

PENGARUH SUPLEMENTASI PROBIOTIK YANG BERBEDA PADA AIR MINUM TERHADAP TOTAL LEUKOSIT DAN DIFERENSIAL LEUKOSIT BROILER

The Influence of Different Probiotic Supplementation on Drinking Water on Total Leukocyte and Leucosyte Differential of Broiler Chicken

Mayhendra Putra Asmara, Purnama Edy Santosa, Siswanto, dan Sri Suharyati

Department of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture, University of Lampung
Jl. Prof. Dr. Soemantri Brojonegoro No. 1 Gedong Meneng Bandar Lampung 35145
e-mail :mayhendraputra23@gmail.com

ABSTRACT

This study aimed to determine: 1) the total of leukocytes and differential leukocytes of broilers given different probiotics; 2) the best total of leukocytes and leukocyte differentials with the different probiotics. This research was carried out on January 10 2018 to February 9 2018. This research held at the farm and leukocyte analysis and differential leukocyte were carried out at the Lampung Veterinary Laboratory. The experimental design used completely randomized design with 3 replications with each test having 25 experimental units and 4 treatments (P0: drinking water without probiotics, P1: drinking water with probiotics A, P2: drinking water with probiotics B, and P3: drinking water with probiotics C). Treatment was given to broilers aged 7 days. Leukocytes and differential leukocytes were tested by WBC test. Observation data were analyzed with 5% and / or 1% level variance and continued with the Smallest Significant Difference test. The results of this study showed the supplementation of probiotics in drinking water had significant effected ($P < 0.01$) on the total of leukocytes and had a significant effect ($P < 0.05$) on lymphocytes and neutrophils while not significant effected ($P > 0.05$) on basophils, eosinophils, and monocytes of broiler chicken.

Keywords: Broiler chicken, Leukocyte, Differensial leukocytes, Probiotics.

PENDAHULUAN

Peningkatan kebutuhan protein dan juga berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknologi khususnya di bidang peternakan menyebabkan sektor peternakan dituntut untuk berperan aktif dalam pemenuhan kebutuhan protein hewani. Pengembangan usaha peternakan terutama usaha broiler menjadi salah satu cara dalam pemenuhan kebutuhan gizi tersebut. Peningkatan produksi daging membutuhkan asupan nutrisi secara lengkap karena nutrisi dalam ransum merupakan hal yang terpenting untuk produksi daging broiler. Pencegahan penyakit juga tidak kalah penting agar daging dapat diproduksi secara efisien.

Pencegahan penyakit pada usaha peternakan terutama usaha broiler kebanyakan menggunakan antibiotik. Antibiotik pada umumnya merupakan produk sintesis yang menyebabkan sebagian besar masyarakat menolak membeli produk peternakan yang diketahui menggunakan

antibiotik tersebut. Penggunaan produk sintesis telah terbukti mengakibatkan adanya residu dalam tubuh ternak sehingga daging yang diproduksi tidak aman. Residu tersebut mempunyai efek yang kurang menguntungkan terhadap ternaknya maupun manusia yang mengonsumsi hasil ternaknya. Oleh sebab itu, penelitian banyak dilakukan untuk mendapatkan pengganti dari antibiotik.

Antibiotik dapat diganti dengan penggunaan probiotik. Probiotik adalah makanan tambahan yang mengandung mikroorganismehidup yang memberikan keuntungan bagi inang dengan meningkatkan keseimbangan mikroorganisme dalam saluran pencernaan (Collins dan Gibson, 1999). Selain itu juga, probiotik dapat meningkatkan sistem imun dalam tubuh ternak. Probiotik tidak menimbulkan residu, probiotik tidak diserap oleh saluran pencernaan inang dan tidak menyebabkan mutasi pada mikroorganisme yang lain (Lopez, 2000).

Sistem imun dalam tubuh ternak salah satunya bergantung oleh sel darah putih

(leukosit). Leukosit memiliki dua struktur yaitu granulosit yang terdiri dari neutrofil, basofil, dan eosinofil, dan agranulosit yaitu monosit dan limfosit. Saat ini belum banyak penelitian tentang manfaat probiotik terhadap sistem imun khususnya pengaruh probiotik terhadap total leukosit dan diferensial leukosit. Berdasarkan latar belakang di atas maka perlu dilakukan penelitian tentang pengujian probiotik yang berkaitan pada sistem imun ayam broiler dengan mengetahui total leukosit dan diferensial leukosit.

MATERI DAN METODE

Materi

Materi penelitian berupa 60 ekor *doc* ayam broiler umur 1 hari yang dipelihara di Pesawaran Farm. Alat yang digunakan berupa tabung EDTA, syringe 3 cc, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas objek, mikropipet, cooling box, cell counter dan mikroskop.

Metode

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap dengan 1 kontrol dan 3 perlakuan (Probiotik A, B, dan C). Peubah yang diamati meliputi total leukosit dan diferensial leukosit broiler, yang terdiri dari limfosit, neutrofil, monosit, basofil, dan eosinofil.

Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan *Analisis of Varians* dengan taraf signifikansi 5 % dan atau 1% dan dilakukan pengujian lanjut dengan uji BNT untuk peubah yang berbedanya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Perlakuan terhadap Total Leukosit pada Broiler

Data hasil penelitian pengaruh probiotik pada broiler terhadap total leukosit yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Data hasil penelitian leukosit pada broiler

Ulangan	Perlakuan			
	P0	P1	P2	P3
U1	33,46	53,01	45,77	44,54
U2	38,41	57,62	51,17	52,33
U3	41,84	51,95	47,63	51,67
Jumlah	113,71	162,58	144,57	148,54
Rata-rata	37,90 ^a	54,19 ^b	48,19 ^b	49,51 ^b

Keterangan :

P0 = Pemberian air minum tanpa probiotik;
P1 = Pemberian air minum menggunakan probiotik A ;
P2 = Pemberian air minum menggunakan probiotik B ;
P3 = Pemberian air minum menggunakan probiotik C ;

*Huruf yang berbeda pada baris yang sama berbeda nyata pada taraf signifikansi 1%

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan probiotik berpengaruh sangat nyata terhadap total leukosit pada broiler. Hasil dari penelitian tersebut, masing-masing perlakuan mempengaruhi total leukosit pada broiler. Total leukosit pada penelitian yang dilakukan rata-rata berada diatas kisaran normal. Junguera (1997) menyatakan bahwa hasil rata-rata normal leukosit unggas berkisar antara 16000—40000 sel/ μ l.

Peningkatan total leukosit pada broiler yang diberikan perlakuan diduga disebabkan oleh probiotik yang diberikan kepada broiler tersebut. Adanya mikroorganisme yang terdapat didalam probiotik tersebut menyebabkan peningkatan total leukosit.

Probiotik akan berfungsi secara efektif bila dapat berinteraksi dengan inangnya atau tubuh hewan. Interaksi antara probiotik dengan broiler mengakibatkan peningkatan total leukosit broiler. Respon tubuh terhadap antigen yang tidak dikenali karena dosis vaksin yang diberikan membuat tubuh menghasilkan leukosit diatas kisaran normal untuk memproduksi antibodi melawan antigen yang ada.

Hasil uji lanjut dengan menggunakan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) pada Tabel 1 menunjukkan hasil yang berbeda sangat nyata ($P<0,01$). Uji BNT menunjukkan bahwa perlakuan kontrol (P0) berbeda sangat nyata dengan perlakuan P1, P2, dan P3 sedangkan

P1 dengan P2 dan P3 tidak berbeda nyata. Perlakuan yang dekat dengan standar normal adalah P2. Perlakuan kontrol (P0) berbeda sangat nyata dengan perlakuan P1, P2, dan P3 yang berarti bahwa probiotik yang diberikan pada perlakuan P1, P2, dan P3 menghasilkan total leukosit yang berbeda dengan perlakuan yang tidak diberikan probiotik (P0). Hasil yang berbeda sangat nyata tersebut menunjukkan bahwa respon dari tubuh broiler terhadap mikroba probiotik yang masuk ke dalam tubuh yang tidak dikenali oleh tubuh sehingga leukosit diproduksi lebih banyak sebagai antibodi melawan benda asing tersebut.

Probiotik merangsang aktivitas makrofag. Telah diketahui bahwa proses fagositosis dilakukan terutama oleh makrofag dan ini adalah mekanisme pertahanan utama non spesifik tubuh saat penetrasi zat asing.

Cara kerja bakteria probiotik dalam mendesak pertumbuhan bakteri penyebab penyakit nampaknya diawali dari pengaruh kerjanya terhadap sistem kekebalan tubuh. Mikroorganisme probiotik yang dimakan dapat menstimulasi aktivitas makrofag terhadap beberapa spesies bakteri yang berbeda. Hal tersebut mungkin disebabkan oleh absorpsi antigen atau translokasi mikroorganisme tersebut melalui dinding usus langsung ke peredaran darah untuk kemudian menstimulasi makrofag. Hal ini sesuai dengan penelitian Erickson dan Hubbard (2000) bahwa mencit yang diberi bakteri asam laktat *Lactobacillus* selama 7 hari dapat meningkatkan kapasitas makrofag dan sel PMNnya dalam memfagosit *Escherichia coli*. Hal ini disebabkan bakteri *Lactobacillus* tersebut dapat menginduksi sitokin.

Probiotik juga diduga berperan aktif dalam pembentukan antibodi sehingga pada broiler yang diberi probiotik dengan perlakuan P1, P2, dan P3 memiliki total leukosit yang berada diatas kisaran normal. Hal tersebut disebabkan mekanisme mikroorganisme probiotik yang berkembang dengan baik dan mampu berinteraksi dengan baik dengan sel inang (broiler). Salah satu fungsi probiotik menurut Nur (2011) adalah menstimulasi mukosa dan meningkatkan sistem kekebalan hewan inang. Mikroorganisme probiotik difungsikan sebagai stimulan untuk merangsang sistem imun dalam tubuh broiler meningkat. Sistem imun dalam tubuh broiler adalah antibodi. Antibodi dalam tubuh merupakan sistem

pertahanan dalam tubuh yang melawan antigen dan juga infeksi penyakit.

Perlakuan yang memiliki total leukosit tertinggi terdapat pada P1 yang menggunakan probiotik A, sedangkan total leukosit terendah terdapat pada P0 yang tidak diberikan probiotik atau kontrol. Kandungan bakteri yang terdapat pada A lebih sedikit daripada kandungan dari probiotik lain (probiotik B dan C) karena hanya ada *Lactobacillus casei*, *Saccharomyces cereviseae*, dan *Rhodopseudomonas palustris* 10^6 CFU/ml sedangkan pada probiotik B yaitu *Lactobacillus sp.*, *Azotobacter sp.*, *Streptomyces sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Aspergillus sp.*, dan *Trichoderma sp.* dan pada probiotik C yaitu *Lactobacillus acidoplylus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sulivarus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, dan *Saccharomyces cereviseae* dengan kisaran 10^7 CFU/ml. Perlakuan P1 dengan menggunakan probiotik A menghasilkan total leukosit tertinggi diduga karena sedikitnya macam-macam bakteri yang terkandung dalam probiotik A menyebabkan tubuh dapat memanfaatkan dengan maksimal bakteri tersebut untuk meningkatkan sistem imun dalam tubuh sedangkan semakin banyaknya keberagaman bakteri yang ada menyebabkan banyaknya kompetisi bakteri di dalam tubuh dan juga banyak yang terbuang. Penelitian pada P1 yang menggunakan probiotik A diketahui bahwa terkandung bakteri *L. casei* yang dapat meningkatkan aktivitas makrofag (Djunaedi, 2007). Nur (2011) menambahkan bahwa *L. casei* dan *L. bulgaricus* diketahui dapat meningkatkan produksi makrofag dan mengaktifkan fagosit baik penelitian pada manusia maupun pada tikus percobaan. Peningkatan aktivitas makrofag akan mempengaruhi pelepasan antibodi broiler karena makrofag akan memberikan suplai berupa antigen kepada limfosit sehingga limfosit akan menghasilkan antibodi yang lebih banyak. Hal tersebut akan berakibat pada peningkatan total leukosit broiler.

Pengaruh Perlakuan terhadap Diferensial Leukosit pada Broiler

Data hasil penelitian pengaruh probiotik pada broiler terhadap diferensial leukosit dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Data hasil uji probiotik terhadap diferensial leukosit broiler

Perlakuan	Variabel				
	L	N	B	E	M
	-----% -----</th <th data-kind="ghost"></th> <th data-kind="ghost"></th> <th data-kind="ghost"></th> <th data-kind="ghost"></th>				
P0	72,47 ^a	16,87 ^b	0,20	2,07	8,27
P1	81,07 ^b	8,87 ^a	0,07	0,73	9,13
P2	78,93 ^b	12,73 ^a	0,13	1,23	7,07
P3	77,00 ^b	14,53 ^b	0,00	1,13	7,27

Keterangan :

P0 = Pemberian air minum tanpa probiotik;
P1 = Pemberian air minum menggunakan probiotik A ;
P2 = Pemberian air minum menggunakan probiotik B ;
P3 = Pemberian air minum menggunakan probiotik C ;

L = Limfosit; N = Neutrofil; B = Basofil; E = Eosinofil; M = Monosit

*Huruf yang sama pada baris yang sama tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi 5%

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan probiotik pada broiler terhadap diferensial leukosit yang berpengaruh nyata yaitu limfosit dan neutrofil sedangkan basofil, eosinofil, dan monosit tidak berpengaruh nyata. Jumlah limfosit berada diatas kisaran normal, sedangkan neutrofil, basofil, eosinofil, dan monosit berada dibawah kisaran normal. Dukes (1995) menyatakan bahwa sel darah unggas terdiri atas 25—30% neutrofil, 55—69% limfosit, 10% monosit, 3—8% eosinofil, dan 1—4% basofil. Pada penelitian tersebut, masing-masing perlakuan mempengaruhi jumlah limfosit dan neutrofil broiler. Hal tersebut diduga karena mikroorganisme yang terkandung dalam probiotik. Probiotik diketahui dapat meningkatkan sistem imun didalam tubuh.

1. Pengaruh Pemberian Perlakuan terhadap Jumlah Limfosit

Berdasarkan analisis ragam dan uji lanjut BNT menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh nyata terhadap jumlah limfosit ($P<0,05$). Tabel 2 menunjukkan jika limfosit berada dalam jumlah yang diatas normal yaitu P0 72,47%; P1 81,07%; P2 78,93%; dan P3 77,00%. Dukes (1995), rata-rata volume limfosit unggas 55—69%.

Limfosit tertinggi terdapat pada P1 yang menggunakan probiotik A. Diketahui pada probiotik A terdapat bakteri *L. casei* yang dapat mengaktifkan makrofag sehingga terjadi peningkatan pembentukan antibodi oleh sel limfosit. Hal ini sesuai dengan pernyataan Djunaedi (2007), bakteri *L. casei* yang dapat meningkatkan aktivitas makrofag. Hal tersebut mungkin disebabkan oleh absorpsi antigen atau translokasi *Lactobacilli* melalui dinding usus langsung ke peredaran darah untuk kemudian menstimulasi makrofag. Tubuh broiler akan merespon bakteri-bakteri probiotik yang masuk ke dalam tubuh sebagai antigen sehingga tubuh akan membentuk antibodi dalam pengembangan kekebalan tubuh broiler. Nur (2011) menambahkan bahwa *L.casei* dan *L.bulgaricus* diketahui dapat meningkatkan produksi makrofag dan mengaktifkan fagosit baik penelitian pada manusia maupun pada tikus percobaan. Peningkatan aktivitas makrofag akan mempengaruhi pelepasan antibodi karena makrofag akan memberikan suplai berupa antigen kepada limfosit sehingga limfosit akan menghasilkan antibodi yang lebih banyak. Probiotik terkandung mikroba-mikroba yang belum dikenal oleh tubuh broiler sehingga mikroba tersebut dianggap antigen.

P2 dan P3 berbeda dengan P1 karena tidak adanya *L. casei*. Penelitian P2 hanya ada keterangan komposisi *Lactobacillus sp* tanpa ada keterangan *Lactobacillus* apa saja yang terdapat didalamnya sehingga pemberian menggunakan P2 yaitu probiotik B tidak efisien sedangkan pada P3 yaitu menggunakan probiotik C terdapat berbagai macam *Lactobacillus* seperti *L. acidophylus*, *L. plantarum*, dan *L. sulivarius*. Djunaedi (2007) menyatakan bahwa *L. acidophylus* mampu meningkatkan produksi IgA sebanyak 4x lipat pada stimulasi oleh *S. typhi*.

P0 yang tidak diberi perlakuan memiliki sel limfosit mendekati normal. Hal tersebut terjadi karena tidak diberikannya probiotik yang menyebabkan tidak ada peningkatan aktivitas makrofag sehingga pelepasan antibodi oleh limfosit tidak banyak terjadi. Selain itu, antibodi yang lemah pada suatu ternak dapat dengan mudah menyebabkan ternak tersebut terinfeksi penyakit.

Hasil uji lanjut BNT menunjukkan bahwa P0 berbeda nyata terhadap P1, P2, dan P3 pada limfosit. Hal tersebut disebabkan oleh mikroorganisme yang terkandung didalam probiotik. Mikroorganisme probiotik

dianggap sebagai antigen sehingga merangsang limfosituntuk meningkatkan pembentukan antibodi sehingga adanya peningkatan pada pembentukan limfosit maka kekebalan tubuh broiler akan meningkat.

2. Pengaruh Perlakuan terhadap Jumlah Neutrofil

Berdasarkan analisis ragam yang dilakukan bahwa perlakuan berpengaruh nyata terhadap jumlah neutrofil ($P<0,05$). Tabel 2 menunjukkan jika neutrofil berada di bawah kisaran normal yaitu P0 16,87%; P1 8,87%; P2 12,73%; dan P3 14,53%. Hal tersebut terjadi karena jumlah neutrofil berbanding terbalik dengan jumlah limfosit. Apabila limfosit tinggi karena memproduksi antibodi untuk meningkatkan kekebalan tubuh broiler maka neutrofil akan rendah. Tingginya jumlah neutrofil disebabkan karena adanya infeksi pada ternak broiler. Neutrofil pada keadaan normal berperan untuk memberikan perlindungan, akan tetapi pada keadaan tertentu dapat bersifat patogen bagi jaringan (Romanelli dkk., 1999).

Hasil uji lanjut BNT menunjukkan bahwa P0 berbeda nyata terhadap P1, P2, dan tidak pada P3. P0 memiliki jumlah neutrofil tertinggi dibandingkan dengan perlakuan baik P1, P2, dan P3. Hal tersebut diduga karena adanya infeksi penyakit atau peradangan pada ternak broiler tersebut akibat litter yang basah. Peran utama neutrofil adalah sebagai garis pertahanan pertama dalam melawan benda asing khususnya melawan infeksi tersebut. Selain melakukan fagositosis terhadap kuman, neutrofil juga memakan jaringan tubuh yang rusak atau mati (Tizard, 2000). P1 memiliki kadar terendah pada jumlah neutrofil dengan kadar 8,87% dan begitu pula dengan P2 yang tidak berbeda nyata terhadap jumlah neutrofil ($P>0,05$), sehingga dapat diduga tidak ada infeksi penyakit.

3. Pengaruh Perlakuan terhadap Jumlah Monosit

Berdasarkan analisis ragam yang dilakukan bahwa perlakuan tidak berpengaruh nyata terhadap jumlah monosit ($P>0,05$). Tabel 2 menunjukkan bahwa jumlah monosit berada di bawah kisaran normal. Monosit tertinggi terdapat pada P1 yaitu 9,13%. Hal tersebut disebabkan oleh

sel limfosit yang tinggi pada P1 sehingga selaras dengan jumlah monositnya karena meningkatnya aktivasi makrofag akibat dari *L. casei*. Monosit beredar melalui aliran darah, menembus dinding kapiler masuk kedalam jaringan penyambung. Jaringan bereaksi dengan limfosit dan memegang peranan penting dalam pengenalan dan interaksi sel-sel *immunocompetent* dengan antigen.

4. Pengaruh Perlakuan terhadap Jumlah Basofil

Berdasarkan analisis ragam didapatkan hasil seperti pada Tabel 2 bahwa pemberian perlakuan tidak berpengaruh nyata terhadap jumlah basofil broiler ($P>0,05$). Tabel 2 menunjukkan bahwa kadar basofil berada dikisaran normal. P0 memiliki kadar basofil tertinggi yaitu 0,20% sehingga dapat diduga bahwa P0 terinfeksi penyakit atau ada alergi. Begitupun dengan P2 yang memiliki kadar 0,13% menandakan bahwa ternak broiler terinfeksi penyakit atau terjadi alergi. Namun, perlu dilakukan pemeriksaan di laboratorium lebih lanjut untuk mengetahuinya.

5. Pengaruh Perlakuan terhadap Jumlah Eosinofil

Berdasarkan analisis ragam bahwa perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P>0,05$). Tabel 2 terlihat jumlah rataan pada sel eosinofil berada di kisaran normal. Eosinofil yang berada di kisaran normal diduga karena adanya alergi atau peradangan yang terjadi karena adanya parasit di dalam tubuh broiler, namun perlu dilakukan pemeriksaan di laboratorium untuk melihatnya. P0 memiliki kadar eosinofil tertinggi yaitu 2,07%. Hal tersebut diduga karena adanya infeksi parasit pada tubuh ternak broiler sehingga menghasilkan kadar eosinofil tertinggi. Eosinofil merupakan parameter untuk melihat ada atau tidaknya alergi dan infeksi parasit pada ternak.

Kresno (2001) menambahkan, eosinofil berperan dalam reaksi alergi, serangan parasit dan jumlahnya akan terus meningkat selama serangan alergi. Antibodi yang dihasilkan dari limfosit akan menurun akibat adanya aktivitas fagositosis selektif dari eosinofil sehingga limfosit ternak broiler pada P0, P2, dan P3 lebih sedikit akibat adanya aktivitas tersebut. Adanya *L. casei* yang mengaktifkan makrofag sehingga dapat merangsang

pembentukan antibodi menyebabkan P1 yang menggunakan probiotik A memiliki kadar eosinofil rendah yaitu 0,73%. P1 memiliki kadar eosinofil terendah sehingga dapat diketahui bahwa pada ternak broiler P1 tidak ada infeksi parasit dan alergi yang terjadi.

SIMPULAN

Simpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa pemberian probiotik yang berbeda berpengaruh sangat nyata ($P<0,01$) terhadap total *leukosit* dan berpengaruh nyata ($P<0,05$) terhadap limfosit dan neutrofil broiler dan pemberian probiotik P1(probiotik A) memiliki pengaruh yang terbaik terhadap total *leukosit* dan diferensial *leukosit*.

DAFTAR PUSTAKA

Collins, M.D., dan G. R Gibson. 1999. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. The Amer J ClinNutr. 69: 1052—1057.

Djunaedi, D. 2007. Pengaruh probiotik pada respon imun. Jurnal Kedokteran Brawijaya 23: 22—27

Dukes, E.H. 1995. The Physiology of Domestic Animal. 7th Edition. mmestoc Publishing Associates Cornell University Press. Ithac. New York

Erickson K. L., dan N. E. Hubbard. 2000. Probiotic immunomodulation in health and disease. J Nutr. 130: 403-409

Junguera, L. C. 1977. Basic Histology. Edisi 8. McGraw-Hill. New York

Kresno, S. 2001. Imunologi Diagnosis dan Prosedur Laboratorium. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta

Lopez, J., 2000. Probiotics in animal nutrition. Asian-Aus. J. Anim Sci. 13 : 12-26

Nur, E. W. 2011. Peran probiotik untuk kesehatan. Jurnal Kesehatan 4:14—20

Romanelli, R., R. Mancini, C. Aschinger, C.M.Overall, J. Sodek, dan C.A.GMcCulloch. 1999. Activation of neutrophil collagenase in periodontitis. J. Dent. Ifec. Immun. 67 : 19—26

Tizard, I. R. 2000. Veterinary Immunology and Introduction. Saundres. USA