

Respons Kekebalan Ayam IPB D1 yang Memiliki Gen TLR4 terhadap Infeksi Bakteri *Salmonella enteritidis*

(IMMUNE RESPONSE OF IPB D1 CHICKENS WITH TLR4 GENES AGAINST SALMONELLA ENTERITIDIS BACTERIAL INFECTION)

Fitria Susanti¹, Sri Murtini², I Wayan Teguh Wibawan²

¹Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor
Babakan, Dramaga, Bogor, Jawa Barat. Indonesia 16680

²Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner,
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor,
Jl. Agatis, Kampus IPB, Dramaga, Bogor Jawa Barat, 16680, Indonesia.
Telp. 0251-8625656; E-mail: fitriamri@yahoo.com

ABSTRAK

Ayam IPB D1 merupakan hasil persilangan antara ayam pelung, sentul, kampung dan broiler. Persilangan ayam ini dilakukan oleh para peneliti dari Fakultas Peternakan-Institut Pertanian Bogor dengan tujuan mendapatkan galur ayam pedaging yang dikembangkan oleh masyarakat dengan sistem pemeliharaan tradisional yaitu dengan cara diumbar (*back yard*). Salah satu penyakit bakterial yang umumnya menyerang unggas adalah *Salmonellosis*, oleh sebab itu dilakukan penelitian untuk mengetahui ketahanan ayam IPB D1 ini terhadap agen penyakit *Salmonellosis* dengan menggunakan penciri genetik gen TLR4 (*Toll-Like Receptor 4*). Gen TLR4 merupakan salah satu gen yang mengontrol ketahanan ayam terhadap infeksi bakteri Gram negatif salah satunya *Salmonella enteritidis*, melalui respon imun *non-specific*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui ketahanan ayam IPB D1 yang memiliki gen TLR4 terhadap infeksi *S. enteritidis*. Total sampel yang digunakan adalah sebanyak 11 ekor. Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan pengujian keberadaan gen TLR4 dengan uji *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan sekuensing serta pengamatan respon kekebalannya melalui pemeriksaan jumlah leukosit, diferensial leukosit serta gambaran umum darahnya dan kemampuan kekebalannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. enteritidis* pada saat sebelum maupun setelah ditantang dengan bakteri *S. enteritidis*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ayam IPB D1 yang memiliki gen TLR4 (genotipe GG dan AG) memiliki ketahanan terhadap bakteri *S. enteritidis*, yang juga merupakan bakteri zoonotik yang lazim ditemukan pada ayam broiler, berdasarkan gambaran leukosit dan darahnya secara umum. Secara *in vitro* sistem kekebalan humoral ayam IPB D1 mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. enteritidis* melalui uji *clearance*.

Kata-kata kunci: ayam IPB D1; Gen TLR4; respons imun *non-specific*; *Salmonella enteritidis*

ABSTRACT

Faculty of Animal Science, IPB University has developed new trait of chicken named IPB D1 traits. The chicken is a crossbreed chicken between male F1 PS (Pelung x Sentul) with F1 female (Kampung x parent stock Cobb). The IPB D1 chickens aims to produce the local commercial meat type, which adapted to traditional or semi intensive management (*back yard*). *Salmonellosis* is one of the bacterial disease that commonly infected poultry, therefore a study was conducted to determine the immune response of IPB D1 chickens to these disease using genetic markers, namely TLR4 gene (*Toll-Like Receptor 4*). TLR4 gene is one of the genes that control chicken resistance to Gram negative bacteria infection, through non-specific immune responses, one of Gram negative bacteria is *Salmonella enteritidis*. The aim of this study was to determine of TLR4 gene and their role in immunity of IPB D1 chickens against *S. enteritidis* infection. As much as 11 chickens were use in this study. This research was carried out through several stages of i.e determination of the TLR4 gene by PCR and sequencing and observing its immune response through the number of leukocyte, leukocyte differentiation and other hematology profile. Humoral immunity response against *S. enteritidis* were observe by clearance test before and after challenged with *S. enteritidis*. The results of this study indicate that IPB D1 chickens which have TLR4 genes (genotype GG and AG) were resistance against *S. enteritidis* based on the leukocyte, hematology profile and humoral immunity.

Keywords: IPB D1 chickens; TLR4 Gene; non-specific immune response; *Salmonella enteritidis*.

PENDAHULUAN

Ayam lokal memiliki peran penting bagi masyarakat pedesaan karena umumnya ayam ini dipelihara sebagai sumber untuk mendapatkan daging, telur maupun sebagai tabungan yang sewaktu-waktu dapat dijual. Indonesia diketahui merupakan salah satu pusat keanekaragaman genetik ayam lokal di dunia. Populasi ayam lokal tahun 2014-2017 mengalami peningkatan yang rendah yaitu sebesar 8,2% (Ditjennak 2018).

Ayam IPB D1 merupakan hasil persilangan antara ayam pelung, sentul, kampung dan *broiler*. Persilangan ayam ini dilakukan oleh peneliti dari Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor dengan tujuan produksi yakni sebagai ayam pedaging. Ayam tersebut kelak akan dikembangkan di masyarakat dengan sistem pemeliharaan secara tradisional yaitu dengan cara diumbar (*backyard farming*). Ayam IPB D1 memiliki karakter pertumbuhan bobot badan dan jumlah telur yang lebih banyak dibandingkan ayam kampung dan lebih tahan terhadap penyakit dibandingkan dengan ayam ras. Keunggulan yang dimiliki ayam IPB D1 karena secara genetik merupakan ayam komposit dengan keragaman gen yang bervariasi dari masing-masing indukannya (Sumantri dan Darwati, 2017).

Ayam IPB D1 yang digunakan dalam penelitian ini merupakan ayam generasi keenam sehingga diharapkan hasil penelitian ini akan mendukung seleksi kinerja ketahanan ayam IPB D1 terhadap penyakit, sebelum dilepas ke masyarakat. Salah satu penyakit pada ayam yang sering menyerang adalah *Salmonellosis*. Bakteri *Salmonella sp.* merupakan salah satu agen penyakit yang dapat menyebar melalui makanan (*foodborne disease*). Gustavsson *et al.* (2015) menyatakan bahwa *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*Salmonella enteritidis*) merupakan serotipe utama penyebab wabah *non-typhoid Salmonellosis* pada manusia, yang dapat menyebabkan gastroenteritis. *Salmonella enteritidis* dilaporkan oleh Lu *et al.* (2003) dapat mencemari telur sebelum dikeluarkan dari tubuh ayam karena serotipe tersebut dapat mengkolonisasi saluran reproduksi unggas. *Salmonella enteritidis* dapat pula diisolasi dari karkas ayam *broiler* dan merupakan bakteri zoonosis yang semakin penting bagi kesehatan masyarakat (Altekruse *et al.*, 2006).

Sistem ketahanan tubuh terdiri dari

berbagai komponen yaitu komponen genetik, molekuler dan seluler yang saling berinteraksi membentuk jaringan komunikasi yang rumit dan luas. Sebagai komponen genetik, sistem ketahanan tubuh dikontrol oleh banyak gen. Salah satu gen yang berperan dalam respons imun non spesifik atau imun bawaan (*innate immunity*) adalah *Toll Like Receptor/TLR*. Sistem imun non spesifik merupakan pertahanan terdepan dalam menghadapi agen infeksi dan dapat memberikan respons langsung terhadap agen infeksi tersebut (Wibawan dan Soejoedono, 2013).

Salah satu anggota dari gen TLR adalah TLR4, yang mentranskripsi reseptor TLR4. Ligan dari reseptor TLR4 adalah lipopolisakarida (LPS) yang merupakan dinding sel bakteri Gram negatif, salah satunya yaitu *Salmonella sp.* (Akashi *et al.*, 2001). Lipopolisakarida merupakan endotoksin dari bakteri *Salmonella sp.* yang menyebabkan inflamasi atau peradangan jika bakteri ini berhasil menginfeksi inangnya. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan mengetahui respons kekebalan ayam IPB D1 terhadap *Salmonella enteritidis* berdasarkan karakter gen TLR4 nya. Diharapkan hasil penelitian ini dapat digunakan untuk melakukan seleksi ketahanan terhadap *Salmonella enteritidis* berdasarkan karakter gen TLR4 nya.

METODE PENELITIAN

Deteksi Gen TLR4

Keberadaan gen TLR4 ayam IPB D1 dideteksi melalui PCR dan dilanjutkan dengan sekuensing gen hasil PCR. Sampel darah dari 11 ekor ayam diambil melalui vena brachialis sebanyak 2 mL, diekstraksi DNA-nya menggunakan metode *phenol-chloroform* (Sambrook dan Russel, 2001). Amplifikasi DNA dilakukan pada total volume 25 μ L, proses amplifikasi ini menggunakan *GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystem*. Senyawa DNA yang telah diekstraksi diamplifikasi gen TLR4 menggunakan desain primer sebagai berikut: primer *forward* (F): 5¹-GCT CAA ATT ATT TTT CAT CAG TGG CC-3¹ dan primer *reverse* (R): 5¹-ATC TGG ACT GAA AGC TGC AC-3¹ dengan target ampikon 220 bp (Ulupi *et al.*, 2014). Produk PCR dielektroforesis menggunakan gel agarose 1,5%. Sampel yang positif pada uji PCR dengan target gen TLR4 disekuensing dengan mengirim produk PCR pada lembaga jasa sekuensing 1st Base, Malaysia. Hasil sekuensing

yang diperoleh kemudian diedit menggunakan *software* FinchTV dan BioEdit (Hall 2011).

Percobaan Uji Tantang

Sebanyak 11 ekor ayam IPB D1 umur 10 minggu yang diperoleh dari Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor, dipelihara dalam kandang dengan sistem *litter*. Setiap ayam diberi nomor identitas pada bagian sayap. Jenis pakan yang diberikan adalah pakan komersial untuk ayam *broiler*. Pakan dan air minum diberikan secara *ad libitum*. Kandang dilengkapi lampu penerang dari jam 17.00-07.00 WIB. Aklimatisasi ayam dilakukan selama tiga minggu dan kesehatan ayam dipantau setiap hari.

Uji tantang menggunakan koleksi isolat bakteri *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 yang diperoleh dari Laboratorium Terpadu Ilmu Penyakit Hewan dan Kesmavet, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor (Arnafia *et al.*, 2017). Isolat bakteri dibuat suspensi dengan NaCl fisiologis, suspensi disamakan dengan Larutan Standar McFarland 1 (setara dengan $3,0 \times 10^8$ CFU/mL), kemudian dilakukan pengenceran bertingkat sampai setara dengan $3,0 \times 10^5$ CFU/mL.

Uji tantang dilakukan dengan cara menginfeksi ayam IPB D1 dengan *Salmonella enteritidis* melalui pencekokan, dosis 10^5 CFU/mL (Harvey *et al.*, 2007). Setiap ayam diinfeksi dengan suspensi bakteri 1 mL/ekor per oral menggunakan *syringe*-tanpa jarum/*needle* ukuran 1 mL.

Pengujian Aspek Ketahanan Tubuh Ayam IPB D1

Pengujian aspek ketahanan dilakukan pada ayam IPB D1 melalui pengamatan terhadap profil leukosit (konsentrasi leukosit dan diferensiasinya yaitu heterofil, monosit, dan limfosit) dan gambaran umum darah (jumlah eritrosit, hemoglobin/Hb dan hematokrit/*Packed Cell Volume*/PCV) menurut Sastradipradja *et al.* (1989) serta uji *clearance* sebelum dan setelah infeksi tantang dengan *Salmonella enteritidis* melalui pencekokan, dosis 10^5 CFU/mL (Harvey *et al.*, 2007).

Pengujian Profil Leukosit dan Diferensiasinya serta Gambaran Umum Darah

Sampel darah ayam diambil dari vena brachialis sebanyak 1,5-2,0 mL, kemudian dimasukkan kedalam tabung yang mengandung antikoagulan EDTA (*Ethylenediamine tetra*

traacetic Acid) dan dihomogenkan kemudian dibawa ke Laboratorium Fisiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, dalam kondisi dingin. Penghitungan jumlah leukosit dan eritrosit per mL dilakukan di bawah mikroskop cahaya pembesaran 100 kali menggunakan hemositometer (kamar hitung Neubeur). Diferensiasi leukosit (heterofil, monosit dan limfosit) dihitung dengan cara membuat preparat ulas pada gelas objek. Preparat ulas diamati dengan mikroskop pada pembesaran 1.000 kali, dengan bantuan minyak emersi (Sastradipradja *et al.*, 1989).

Uji Clearance

Uji *clearance* merupakan metode untuk mengukur kemampuan antibodi dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella*. Uji *clearance* ini dilakukan dua kali yakni sebelum ditantang dan setelah ditantang dengan bakteri *Salmonella enteritidis* melalui pencekokan, dosis 10^5 CFU/mL (Harvey *et al.*, 2007).

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam atau *analysis of variance* (Anova), dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Hasil penelitian menggunakan RAL ini kemudian dianalisis untuk mengetahui hubungan antara: 1) Gen TLR4 dengan profil leukosit dan gambaran umum darah ayam IPB D1 dan 2) Gen TLR4 dengan uji *clearance* ayam IPB D1.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Genotipe Gen TLR4 pada Ayam IPB D1

Hasil Identifikasi gen TLR4 ayam IPB D1 menunjukkan adanya produk PCR dengan ukuran 220 bp (Gambar 1). Produk PCR hasil amplifikasi ini memiliki ukuran produk PCR yang sama dengan yang diperoleh oleh Ulupi *et al.* (2014) yang mengidentifikasi gen TLR4 dari ayam kampung. Hal ini kemungkinan karena ayam IPB D1 sebagian besar merupakan persilangan dari ayam lokal Indonesia (ayam pelung, ayam sentul dan ayam kampung) dengan *broiler* sehingga hasil amplifikasi gennya memiliki ukuran yang sama.

Profil Leukosit dan Diferensiasinya serta Gambaran Umum Darah

Hasil pengamatan jumlah leukosit ayam IPB D1 sebelum dan setelah infeksi tantang

dengan *Salmonella enteritidis* pada ayam dengan TLR4 positif (GG dan GA) masih dalam jumlah normal yaitu $12,52-14,56 \times 10^3$ sel/mL sebelum infeksi dan $19,88-18,25 \times 10^3$ sel/mL setelah infeksi. Berbeda dengan ayam IPB D1 genotipe AA yang merupakan TLR4 negatif, memiliki nilai jumlah leukosit lebih rendah dari normal yakni sebelum infeksi ($8,4 \times 10^3$ sel/mL) dan meningkat hampir dua kali lipat setelah infeksi (15×10^3 sel/mL). Nilai konsentrasi leukosit normal ayam menurut Lokapirnasari *et al.* (2016) adalah $13-32 \times 10^3$ sel/mL. Konsentrasi leukosit ayam IPB D1 dengan TLR4 positif sebelum dan setelah ujiantang tidak berbeda nyata ($P > 0,05$), sedangkan ayam TLR4 negatif meningkat secara tajam. Secara umum konsentrasi leukosit ayam IPB D1 masih berada dalam kisaran normal, kecuali pada ayam TLR4 bergenotipe AA sebelum dilakukan ujiantang menunjukkan konsentrasi yang lebih rendah, hal ini kemungkinan ayam tersebut dalam masa adaptasi di lingkungan yang baru. Peningkatan jumlah leukosit meningkat dalam batas normal setelah dilakukan ujiantang. Kondisi ini menunjukkan bahwa ayam IPB D1 memiliki ketahanan tubuh terhadap cekaman penyakit setelah ujiantang dengan bakteri *Salmonella enteritidis*. Leukosit atau sel darah putih merupakan unsur seluler dari darah dan bagian dari sistem imunitas tubuh yang mampu bergerak aktif.

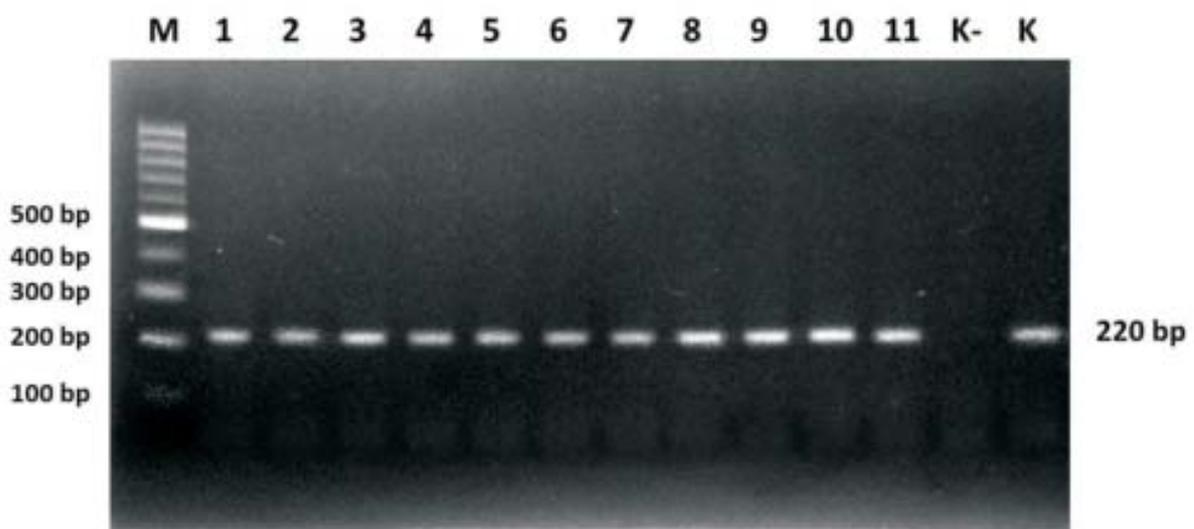
Peningkatan jumlah leukosit setelah infeksi *Salmonella enteritidis* pada penelitian ini menunjukkan hasil yang sama seperti dilaporkan oleh Matulova *et al.* (2012), pada ayam

yang diinfeksi *Salmonella enteritidis* 4-14 hari meningkat jumlah leukositnya yang diikuti peningkatan berbagai sitokin di antaranya adalah interleukin dan interferon gamma. Peningkatan kedua sitokin ini penting untuk ketahanan tubuh terhadap infeksi *Salmonella enteritidis* (Matulova *et al.*, 2012).

Berdasarkan morfologinya leukosit terbagi menjadi dua yaitu yang memiliki granula (granulosit) dan yang tidak memiliki granula (agranulosit). Leukosit yang bergranula terdiri atas heterofil, eosinofil dan basofil. Leukosit yang tidak bergranula yaitu monosit dan limfosit. Pada penelitian ini jenis leukosit yang teramati adalah limfosit, monosit dan heterofil, sedangkan eosinofil dan basofil tidak teramati. Kisaran persentase normal heterofil, limfosit dan monosit dan H/L secara berurutan adalah; 20-40% (Hendro *et al.*, 2013), 63-73%, 2-8% dan 0,45-0,5% (Turcul *et al.*, 2011).

Persentase heterofil, limfosit dan monosit yang teramati pada ketiga genotipe ayam IPB D1 masing-masing yaitu 25,83-45,0%, 48,08-70,17% dan 4,0-6,2% sebelum ujiantang, hal ini menunjukkan bahwa heterofil ayam IPB D1 masih berada dalam batas normal. Persentase heterofil, limfosit dan monosit yang teramati pada penelitian ini hampir sama dengan pengamatan Ulupi *et al.* (2014) pada ayam kampung umur delapan bulan yaitu 42,79-48,93%; 44,47-50,00% dan 5,07-5,79%.

Nilai H/L ayam IPB D1 genotipe GG dan AA pada saat sebelum tantang memiliki nilai dibawah 0,5, kondisi ini menunjukkan bahwa ayam dalam kondisi tidak stres. Namun, setelah



Gambar 1. Hasil visualisasi polymerase chain reaction/PCR TLR4 pada gel agarose 1,5%, M; Marker 100 bp, 1- 11; Sampel Ayam IPB D1. K-; kontrol negatif, K; kontrol positif

ujiantang ditemukan semua kelompok memiliki nilai rasio H/L lebih dari 0,5 (Tabel 1), hal ini menunjukkan bahwa ayam mengalami stres akibat adanya infeksi *Salmonella enteritidis*, seperti yang dinyatakan oleh Kaab *et al.* (2018) bahwa ayam yang diberikan antigen virus penyakit tetelo atau (*Newcastle Disease Virus/NDV*) intraocular, nilai rasio H/L meningkat lebih dari dua kali dibandingkan dengan saat belum diberi antigen NDV.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa jumlah eritrosit ayam IPB D1 tidak memiliki perbedaan signifikan antara sebelum dan setelah ujiantang. Ayam IPB D1 yang digunakan dalam penelitian ini telah berumur tiga bulan dengan jumlah eritrosit setelah infeksi *Salmonella enteritidis* berkisar antara 1,90-1,97 x 10⁶ mL⁻¹. Hasil ini lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Alfian *et al.* (2017) pada ayam bangkok, ayam kampung dan ayam peranakan yakni masing-masing 3,56; 3,70; dan 3,94 x 10⁶ mL⁻¹ dengan umur ayam berkisar antara 10-15

bulan. Kisaran normal eritrosit ayam *broiler* menurut Parwati *et al.* (2017) yaitu 2,69-2,96 x 10⁶ mL⁻¹. Kisaran eritrosit ayam buras super umur 12 minggu yakni 2,19-2,58 x 10⁶ mL⁻¹ (Abdullah *et al.*, 2018). Rendahnya jumlah eritrosit diduga karena adanya infeksi sehingga ayam mengalami stres sesuai dengan pengamatan Alfian *et al.* (2017) yang menyatakan bahwa ayam umur 18 minggu yang mengalami stres akibat suhu yang tinggi memiliki jumlah eritrosit rendah yaitu 1,78-1,93 x 10⁶ mL⁻¹. Jumlah eritrosit dipengaruhi oleh bangsa dan jenis ternak, jenis kelamin, aktivitas fisik, pakan, umur, pola pemeliharaan, temperatur lingkungan, stres, ketinggian dan faktor iklim lainnya. Kadar hemoglobin ayam IPB D1 berkisar antara 7,25-8,03 g%, kisaran ini sama dengan hasil yang dilaporkan oleh Wahyuni *et al.* (2012), yang menyatakan bahwa kisaran normal hemoglobin unggas adalah 6,50-9,0 g%. Kisaran hemoglobin ayam *broiler* umur empat minggu menurut Parwati *et al.* (2017) yakni 8,30-10,99 g%.

Tabel 1. Gambaran darah ayam IPB D1 dengan penciri genetik gen TLR4 sebelum dan setelah pelaksanaan ujiantang dengan *Salmonella enteritidis*

Peubah	TLR4 Genotipe AG (n=4)		TLR4 Genotipe GG (n=6)		TLR4 Genotipe AA* (n=1)		Kisaran Normal
	Sebelum tantang	Setelah tantang	Sebelum tantang	Setelah tantang	Sebelum tantang	Setelah tantang	
Leukosit (10 ³ sel/mL)	14,28 ± 5,48 ^a	18,25 ± 8,01 ^a	11,83 ± 11,39 ^a	18,29 ± 7,50 ^a	8,40	15,00	13,00-32,00 ^{iv}
Diferensiasi Leukosit :							
Limfosit (%)	48,80 ± 17,60 ^a	52,50 ± 19,71 ^a	70,17 ± 12,89 ^a	53,36 ± 8,78 ^b	84,00	54,50	63,00-73,00 ⁱⁱⁱ
Monosit (%)	6,20 ± 2,05 ^a	6,13 ± 2,02 ^a	4,00 ± 2,53 ^a	6,79 ± 1,08 ^b	1,00	7,00	2,00-8,00 ^{iv}
Heterofil (%)	45,00 ± 18,06 ^a	41,00 ± 19,47 ^a	25,83 ± 14,02 ^a	39,86 ± 8,83 ^a	15,00	38,50	20,00-40,00 ^{iv}
H/L (%)	1,08 ± 0,58 ^a	1,02 ± 0,85 ^a	0,42 ± 0,35 ^a	0,81 ± 0,32 ^a	0,18	0,71	0,45-0,50 ^v
Eritrosit (10 ⁶ sel/mL)	1,79 ± 0,06 ^a	1,97 ± 0,27 ^a	1,95 ± 0,38 ^a	1,91 ± 0,21 ^a	1,91	1,92	2,69-2,96 ⁱ
Hb (%)	7,76 ± 1,54 ^a	7,25 ± 0,31 ^a	8,03 ± 0,98 ^a	7,34 ± 0,72 ^a	7,80	7,90	6,50-9,00 ⁱⁱ
Hematokrit / PCV (%)	22,80 ± 2,47 ^a	23,91 ± 2,61 ^a	22,40 ± 2,73 ^a	24,16 ± 5,04 ^a	23,00	25,05	24,00-43,00 ⁱ

Ket; * Genotipe AA tidak disertakan dalam pengujian secara statistik, n: jumlah sampel, Angka-angka pada kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5% (Uji lanjut Tukey). H/L: Heterofil/Limfosit; ⁱParwati *et al.*, 2017; ⁱⁱWahyuni *et al.*, 2012; ⁱⁱⁱLokapirnasari *et al.*, 2016; ^{iv}Hendro *et al.*, 2013; ^vTurcul *et al.*, 2011.

Nilai hematokrit dipengaruhi oleh jumlah dan ukuran sel darah merah. Tingginya nilai hematokrit sebanding dengan kadar hemoglobin dan jumlah eritrosit (Herawati 2006). Nilai hematokrit ayam IPB D1 berkisar antara 22,40-24,16 %. Nilai hematokrit ini lebih rendah dari hasil yang disampaikan oleh Parwati *et al.* (2017) yaitu 23,01-27,40%. Rendahnya nilai hematokrit ini karena rata-rata jumlah eritrosit yang lebih rendah dari kisaran normal akibat stres. Alfian *et al.* (2017) menyatakan ayam yang mengalami kondisi yang tidak nyaman (stres, panas dan lembap) memiliki eritrosit yang lebih rendah.

Uji Clearance

Pengujian ketahanan tubuh ayam IPB D1 secara *in vitro* pada penelitian ini menggunakan uji *clearance*. Hasil uji *clearance* ayam IPB D1 pada genotipe AG dan GG sebelum ujiantang yaitu antara 94,50-99,27%, setelah ujiantang didapatkan hasil uji *clearance* 99,98-99,99% (pada genotipe AG dan GG). Hasil uji *clearance* pada genotipe AA tidak dilakukan. Pada Tabel 2 disajikan jumlah bakteri yang bisa dimatikan tidak berbeda nyata secara statistika ($P>0,05$), sebelum dilakukan ujiantang maupun setelah dilakukan ujiantang. Hal ini menunjukkan bahwa individu ayam IPB D1 memiliki kemampuan untuk membunuh bakteri *Salmonella enteritidis*. Kematian bakteri pada pengujian *clearance* disebabkan oleh proses fagositosis yang diperantarai oleh heterofil dan juga antibodi yang terdapat dalam serum darah dan peranan dari gen TLR4 sebagai kekebalan non spesifik yang mampu mengenali ligan lipopolisakarida pada bakteri Gram negatif, salah satunya yaitu *Salmonella enteritidis*.

Proses penghancuran mikroorganisme atau benda asing dilakukan pada proses fagositosis. Dimulai dari proses kemotaksis yaitu gerakan

fagosit ke tempat infeksi. Kemudian adhesi yang merupakan proses perlekatan membran plasma fagosit. Fagosit akan membentuk tonjolan pseudopodia pada membran plasmanya, kemudian membentuk kantung yang mengelilingi bakteri pada saat dimakan. Bakteri kemudian akan terkurung dalam kantung yang disebut fagosom. Fagosom terdiri dari atas dinding bagian luar fagosit. Fagosom masuk kedalam sitoplasma dan bergabung dengan lisosom membentuk suatu struktur yang disebut fagolisosom. Lisosom akan menyumbangkan lisozim yang akan memecah dinding sel mikroba, dan enzim digesti lainnya akan mendegradasi karbohidrat, protein, lipid, dan asam nukleat. Selanjutnya granula intraseluler yang berisi berbagai jenis enzim dan protein lain bergabung (fusi) dengan fagosom lalu terjadi degranulasi. Fagosit akan membentuk oksidan letal, seperti anion superoksida (O_2^-), anion hipoklorid (OCl) dan hydrogen peroksida (H_2O_2), dalam proses yang disebut *oxidative burst*. Enzim dan protein yang terdapat dalam granula mampu membunuh kuman (Wibawan dan Soejoedono, 2013). Selain proses fagositosis ini, terdapat juga kekebalan non spesifik yang berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella enteritidis* yaitu dengan adanya gen TLR4.

Berdasarkan hasil uji *clearance* yang menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan *Salmonella enteritidis* sebelum maupun setelah tantang pada kelompok ayam yang memiliki gen TLR4 (TLR4 positif) mengindikasikan adanya peran protein TLR4. Gen TLR merupakan kelompok gen yang mentranskripsi protein TLR yang berperan sebagai reseptor pada permukaan sel fagosit untuk mengenali *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMP). Komponen tersebut bisa berasal dari bakteri maupun virus yang berfungsi sebagai

Tabel 2. Respons ketahanan ayam IPB D1 pada uji *clearance* terhadap bakteri *Salmonella enteritidis*

Peubah	TLR4 Genotipe AG (n=4)		TLR4 Genotipe GG (n=6)	
	Sebelum ujiantang	Setelah ujiantang	Sebelum ujiantang	Setelah ujiantang
Clearance	99,27 ± 0,91 ^a	99,99 ± 0,00 ^a	94,50 ± 7,11 ^a	99,98 ± 0,03 ^a

Ket; n:jumlah sampel, Angka-angka pada kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5% (Uji lanjut Tukey).

signalling respons imun bawaan atau *innate immunity* (Calenge *et al.*, 2010). Komponen bakteri yang berperan sebagai *stimulating innate immunity*, antara lain: lipopolisakarida (LPS), peptidoglikan, lipoprotein (lipopeptida) dan DNA bakteri (Emertcan *et al.*, 2011). Komponen-komponen ini disebut sebagai ligan, yang kemudian berikatan dengan reseptor TLR (Kabelitz 2007). Gen TLR4 merupakan salah satu komponen dari gen TLR.

Gen TLR4 terdapat di permukaan sel khususnya sel hemopoetik, yang mampu berikatan dengan komponen dinding sel bakteri. Ikatan antara TLR dengan masing-masing mikroorganisme diperantarai oleh ligan tertentu dan mengemban fungsi masing-masing dalam proses *signalling* dan munculnya respons imun, khususnya yang bersifat bawaan. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ulupi *et al.* (2014) pada ayam kampung didapatkan hasil semua genotipe (AG, GG dan AA) tahan terhadap *Salmonella enteritidis*. Ayam IPB D1 juga merupakan bagian dari persilangan ayam kampung sehingga kemungkinan ayam ini juga mempunyai ketahanan tubuh yang sama dengan indukannya terhadap bakteri *Salmonella enteritidis* tersebut.

SIMPULAN

Ayam IPB D1 memiliki gen TLR4 yang menunjukkan ketahanan terhadap infeksi *Salmonella enteritidis*.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan jumlah populasi ayam yang lebih besar dan umur ayam yang berbeda untuk menguji ketahanan gen penciri genetik TLR4 terhadap bakteri *Salmonella enteritidis*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Ir. Cece Sumantri, M.Sc selaku ketua tim peneliti ayam IPB D1 yang telah menyediakan sumber ayam penelitian dan memberikan izin menggunakan Laboratorium Genetika Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor untuk penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah GD, Suprijatna E, Isroli. 2018. Pengaruh frekuensi pemberian pakan dan periode pemberian pakan terhadap hematologis ayam buras super umur 3-12 minggu. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia* 13(2): 140-150.
- Akashi SY, Nagai H, Ogata M, Oikawa K, Fukase S, Kusumato K, Kawasaki M, Nishijima S, Hayashi M, Kimoto, Miyake K. 2001. Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor 4 species-specific lipopolysaccharide recognition. *Int Immunol* 13: 1595-1599.
- Alfian, Dasrul, Azhar. 2017. Jumlah eritrosit, kadar haemoglobin dan nilai hematokrit pada ayam bangkok, ayam kampung dan ayam peranakan. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Veteriner* 1(3): 533-539.
- Altekruse SF, Bauer N, Chanlongbutra A, DeSagun R, Naugle A, Schlosser W, Umholtz R, White P. 2006. *Salmonella* Enteritidis in broiler chickens, United State, 2000-2005. *Emerg Infect Dis* 12 (12): 1848-1852.
- Arnafia W, Ningrum SG, Puspita EE, Lukma DW, Pasaribu FH, Wibawan IWT. 2016. Reaksi silang serum ayam yang divaksin dengan *Salmonella* Enteritidis terhadap beberapa serotipe *Salmonella enterica*. *J Veteriner* 17(3): 316-321.
- Calenge F, Kaiser P, Vignal A, Beaumont C. 2010. Genetic control of Resistance to salmonellosis and *Salmonella* carrier-state in fowl: a review. *Genet Sel Evol* 42: 1-11.
- [Ditjennak] Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2018. *Statistik Peternakan dan Kesehatan Hewan 2018*. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. Jakarta (ID): Ditjennak. Hlm. 77-81.
- Emertcan A, Ozturk F, Gunduz K. 2011. Toll-like receptors and skin. *J Eur Acad Dermatol* 11: 1-7.
- Gustavsson M, Do TH, Lüthje P, Tran NT, Brauner A, Samuelson P, Truong NH, Larsson G. 2015. Improved cell surface display of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis antigens in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 14(47): 1-8.

- Hall, T. 2011. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci* 2: 60-61.
- Harvey RA, Champe PC, Fisher BD, Strohl WA. 2007. *Microbiology*. Philadelphia (US): Williams & Walkin. Hlm. 111-129.
- Hendro L, Adriani, Latipudin D. 2013. Pengaruh pemberian lengkuas (*Alpinia galangal*) terhadap kadar neutrophil dan limfosit ayam broiler. Prosiding Seminar Nasional Peternakan. Fakultas Peternakan-Universitas Padjajaran. Jatinangor. Hlm. 531-536.
- Herawati. 2006. Pengaruh penambahan fitobiotik jahe merah (*Zingiber officinale* Rose) terhadap produksi dan profil darah ayam broiler. *Jurnal Protein* 14 (2): 137-141.
- Kaab H, Bain MM, Eckersall PD. 2018. Acute phase proteins and stress markers in the immediate response to a combined vaccination against Newcastle disease and infectious bronchitis viruses in specific pathogen free (SPF) layer chicks. *Poult Sci* 97: 463-469.
- Kabelitz D. 2007. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 19: 39-45.
- Lokapirnasari WP, Yulianto AB, Legowo D, Agustono. 2016. The effect of spirulina as feed additive to myocardial necrosis and leukocyte of chicken with Avian Influenza (H5N1) virus infection. *Proced Chem* 18(1): 213-217.
- Lu S, Killoran PB, Riley LW. 2003. Association of *Salmonella enteritica* serovar Enteritidis yafD with resistance to chicken egg albumen. *Infect Immune*. 71(12): 6734-6741.
- Matulova M, Stepanova H, Sisak F, Havlickova H, Faldynova M, Kyrova K, Volf J, Rychlik I. 2012. Cytokine signalling in splenic leukocytes from vaccinated and non-vaccinated chickens after intravenous infection with *Salmonella* Enteritidis. *Plos ONE* 7(2): 1-9.
- Sambrook J, Russel D. 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd Ed. New York (US): Cold Spring Harbor Laboratory Press. Hlm. 338-340.
- Parwati ED, Ulupi N, Afnan R, Satyaningtjas AS. 2017. Gambaran eritrosit ayam broiler dengan waktu tempuh transportasi dan level pemberian ZnSo₄ berbeda. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan* 5(3): 101-105.
- Sastradipradja D, Sri Hartini SS, Reviany W, Tonny U, Achmad M, Hamdani N, Regina S, Razak H. 1989. *Penuntun Praktikum Fisiologi Veteriner*. Bogor (ID): Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat Percetakan IPB. Hlm. 13-17.
- Sumantri C, Darwati S. 2017. Morfometrik ayam persilangan Pelung Sentul Kampung Ras Pedaging (PSKB) Generasi Ketiga umur 12-22 minggu. In: Prosiding Seminar nasional industri peternakan peningkatan implementasi inovasi riset pada industri peternakan. Fakultas Peternakan-IPB. Bogor. 29-30 november. Hlm. 57-61.
- Turcul D, Oporanul M, Grigorescul P, Roman M. 2011. Studies on haematological parameters in broiler chicken treated with amoxidem 50%. *Med Vet* 5(1): 93.
- Ulupi N, Muladno, Sumantri C, Wibawan IWT. 2014. Study of kampung chicken resistance against *Salmonella* Enteritidis using TLR4 gene as marker. *Indian J Pharm Sci* 13: 467-472.
- Wahyuni NY, Mayasari N, Abun. 2012. Pengaruh penggunaan ekstrak kulit jengkol (*Pithecellobium jiringa*) dalam ransum terhadap nilai hematologi ayam broiler. *Student E-J* 1(1): 1-5.
- Wibawan, IWT, Soedjoedono RD. 2013. *Intisari Immunologi Medis*. Bogor (ID): Percetakan IPB. Hlm.125-146.