nilai differensial leukosit pascavaksinasi ND-AI dengan waktu pengambilan darah (0=diferensial leukosit ayam normal, 2 = dua minggu pascavaksinasi, 3= tiga minggu pascavaksinasi).



dapat menyebabkan heteropenia adalah infeksi mikroorganisme. Mikroorganisme yang umum ditemukan pada peternakan unggas dan dapat menyebabkan heteropenia adalah *Salmonella* (CFSPH, 2013; Mc Guirk dan Peek, 2015; Santos *et al.*, 2002). Akan tetapi pada penelitian ini ayam petelur yang diteliti tidak menunjukkan tanda-tanda klinis *Salmonellosis*, dengan demikian, kemungkinan besar ayam tidak terinfeksi mikroorganisme.

Pada penelitian ini ayam petelur berumur 18 minggu dan sudah mulai berproduksi. Pada masa estrus ayam akan mengalami peningkatan hormon estrogen (Christensen *et al.*, 2013) yang dapat menyebabkan leukopenia (Whalan, 2015). Berdasarkan pemaparan di atas, kemungkinan leukopenia ayam pada penelitian disebabkan oleh pengaruh hormon.

*Handling* yang dilakukan saat pengambilan darah kemungkinan menjadi penyebab stres pada ayam. Menurut Clauer (2009) stres akibat *handling* dapat menjadi salah satu penyebab penurunan produksi telur. Hal tersebut didukung oleh adanya penurunan produksi telur pasca pengambilan sampel darah. Selain itu, kehadiran orang baru di kandang dapat menjadi pemicu stres pada ayam.

Total leukosit akibat stres tergantung dari perbandingan jumlah heterofil dan limfosit. Pada spesies yang memiliki jumlah limfosit lebih tinggi dari jumlah heterofilnya akan mengalami leukopenia, limfopenia dan heterofilia, sedangkan pada spesies hewan yang memiliki jumlah heterofil lebih tinggi dibandingkan dengan limfositnya akan mengalami leukositosis, limfopenia, dan heterofilia (Whalan, 2015). Stres pada ayam akan meningkatkan kortikosteroid yang bersifat immunosupresif. Kortikosteroid menyebabkan terjadinya leukopenia pada satu jam pertama dan pada 4-12 jam pemberian yang menyebabkan leukositosis (Davidson dan Flack., 1981). Jadi kemungkinan ayam pada penelitian ini mengalami leukopenia akibat stres yang timbul saat dilakukan pengambilan darah.

## SIMPULAN

Disimpulkan bahwa hasil pemeriksaan total dan differensial leukosit periode dua minggu pascavaksinasi ND-AI menunjukkan ayam mengalami leukopenia dan heteropenia.

## SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang respons imun ayam petelur pascavaksinasi ND-AI. Penelitian tersebut akan menghasilkan titer antibodi ND dan AI sehingga hasilnya menjadi lebih akurat jika dibandingkan dengan hasil pemeriksaan total dan differensial leukositnya.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada PT. Sanbio Laboratories beserta mitranya atas fasilitas dan kerjasama penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agunos A, Pierson FW, Lungu B, Dunn PA, Tablante N. 2016. Review of Nonfoodborne Zoonotic and Potentially Zoonotic Poultry Diseases. *Avian Dis* 60(3): 553-75.
- Ali HH. 2015. Study Serologic Status Of Newcastle Disease in Broilers Chikens by Haemagglutination Inhibition Test in Suliamania Province. *Global Journal of Bio-Science and Biotechnology* 4(4) : 364-369.
- Amer MM, Sherein SA, Abeer AAE. 2013. *Evaluation of Some Avian Influenza Vaccines on Comercial Layer Chicks*. The International Scientific Conference of Pathology Department, Sheraton Dreamland Conference Center, Sheraton Dream Land, Egypt., Pp. 60–78. <http://scholar.cu.edu.eg/?q=sherein-saeid-abdelgayed/publications/evaluation-some-avian-influenza-vaccines-commercial-layer-chic> 19<sup>th</sup> Juni 2017.
- Bhatt V, Saleem A. 2004. Drug-Induced Neutropenia – Pathophysiology, Clinical Features, and Management. *Ann Clin Lab Sci Spring* 34(2): 131-137.
- Causey D, Edwards SV. 2008. Ecology of Avian Influenza Virus in Birds. *The Journal of Infectious Diseases* 197: S29-S33.
- (CFSPH) The Center for Food Security and Public Health. 2013. *Salmonellosis*. College of Veterinary Medicine, IOWA State

- University. [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/nontyphoidal\\_salmonellosis.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/nontyphoidal_salmonellosis.pdf). Accessed on 6<sup>th</sup> March 2017.
- Christensen A, Bentley GE, Cabrera R, Ortega HH, Perfito N, Wu TJ, Micevych P. 2012. Hormonal regulation of female reproduction. *Horm Metab Res* 44(8): 587-591.
- Clauer PJ. 2009. *Why Have My Hens Stopped Laying?*, *Poultry Extension Specialist, Animal and Poultry Sciences*. Virginia Polytechnic Institute and State University. [https://www.pubs.ext.vt.edu/content/dam/pubs\\_ext\\_vt.edu/2902/2902-1097/2902-1097.pdf](https://www.pubs.ext.vt.edu/content/dam/pubs_ext_vt.edu/2902/2902-1097/2902-1097.pdf). Accessed on 16<sup>th</sup> June 2017.
- Comin A, Toft N, Stegeman A, Klinkenberg D, Marangon S. 2013. Serological Diagnosis of Avian Influenza in Poultry: Is the haemagglutination inhibition test really the 'gold standard'? *Influenza Other Respir Viruses* 7(3): 257-264.
- Davison TF, Flack IH. 1981. Changes in The Peripheral Blood Leucocyte Populations Following an Injection of Corticotrophin in The Immature Chicken. *Rest Vet Sci* 30(1): 79-82.
- Hewajuli DA, Dharmayanti NLPI. 2015. Peran Sistem Kekebalan Non-spesifik dan Spesifik pada Unggas terhadap Newcastle Disease. *Wartazoa* 25(3): 135-146.
- Kencana GAY. 2012. *Penyakit Virus Unggas*. Cetakan 1. Denpasar. Udayana University Press.
- Kencana GAY, Suartha IN, Ayu Sintya Paramitha NM, Handayani AN. 2016. Vaksin Kombinasi Newcastle Disease dengan Avian Influenza Memacu Imunitas Protektif pada Ayam Petelur terhadap Penyakit Tetelo dan Flu Burung. *J Veteriner* 17(2): 257-264.
- Kencana GAY, Suartha IN, Nainggolan DRB, Tobing ASL. 2017. Respons Imun Ayam Petelur Pascavaksinasi Newcastle Disease dan Egg Drop Syndrome. *Jurnal Sain Veteriner* 35(1).
- Khattab WO, Elderea HB, Salem EG, Gomaa NF. 2010. Transmission of Administered Amoxicillin Drug Residues from Laying Chicken to their Commercial Eggs. *J Egypt Public Health Assoc.* 85(5-6): 297-316.
- Kim SM, Kim YI, Pascua PN, Choi YK. 2016. Avian Influenza A Viruses: Evolution and Zoonotic Infection. *Semin Respir Crit Care Med* 37(4): 501-11
- Kumar BG, Joshi PK, Datta KK, Singh SB. 2008. An Assessment of Economic Losses due to Avian Flu in Manipur State. *Agricultural Economics Research Review* 21: 37-47.
- Petithory JC, Ardoin F, and Ash LR. 2005. Rapid and Inexpensive Method of Diluting Giemsa Stain for Diagnosis of Malaria and Other Infestations by Blood Parasites. *J Clin Microbiol* 43(1): 528.
- Pick AM, Nystrom KK. 2014. Nonchemotherapy Drug-Induced Neutropenia and Agranulocytosis: Could Medications be the Culprit? *Journal of Pharmacy Practice* 27(5): 447-452.
- Mcguirk SM, Peek S. 2003. *Solving Calf Morbidity And Mortality Problems*. Preconvention Seminar 7: Dairy Herd Problem Investigation Strategies American Association Of Bovine Practitioners 36th Annual Conference September 15-17. Columbus, OH. <https://www.vetmed.wisc.edu/dms/fapm/fapmtools/8calf/Calfmorbidity.pdf>. Accessed On 16<sup>th</sup> June 2017.
- Santos, Tsolis RM, Baumler AJ, Adams LG. 2002. Hematologic and serum biochemical changes in Salmonella ser Typhimurium-infected calves Renato L. *Am J Vet Res* 63: 1145-1150.
- Scheetz MH, McKoy JM, Parada JP, Djulbegovic B, Raisch DW, Yarnold PR, Zagory J, Trifilio S, Jakiche R, Palella F, Kahn A, Chandler K, Bennett CL. 2007. Systematic Review of Piperacillin-Induced Neutropenia. *Drug Safety* 30 (4): 295-306.
- Siswanto, Sulabda IN, Soma IG. 2016. Titer Antibodi dan Hitung Jenis Leukosit Ayam Potong Jantan Pasca Vaksinasi Virus Newcastle Disease. *Indonesia Medicus Veterinus* 5(1): 89-95
- Whalan JE. 2015. *A Toxicologist's Guide to Clinical Pathology in Animals: Hematology, Clinical Chemistry, Urinalysis*. 1<sup>st</sup> Edition. Switzerland: Springer International Publishing.
- Woronzoff-Dashkoff KK 2002. The Wrightgiemsa Stain: Secrets Revealed. *Journal of Clinics In Laboratory Medicine* 22: 15-23.
- Yang M, Clavijo A, Pasick J, Salo T, Wang Z, Zhao Y, Zheng D, Berhane Y. 2011. Serologic detection of Avian influenza H5 antibodies using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health* 3(4): 56-61.