

Perbaikan Kualitas Immunologik Squab Merpati Balap (*Columba livia*) Melalui Penyediaan Cropmilk Induk yang Diinduksi Probiotik *Lactobacillus sp.*

(Immunologic Quality Improvement of Racing Pigeon Squabs through Induction of Cropmilk Using Probiotic *Lactobacillus sp.*)

Agus Irianto dan Bambang Heru Budiyo

Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

Abstract

Probiotic is live microbial cells supplementation, which has beneficial effect to the host. Feeding adult pigeons (*Columba livia*) with food supplemented with probiotic, *Lactobacillus sp.*, at concentration 10^6 , 10^8 , and 10^{10} cells g^{-1} respectively have been done in order to improve the immunologic quality of the squabs. Immunologic response namely the number and activity of kidney's macrophage were examined. Also, the pathologic signs which developed following artificial infection by intramuscular injection with *Escherichia coli* suspension were examined. The result indicated that adult pigeon feed with food containing probiotic have beneficial effect to the squabs (through cropmilk) by improving their immune response namely increasing the number of kidney's macrophage and their *in vitro* phagocytic activity. Also, it reduced the *E. coli* population in the squabs' gut.

Key Words: Pigeon Squab, Probiotic, *Lactobacillus sp.*, Immune Response

Pendahuluan

Merpati merupakan unggas piaraan yang cukup banyak penggemarnya dan memiliki nilai komersial. Pemeliharaan merpati ditujukan untuk tiga hal yaitu: untuk pameran, produksi daging dan kemampuan terbang (Blakely and Bade, 1991). Kendala utama pengembangan merpati yaitu masalah penyakit akibat infeksi bakteri, protozoa dan ektoparasit.

Merpati memiliki ciri khas yaitu kemampuannya menghasilkan cropmilk sebagai makanan bagi squab (anakan) yang baru menetas, dan pemberian cropmilk tersebut terus berlangsung hingga beberapa hari kemudian. Dengan pemberian pakan yang demikian maka mikroba yang akan menjadi flora normal mikroba awal pada anakan sangat ditentukan oleh komposisi mikroba pada induknya, terutama mikroba pada cropmilk.

Bakteri asam laktat (BAL) telah digunakan secara luas sebagai probiotik yang ditujukan

untuk memanipulasi mikroba saluran pencernaan hewan sehingga menguntungkan inangnya. Keuntungan tersebut antara lain meningkatkan pertumbuhan dan derajat kesehatan hewan. Peningkatan derajat kesehatan inang dapat tercapai karena probiotik menghasilkan senyawa antimikroba yang menghambat pertumbuhan bakteri patogen, kompetisi situs pelekatan atau menstimulasi respon imun inang (Fuller, 1992). Flora normal mikroba penyusun saluran pencernaan merpati ditentukan oleh kontak pertama dengan induk dan makanan pertama yang dikonsumsi.

Tidak semua BAL memiliki nilai yang menguntungkan inang secara signifikan. Salah satu cara penapisan BAL yang menguntungkan yaitu dengan menguji kemampuan penghambatan terhadap bakteri patogen (Robertson *et al.*, 2000). Mengingat sifat BAL tersebut, maka penelitian ini ditujukan mengetahui pengaruh pemberian pakan pada indukan merpati yang disuplementasi

Lactobacillus sp. sebagai bentuk induksi probiotik pada cropmilk yang diproduksi induk terhadap kualitas imunologik dan flora mikroba normal saluran pencernaan anakan dilihat dari jumlah dan aktivitas makrofag ginjal dan populasi *Escherichia coli* dan *Lactobacillus sp.* pada isi usus halus nya.

Metode Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- Burung merpati 40 ekor (masing-masing perlakuan sebanyak 5 pasang).
- Pakan yang digunakan yaitu biji-bijian campuran.
- Lactobacillus sp.*, isolat dari ayam kampung betina usia 6 bulan
- Kandang dari kayu dengan kawat ayam beratap dengan ukuran 70 x 50 x 50 cm, dilengkapi tempat pakan dan tempat minum dari plastik.
- Media MRSA (De Man Rogosa and Sharpe Agar, Oxoid)
- Media TSA (Tryptone Soya Agar, Oxoid)
- Media EMBA (Eosin Methylen Blue Agar, Oxoid)
- Escherichia coli* (isolat dari kotoran ayam kampung betina umur 6 bulan)
- Larutan garam fisiologis
- Aquades
- Glass beads, dan lainnya.

Adapun cara kerja yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

Pelaksanaan Umum

Kultur *Lactobacillus sp.* diperbanyak pada media MRSA, sebagian disimpan dalam *deep-freezer* -70°C untuk *stock*, sedang lainnya untuk suplementasi pakan.

Kultur mikroba disuspensikan pada larutan garam fisiologis steril dengan kepadatan 10^{14} sel per ml, selanjutnya dicampur dengan biji-bijian pakan hingga konsentrasi setara dengan 10^6 , 10^8 ,

dan 10^{10} sel per g pakan. Untuk kontrol, biji-bijian dicampur dengan suspensi garam fisiologis dalam volume yang setara dengan suspensi bakteri yang ditambahkan ke masing-masing perlakuan.

Pakan diberikan dengan perkiraan sebanding dengan 5% berat-badan merpati per hari

Pemberian pakan dilakukan selama mulai dijodohkan hingga menghasilkan anakan dan berlanjut hingga anakan umur 14 hari.

Anakan berumur 14 hari dari masing-masing perlakuan, sebagian dibunuh untuk melihat jumlah dan aktivitas makrofag ginjal, dan jumlah *E. coli* dan *Lactobacillus sp.* pada isi usus halus nya. Sebagian lainnya diinfeksi artifisial dengan injeksi intramuskular dengan *E. coli*.

Pengamatan Respon Imun (Irianto and Austin, 2002)

Ginjal yang telah dikeluarkan dari tubuh dihancurkan dengan *tissue grinder* Jencon, selanjutnya ditimbang dan dilarutkan dalam larutan RPMI 1640 steril (yang di dalamnya mengandung $1\mu\text{g}$ penstrep per 100 ml, 0,2 mg heparin per 100 ml dan 0,1% v/v Foetal Bovine Serum) pada perbandingan 1:10. Ginjal yang telah hancur dicuci dengan cara sentrifugasi hingga tiga kali. Selanjutnya dikembalikan ke volume semula dan diambil untuk diamati di bawah mikroskop pada perbesaran 400x.

Disiapkan hemositometer, selanjutnya suspensi makrofag diteteskan pada groove hingga penuh. Dihitung jumlah makrofag dalam 4 kotak ditengah (yang masing-masing berisi 25 kotak kecil). Selanjutnya jumlah makrofag per g ditentukan dengan rumus = jumlah rata-rata sel makrofag dari 4 kotak x 4×10^6 x faktor pengenceran⁻¹.

Untuk menentukan aktivitas fagositosis makrofag, maka 0,5 ml suspensi makrofag diteteskan pada gelas objek dan diratakan, dibiarkan selama 60 menit pada ruang dengan suhu 18°C , dijaga untuk tidak kering dengan

meneteskan larutan RPMI 1640 secara periodik. Selanjutnya, gelas objek dicuci dengan mengalirkan larutan RPMI 1640 pelan-pelan 3 kali, maka yang akan tersisa pada gelas adalah makrofag yang melekat pada permukaan gelas. Selanjutnya 0,5 ml suspensi yeast dengan konsentrasi 10^9 sel/ml diteteskan pada gelas benda dan didiamkan selama 60 menit pada ruangan dengan suhu 18°C , dijaga dari kekeringan dengan meneteskan RPMI 1640 secara periodik. Sisa cairan dibuang, selanjutnya dicuci dengan RPMI 1640 pelan-pelan 3 kali. Preparat difiksasi dengan metanol 96% dan dibiarkan 5 menit. Sisa metanol dibuang, dikeringanginkan dan diwarnai dengan Giemsa selama 30 menit. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan diamati di bawah mikroskop. Dihitung jumlah makrofag tiap bidang pandang, hingga diperoleh 100 sel makrofag, dihitung pula dari bidang pandang yang sama berapa jumlah sel makrofag yang melakukan fagositosis terhadap yeast.

Pengamatan Mikroba Saluran Pencernaan

Anakan merpati yang telah dibedah, diambil isi usus halus (keseluruhan isi usus halus dicampur rata).

Isi usus halus yang sudah tercampur rata ditimbang sebanyak 1 g dan dilarutkan pada garam fisiologis steril hingga 10^{-3} , selanjutnya disebar-ulas (*spread-plating*) dengan manik-manik kaca (glass-beads) pada media MRSA dan EMBA pada cawan petri secara duplo.

Setelah diinkubasi 2x24 jam, koloni yang tumbuh pada masing-masing media dihitung. Pada media EMBA, *E. coli* akan berwarna merah tua kehitaman dengan kilat logam, adapun pada MRSA hanya bakteri laktat saja yang tumbuh, dengan warna putih hingga krem keruh.

Pengamatan Respon Anakan Merpati terhadap Infeksi *E. coli* Intramuskular

Anakan merpati yang tidak dibunuh, diinfeksi artifisial dengan injeksi intramuskular dengan 0,1 ml suspensi *E. coli* pada konsentrasi

10^6 sel/ml (Lorenz, 1999). Setelah satu minggu diamati respon atau tanda sakit yang muncul.

Hasil dan Pembahasan

Hasil analisis ragam suplementasi probiotik pada indukan merpati menunjukkan bahwa suplementasi probiotik tersebut berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap populasi *E. coli* pada usus halus anakan merpati balap. Uji lanjut dengan uji beda nyata terkecil menunjukkan hasil sebagaimana Tabel 1.

Data Tabel 1 menunjukkan bahwa dosis suplementasi probiotik 10^8 sel/g menekan populasi *E. coli* pada usus halus anakan merpati balap ($P < 0,05$) lebih baik dibandingkan dengan dosis suplementasi 10^6 sel/g. Peningkatan dosis suplementasi probiotik sampai 10^{10} sel/g tidak signifikan pengaruhnya dibandingkan suplementasi 10^8 sel/g. Hasil penelitian ini menunjukkan kesesuaian dengan hasil yang diperoleh oleh Iriyanti dan Rimbawanto (2001) yang mengemukakan bahwa pemberian probiotik dalam pakan mampu menurunkan populasi bakteri patogen, seperti *E. coli* dan *Salmonella sp.* Suplementasi probiotik pada indukan merpati diharapkan akan memperbaiki kualitas anakan dan indukan itu sendiri, sebab proses pemberian pakan dari indukan kepada anakan merupakan awal anakan kontak dengan mikroba flora normal (Kamal, 1995).

Escherichia coli merupakan bakteri gram negatif, dan merupakan flora normal saluran pencernaan. Menurut Pelczar dan Chan (1986), *E. coli* sebenarnya merupakan bakteri yang membantu pada sistem pencernaan akan tetapi dapat menjadi patogen (patogen oportunistis) apabila terdapat di luar saluran pencernaan misalnya saluran kemih, saluran empedu, paru-paru atau selaput otak. Gejala-gejala klinis tersebut meliputi peradangan pada bagian kaki dan paha, haemorrhagic (pendarahan) pada kolon, pembengkakan pada tembolok dan usus halus, dan lambung dan usus tidak berisi makanan atau kosong (*empty stomach*).

Tabel 1. Rataan populasi *E. coli* pada usus halus anakan merpati balap

Dosis Suplementasi Probiotik (sel/g)	Rataan Populasi <i>E. coli</i> ± Standard deviasi (x 10 ⁵ CFU)
0 (kontrol)	14,06 ± 1,83 ^a
10 ⁶	8,75 ± 1,28 ^b
10 ⁸	5,77 ± 0,82 ^c
10 ¹⁰	5,49 ± 0,67 ^c

Keterangan :

^{abc}, Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan ada perbedaan pada $P < 0,05$
CFU = Colony Forming Unit

Adapun pada anakan yang dari induk yang mendapat pakan yang disuplementasi probiotik, gejala-gejala klinis tersebut tidak ada. Hal tersebut bersesuaian dengan hasil penelitian Indradji (1999), bahwa infeksi artifisial *E. coli* pada beberapa hewan uji yakni ayam, marmot, hamster dan mencit secara oral akan menyebabkan gejala klinis antara lain haemorrhagic pada kolon, nekrosis pada organ ginjal dan pembengkakan pada organ tembolok dan usus halus.

Pembengkakan pada tembolok dan usus halus terjadi karena sel otot yang bekerja pada organ tersebut mengalami piknotik (kematian sel), sehingga kontraksi otot berhenti dan tidak dapat melakukan gerak peristaltik yang semestinya. Dengan demikian, makanan yang ada pada tembolok tidak dapat turun ke organ pencernaan untuk diserap oleh usus halus. Menurut Indradji (1999), pembengkakan merupakan gejala klinis yang disebabkan oleh enterotoksin dan endotoksin yang dihasilkan oleh *E. coli* ketika melekat pada permukaan sel-sel epitel.

Gejala klinis seperti tersebut diatas tidak terjadi pada anakan merpati dari indukan yang diberi pakan dengan suplementasi probiotik 10⁶ sel/g, 10⁸ sel/g dan 10¹⁰ sel/g. Meskipun dari Tabel 1 di atas, tekanan terhadap populasi *E. coli* yang optimum diperoleh dari suplementasi 10⁸ sel/g, tetapi terbukti pada dosis 10⁶ sel/g

sudah mampu memberikan perlindungan imunologik yang cukup ketika anakan merpati diinfeksi melalui suntikan intramuskular dengan suspensi *E. coli*. Soeharsono (1997) mengemukakan bahwa keseimbangan dan eliminasi mikroorganisme kompetitor ke luar dari saluran pencernaan, dapat dilakukan oleh *Lactobacillus sp.* pada dosis 10⁸ sel/g, meskipun peneliti lain mengungkapkan dosis optimum 10⁹ sel/ml (Pardigon, 1986) atau 10⁷ sel/g (Iriyanti dan Rimbawanto, 2001). Adapun Irianto dan Austin (2002) melaporkan bahwa perlindungan imunologik optimum pada trout pelangi (*Oncorhynchus mykiss*) dapat dicapai melalui pemberian pakan yang disuplementasi probiotik pada dosis 10⁸ sel/g.

Penghambatan *E. coli* pada usus halus anakan merpati balap oleh cropmilk hasil induksi probiotik dalam penelitian ini diduga disebabkan oleh aktivitas antagonisme (Fuller, 1992). Mekanisme antagonisme ini dapat terjadi dengan jalan mengganggu atau menghambat salah satu atau lebih aktivitas metabolisme di dalam sel bakteri uji sehingga fisiologis mikroba berubah dan menyebabkan gangguan pertumbuhan atau menyebabkan kematian (Brock, 1979). Menurut Tagg *et al.*, (1976) dan Waldie (1991) aktivitas antagonisme bakteri asam laktat adalah menekan bakteri patogen dengan menghasilkan bacteriocin misalnya lactocidin, asam organik dan hidrogen peroksida

yang mempunyai aktivitas antimikroba dan mengontrol flora normal dalam usus.

Menurut Irianto dan Austin (2002), perlindungan imunologik akibat suplementasi probiotik berlangsung karena probiotik akan menstimulasi sistem imun nonspesifik seluler antara lain berupa peningkatan jumlah makrofag ginjal dan kemampuan aktivitas fagositosis. Hal ini terbukti berlangsung pula pada ginjal anakan merpati balap yang disuplai pakan probiotik secara tidak langsung melalui cropmilk induknya.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa pemberian suplemen probiotik pada indukan merpati balap berpengaruh sangat nyata terhadap rata-rata jumlah sel makrofag pada ginjal anakan merpati balap ($P < 0,01$). Hasil uji beda nyata terkecil dari pengaruh suplementasi probiotik terhadap jumlah sel makrofag ditunjukkan pada Tabel 2. Dari tabel tersebut diketahui bahwa rata-rata jumlah sel makrofag pada perlakuan AM0 sebesar $1,44 \times 10^8$ sel/g ginjal, diasumsikan sebagai jumlah pada keadaan normal tanpa pemberian probiotik. Pada perlakuan yang diberi pakan dengan suplementasi probiotik, didapatkan peningkatan jumlah sel makrofag ginjal anakan merpati balap sampai 4×10^{10} sel/g ($P < 0,05$). Hal ini berarti semakin tinggi dosis probiotik yang diberikan pada indukan merpati balap semakin tinggi pula jumlah sel makrofag ginjal anakan merpati balap.

Peningkatan jumlah makrofag disebabkan pakan induk merpati yang disuplementasi probiotik menjadi komponen utama penyusun cropmilk, sehingga cropmilk akan mengandung probiotik dan selanjutnya sampai ke anakan. Sebagai akibat lanjut yaitu probion *Lactobacillus sp.* akan menstimulasi sel monosit untuk berdiferensiasi menjadi sel makrofag. Menurut Bellanti (1993), sel makrofag selalu terbentuk secara alami dari sel monosit yang bermigrasi dan berdiferensiasi ke jaringan setelah 24 jam berada di peredaran darah.

Selain meningkatkan jumlah sel makrofag ginjal, pemberian probiotik juga dapat meningkatkan kemampuan aktivitas fagositosis makrofag yang berperan untuk membunuh kuman atau benda asing (Bellanti, 1993; Irianto dan Austin, 2002).

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa pemberian suplemen probiotik pada indukan merpati balap berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap aktivitas fagositosis sel makrofag pada ginjal anakan merpati balap. Uji untuk mengetahui dosis suplementasi probiotik yang meningkatkan aktivitas fagositosis sel makrofag pada ginjal anakan merpati balap, maka dilakukan pengujian lanjut dengan uji beda nyata terkecil (Tabel 3).

Dari Tabel 3 diketahui bahwa pemberian suplemen probiotik pada indukan merpati balap sampai 10^{10} sel/g dapat meningkatkan aktivitas

Tabel 2. Rataan jumlah sel makrofag ginjal anakan merpati balap

Dosis Suplementasi Probiotik (sel/g)	Rataan Jumlah Makrofag \pm Standard deviasi (%)
0 (kontrol)	1,44 \pm 0,21 ^a
10 ⁶	2,24 \pm 0,21 ^b
10 ⁸	2,88 \pm 0,33 ^c
10 ¹⁰	4,00 \pm 0,40 ^d

Keterangan :

^{abc} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan ada perbedaan pada $P < 0,05$

Tabel 3. Rataan aktivitas fagositosis sel makrofag pada ginjal anakan merpati balap

Dosis Suplementasi Probiotik (sel/g)	Rataan Fagositosis ± Standard deviasi (%)
0 (kontrol)	21,0 ± 2,12 ^a
10 ⁶	31,4 ± 2,88 ^b
10 ⁸	42,2 ± 4,14 ^c
10 ¹⁰	50,8 ± 2,94 ^d

Keterangan :

^{abcd}, Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan ada perbedaan pada P < 0,05

fagositosis sel makrofag pada ginjal anakan merpati balap (P < 0,05). Peningkatan aktivitas sel makrofag pada setiap perlakuan menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis probiotik, semakin tinggi pula persentase fagositosis. Persentase fagositosis tertinggi diperoleh pada perlakuan AM3 sebesar 50,8% dan terendah pada perlakuan kontrol AM0 sebesar 21%. Peningkatan aktivitas fagositosis sel makrofag ginjal anakan merpati balap tersebut dilihat dari aktivitas fagositosis sel makrofag terhadap sel yeast secara *in vitro*. Secara alami, sel makrofag pada ginjal akan memfagositosis dan membunuh kuman (antigen) (Abbas *et al.*, 1991).

Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa suplementasi probiotik melalui pakan induk merpati balap terbukti mampu menstimulasi respon imun anakan (squab) melalui peningkatan respon imun non spesifik (jumlah dan aktivitas makrofag ginjal) dan ketahanannya terhadap infeksi patogen (*E. coli*).

Daftar Pustaka

- Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and J.S. Pober. 1991. Cellular and Molecular Immunology. 4th ed. W.B. Saunders Co., New York. Pp: 116-126
- Bellanti, J.A. 1993. Imunologi III. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Blakely, J. dan D.H. Bade. 1991. Ilmu Peternakan (Terjemahan). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Brock, T.D. 1979. Biological of Microbiology. Prince Hall Inc., Eagle Wood Clips, New Jersey.
- Fuller, R. 1992. History and development of probiotics. *In*: Fuller, R. (Ed.). Probiotic: The Scientific Basis. Chapman & Hall. London. Pp. 1-8.
- Indradji, M. 1999. Evaluasi Infeksi Escherichia coli Verositotoksigenik pada Beberapa Hewan Percobaan. Tesis. Program Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Pp: 4-12.
- Irianto, A. and B. Austin. 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 25: 333-342.
- Iriyanti, N. dan E.A. Rimbawanto. 2001. Pengaruh suplementasi probiotik *Lactobacillus* sp. dalam ransum unggas terhadap aktivitas antagonisme dan kompetisi *Lactobacillus* sp. pada saluran pencernaan unggas. *Biosfera* 18 (2): 68-72.
- Kamal, M. 1995. Ilmu Nutrisi Ternak. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Lorenz, R.T. 1999. A review of Spirulina and Haematococcus algae meal as a carotenoid and vitamin supplement for poultry. *Spirulina Pacifica Technical Buletin No. 053*. Cyanotech Corporation. www. cyanotech.com. (diakses: 22 Juni 2004).
- Pelczar dan E.S. Chan. 1986. Mikrobiologi Dasar. Penerbit UI press. Jakarta.
- Robertson, P.A.W., C. O'Dowd, C. Burrells, P. Williams, and B. Austin. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture* 185: 235-243.

- Soeharsono, H. 1997. Probiotik Alternatif Pengganti Antibiotik. *Buletin PPSKI* 9: 3-5.
- Tagg, J.R., A.S. Dajani, and L.W. Wannamaker. 1976. Bacteriocin of Gram positive bacteria. *Bacteriological Review* 40: 722-756.
- Waldie G. A. 1991. Effect to feeding system, to protein level and different dietary energy source on performance of squabing pigeon. *Poultry Science* 70: 1206-1212.