

**EFEKTIVITAS EKSTRAK DAN SIMPLISIA TANAMAN CIPLUKAN
(*PHYSALIS ANGULATA L.*) TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI
ORGAN LIMPA YANG DIINFEKSI VIRUS *NEWCASTLE DISEASE* (ND)**
*Efectivity of Ciplukan Plant Extract and Simplicia (*Physalis Angulata L.*) on Histopathology
of The Spleen Infected with Newcastle Disease Virus (NDV)*

Rama Juwita Fitri¹, Yulia Yelita^{2*}, Montesqrit², Ananda²

¹Program Pascasarjana Ilmu Peternakan, Universitas Andalas, Padang – Indonesia

²Fakultas Peternakan, Universitas Andalas, Padang – Indonesia

*Corresponding Author: yuliayelita@ansci.unand.ac.id

ABSTRACT

*The aim of this study was to determine the effectiveness of simplicia preparations and the ethanol extract of the ciplukan plant (*Physalis angulata L.*) on the histopathology of the spleen of broiler chickens infected with the Newcastle Disease (ND) virus. The research material used 24 CP 707 DOC broiler chickens, ciplukan plants (extracts and simplicia), velogenic ND isolate, Medivac ND® commercial live ND vaccine, commercial broiler complete ration. The design of this study was a completely randomized design (CRD) with a combination of treatments obtained by 8 treatments with 3 replications. The data obtained were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and continued with Duncan's test at 5% level. The results showed that there was a very significant difference $p < 0.01$ between the K1 and K2 treatment groups with E1, E2, E3, S1, S2 and S3. The S3 treatment group showed better histopathological changes than E3. In conclusion, administration of simplicia and ethanol extract of the ciplukan plant (*Physalis angulata L.*) has effectiveness on the histopathological appearance of spleen in broiler chickens infected with Newcastle Disease (ND) virus in several dose levels.*

Keywords: *Physalis Angulata*, Newcastle disease, Spleen

ABSTRAK

Penelitian bertujuan untuk mengetahui efektivitas sediaan simplisia dan ekstrak etanol tanaman ciplukan (*Physalis angulata L.*) terhadap histopatologi organ limpa ayam broiler yang diinfeksi virus *Newcastle Disease* (ND). Materi penelitian ini menggunakan DOC ayam broiler CP 707 berjumlah 24 ekor, tanaman ciplukan (ekstrak dan simplisia), isolat ND velogenik, Vaksin ND *live* komersil Medivac ND®, Ransum komplet broiler komersil. Rancangan penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan kombinasi perlakuan diperoleh sebanyak 8 perlakuan dengan 3 ulangan. Data yang diperoleh dianalisis dengan *analysis of varian* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Duncan taraf 5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan sangat nyata $p < 0,01$ antara kelompok perlakuan K1 dan K2 dengan E1, E2, E3, S1, S2 dan S3. Kelompok perlakuan S3 menunjukkan perubahan histopatologi lebih baik dibandingkan E3. Kesimpulan pemberian sediaan simplisia dan ekstrak etanol tanaman ciplukan (*Physalis angulata L.*) memiliki efektivitas terhadap gambaran histopatologi organ limpa ayam broiler yang diinfeksi virus *Newcastle Disease* (ND) dalam bebrbagai tingkatan dosis.

Kata kunci: *Physalis Angulata*, Newcastle disease, Limpa

PENDAHULUAN

Newcastle Disease (ND) merupakan salah satu penyakit infeksius bersifat endemik yang ditemukan di berbagai daerah di Indonesia dan menyebabkan kerugian ekonomi di industri perunggasan Indonesia (Kencana

dkk., 2019). Penyebab penyakit ND adalah virus *Avian paramixovirus-1*, termasuk dalam genus *Avulavirus* dan famili *Paramyxoviridae*. Penyakit ND memiliki angka kematian dan angka kesakitan mencapai 50--100% pada strain velogenik, strain mesogenik 50% dan strain lentogenik 30% (Risa dkk., 2014; Pranatha

dkk., 2018). Penyakit ND menyebabkan gangguan pada sistem pencernaan pernafasan, dan syaraf pada ayam. Virus ND menurut Beard dan Hanson (1981) dalam Hewajuli dan Dharmayanti (2011) berdasarkan tingkat keganasan dan tanda klinis yang ditimbulkan dibagi menjadi lima yaitu: a. *Viscerotropic velogenic* (VVND) atau bentuk *Doyle's*, b. *Velogenic neurotropic Newcastle Disease* (VNND) atau bentuk *Beach's*, c. *Newcastle disease* bentuk *Beaudette's*, d. Bentuk *Hitchner's* dan 5. *asymptomaticenteric* (Wibowo dkk., 2013; Abdisa dan Tagesu, 2017).

Obat yang efektif untuk mengatasi infeksi virus ND belum ditemukan. Upaya pencegahan penyakit dapat dilakukan dengan meningkatkan daya tahan tubuh yaitu meningkatkan efektivitas sistem sel-sel agar imun dapat terus melawan penyebab penyakit (Kumala dkk., 2004). Sistem imun merupakan sistem yang berperan penting untuk mempertahankan keseimbangan dan kesehatan tubuh. Gangguan pada sistem ini dapat menyebabkan sistem kekebalan tubuh menurun. Pencegahan penyakit ND dapat dilakukan dengan vaksinasi. Namun, beberapa laporan penelitian menunjukkan adanya penyakit ND tetap muncul meskipun telah dilakukan vaksinasi. Tindakan untuk meningkatkan imunitas ayam pasca vaksinasi perlu diberikan substansi yang dapat mengatur sistem imun (imunomodulator). Salah satunya dengan penggunaan tanaman herbal untuk meningkatkan sistem imun setelah vaksinasi sehingga mengstimulasi jumlah antibodi (Dewanti, 2017).

Salah satu tanaman herbal yang mempunyai aktivitas imunomodulator adalah tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.). Imunomodulator merupakan substansi atau obat yang dapat memodulasi aktivitas dan fungsi sistem imun (Wahyuni dkk., 2017). Imunomodulator membantu tubuh untuk mengoptimalkan fungsi sistem imun yang merupakan sistem utama yang berperan dalam menginduksi

mekanisme pertahanan bawaan (*innate*) maupun adaptif (*adaptive*) (Shahbazi dan Bolhassani, 2016; Arjana, 2016). Senyawa-senyawa tersebut yang dapat memodulasi sistem imun dapat diperoleh dari tanaman. Menurut Astuti (2016) tanaman ciplukan memiliki senyawa kimia flavonoid, tannin, saponin, dan polifenol. Berbagai penelitian telah membuktikan aktivitas imunomodulator juga terdapat pada tanaman ciplukan. Penelitian Wirawan (2019) pada ekstrak etanol daun ciplukan terdapat senyawa metabolit alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan polifenol. Hal ini didukung oleh penelitian Jannah (2021) juga menunjukkan ekstrak etanol daun ciplukan mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, glikosida, tanin, saponin, dan steroid. Metabolit sekunder tanaman ciplukan memiliki sifat imunomodulator seperti flavonoid, saponin, dan tanin.

Pengujian efek imunomodulator tanaman ciplukan memerlukan organ limfoid sebagai parameter pengamatan. Limpa merupakan organ limfoid sekunder yang mempunyai fungsi untuk memproduksi sel-sel limfosit (Novantri dkk., 2017). Kurnia dkk. (2020) melakukan pengujian untuk melihat limpa ayam kampung yang diberi jamu daun ashitaba pasca vaksinasi ND. Hasil penelitian menunjukkan pemberian jamu daun ashitaba secara histopatologi dapat menurunkan diameter dan jumlah pulpa putih limpa. Penelitian tentang ekstrak ciplukan pada unggas belum banyak dilaporkan. Hal ini dikarenakan aplikasinya yang masih sulit untuk dilakukan karena biaya pembuatan ekstrak relatif mahal danakan menyebabkan biaya produksi peternak membengkak. Alternatif lainnya dengan menggunakan tanaman ciplukan dalam bentuk sediaan simplia (serbuk). Penggunaan dengan bentuk sediaan simplia lebih mudah dan lebih ekonomis diaplikasi peternak. Penelitian tentang pemanfaatan tanaman ciplukan dalam bentuk sediaan simplia belum banyak ditemukan.

MATERI DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium KOBA FMIPA, Laboratorium Peternakan Universitas Andalas dan Laboratorium Balai Veteriner Bukittinggi pada bulan Februari – Mei tahun 2022.

Metode Penelitian

Propagasi virus *Newcastle disease*

Isolat ND strain velogenik dari Balai Veteriner Lampung terlebih dahulu lakukan uji HA plate. Prinsip dari uji HA yaitu terjadinya Aglutinasi eritrosit oleh haemaglutinin yang bertujuan untuk mengukur titer antigen Lubang pada mikro plat dengan menggunakan mikro pipet dari lubang 1 – 12 diisi masing-masing 25 μ l PBS. Pada lubang pertama ditambahkan isolate 25 μ l yang akan diuji dan selanjutnya dibuat pengenceran sampai lubang ke-11. Tambahkan 25 μ l suspensi RBC 1% pada masing-masing lubang lalu dihomogenkan dan didiamkan pada suhu kamar selama 45 menit. Hasil uji HA positif ditunjukkan apabila berbentuk seperti pasir halus pada dasar sumuran plat mikro.

Selanjutnya isolat ND dipropagasi dengan metode *in ovo*. Telur yang digunakan adalah telur ayam berembrio berumur 9--11 hari sebanyak 5 butir. Isolat virus ND ditambah dengan larutan antibiotik Penisilin-streptomisin, kemudian biarkan kurang lebih 1-2 jam pada suhu ruang selama sebelum inokulasi. Propagasi dilakukan dengan menginokulasikan virus ND ke dalam telur ayam berembrio pada ruang allantois. Desinfeksi dengan alkohol 70% bagian rongga udara selanjutnya inkubasi selama 7 hari pada suhu 37 °C lalu dipanen allantois dan uji kembali titer virusnya menggunakan uji HA.

Titirasi virus ND pasca progasasi

Uji titirasi visus ND dapat diukur menggunakan uji *Virus Content Test* (VCT). Uji ini dilakukan dengan

menggunakan 40 butir telur berembrio telur berembrio berumur 9-11 hari. Pengenceran virus dilakukan secara bertingkat dimana suspensi virus ND diencerkan menggunakan PBS sampai 6 kali (10^{-6}) di mana 1 pengenceran menggunakan 5 butir telur. Kontrol negatif diberikan PBS dan positif diberikan isolat ND. Inokulasi virus pada ruang alantois. Inkubasi selama 7 hari pada suhu 37 °C dan Peneropongan (*candling*) dilakukan pada telur embrio setiap hari. Lalu dilakukan pembacaan penentuan titer EID₅₀.

Penghitungan titer virus dilakukan dengan menghitung *endpoint* dari pengenceran virus yang menyebabkan kematian 50% populasi (jumlah telur/n) yang digunakan. *Endpoint* tidak dapat diukur berdasarkan data secara langsung, sehingga digunakan perhitungan menggunakan metode Reed dan Muench Tahun 1938 (Zaidun, 2013).

Penentuan dosis untuk uji tantang

Setelah diketahui EID₅₀ dari isolat ND selanjutnya penentuan dosis uji tantang merujuk pada penelitian Shunlin dkk. (2009) dengan dosis $10^{5.5}$ EID₅₀/ ekor (0,05 mL melalui tetes mata). Jika hasil EID₅₀ didapatkan melebihi $10^{5.5}$ EID₅₀/ekor maka dilakukan pengenceran dengan PBS.

Pembuatan preparat histologi

Organ limfoid yang akan dilihat gambaran mikroskopisnya adalah organ limpa untuk melihat efektifitas imunomodulator dari ekstrak ciplukan. Sediaan limpa difiksasi dalam larutan *Buffer Netral Formalin* (BNF) 10% pada suhu kamar selama 2x24 jam. Dimasukan ke dalam alkohol 70% sebagai *stopping point*. Selanjutnya didehidrasi menggunakan alkohol konsentrasi bertingkat (80%, 90%, 95%, absolut). Lalu jernihkan dengan menggunakan xylol I, II, dan III. Kemudian tahap paraffinisasi, *blocking* dan *sectioning*. Tahapan selanjutnya pewarnaan hematoksilin-eosin

dan keringkan preparat dan teteskan zat perekat lalu tutup dengan *cover glass*.

Analisis Data

Rancangan penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 8 kombinasi dan 3 ulangan. Data histopatologi organ limpa yang diperoleh dianalisis dengan *analisis of varian* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Duncan taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Propagasi Virus *Newcastle disease*

Uji hemaglutinasi merupakan dasar untuk menentukan titer virus. Prinsip uji ini adalah untuk mengetahui kemampuan virus dalam mengaglutinasi eritrosit dengan mengamati hasil pada dasar sumuran yang paling akhir yang menunjukkan adanya hemaglutinasi positif

(Rozi dkk., 2020). Hasil uji HA pada isolat virus *Newcastle disease* strain velogenik yang berasal dari Balai veteriner Lampung adalah 2^9 . Titer dengan nilai 2^9 HA Unit memiliki arti bahwa pengenceran ke-9 merupakan pengenceran tertinggi yang mampu mengaglutinasi eritrosit secara sempurna, sedangkan 1 HAU setara dengan 10^7 partikel virus.

Titrisasi Virus ND Pasca Progasasi

Setelah titer virus diperoleh selanjutnya dilakukan *Virus Content Test* (VCT). Uji VCT digunakan untuk mengetahui titer virus yang infeksi menggunakan *Egg Infectious Dose 50* (EID₅₀) artinya dosis yang digunakan mampu menginfeksi 50% populasi embrio ayam. Hasil perhitungan EID₅₀ dengan metode Reed dan Muench tahun (1938) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Perhitungan EID₅₀ dengan Metode Reed dan Muench (1938)

Pengenceran Virus	Jumlah Telur	Respon embrio		Jumlah Akumulas			Persentasi infeksi (5) A(A+B) x 100
		Jumlah infeksi	Jumlah tidak terinfeksi	Infeksi (A)	Tidak infeksi (B)	Total (A+B)	
10^{-4}	5	5	5	13	0	13/13	100
10^{-5}	5	4	1	8	1	8/9	88
10^{-6}	5	3	2	4	3	4/7	57
10^{-7}	5	1	4	1	7	1/8	12,5
10^{-8}	5	0	5	0	13	0	0

Berdasarkan Tabel 1. dapat dihitung dengan metode Reed dan Muench (1938) sebagai berikut:

$$\begin{aligned} PD &= \frac{57-50}{57-12,5} \\ &= 0,15 \end{aligned}$$

Sehingga diperoleh pengenceran virus yang menyebabkan kematian 50% populasi ayam (EID₅₀) dengan rumus:

$$\begin{aligned} \text{Log dari } 50\% &= \log \text{ pengenceran di atas } 50\% - (PD \times \log h) \\ &= (-6) - (0,15 \times 1.0) \\ &= 10^{6,5} \text{ EID}_{50}/0.1 \text{ ml} \\ &= 10^{7,5} \text{ EID}_{50}/1 \text{ ml} \end{aligned}$$

Hasil pengujian titrisasi virus dengan ini EID₅₀ menunjukkan titer virus *Newcastle disease* adalah sebesar $10^{6,5}$ EID₅₀/0.1 ml atau $10^{7,5}$ EID₅₀/1 ml. Uji EID₅₀ bertujuan untuk menghitung titer virus yang hidup dalam suatu suspensi virus. Titer virus ini diperlukan pada ujiantang yang diperlukan dalam jumlah tertentu sehingga

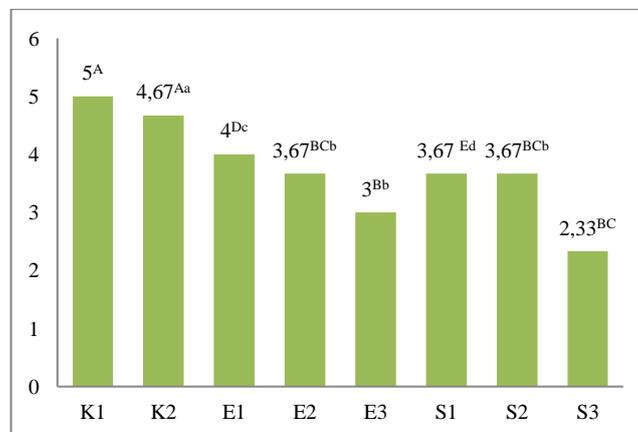
mampu menginfeksi ayam. Volume yang diperoleh dari uji EID₅₀ menggunakan telur ayam berembrio (TAB) adalah 32 ml dimana terdapat 10^{6,5} EID₅₀/0.1 ml. Untuk ujiantang maka dilakukan pengenceran menggunakan PBS sehingga diperoleh dosis ujiantang 10^{5,5} EID₅₀/0.1 ml pada setiap ekor ayam yang diinfeksi virus *Newscaste disease*.

Histopatologi Limpa

Hasil pengamatan histopatologi organ limpa menunjukkan bahwa terdapat perbedaan sangat nyata $p < 0,01$ antara kelompok perlakuan K1, K2 dengan E1, E2, E3, S1, S2 dan S3 terlihat pada Gambar 2. Kelompok perlakuan K1 menunjukkan inflamasi terlihat ditemukannya lesi yang berisi eritrosit bercampur dengan sel radang pada pulpa merah dan dan deplesi sel limfosit tahap parah, sedangkan kelompok K2 ditemukan nekrosis pada inti sel dan deplesi sel limfosit tahap parah terlihat pada Gambar 3. Kelompok perlakuan pemberian berbagai level ekstrak etanol tanaman ciplukan kelompok perlakuan S3 menunjukkan deplesi tahap ringan dibandingkan E1 dan E2 deplesi sel limfosit tahap sedang. Kelompok perlakuan pemberian berbagai level simplisia tanaman ciplukan menunjukkan perlakuan S3 perubahan hemoragi tahap

ringan sedangkan S1 dan S2 ditemukan adanya deplesi sel limfosit tahap sedang. Kelompok perlakuan S3 menunjukkan perubahan histopatologi lebih baik dibandingkan E3. Menurut Nofantri dkk. (2017), perubahan histopatologi yang menonjol dalam organ limfoid karena infeksi virus VVND ditemukan deplesi, degenerasi, lesi nekrosis pada jaringan limfoid. Deplesi limfosit pada jaringan limfoid merupakan respon inflamasi akut yang mengaktivasi mediator inflamasi akibat migrasi heterofil dan limfosit dari organ limfoid ke tempat inflamasi.

Menurut Nuranda dkk. (2016), tanaman ciplukan mengandung metabolit sekunder yaitu senyawa golongan alkaloid, flavonoid, steroid dan saponin. Mekanisme flavonoid dalam meningkatkan sistem imun adalah dengan memicu proliferasi dan diferensiasi sel B, meningkatkan jumlah sel T dan aktivitas IL-2 serta sel Natural Killer (NK). Sel NK diaktivasi untuk merangsang produksi interferon γ . IFN- γ merupakan sitokin utama MAC (*Macrophage Activating Cytokine*) yang berperan terutama dalam imunitas seluler non spesifik sehingga meningkatkan aktivitas fagositosis pada makrofag secara efektif dalam melawan dan membunuh antigen (Baratawidjaja, 2010).

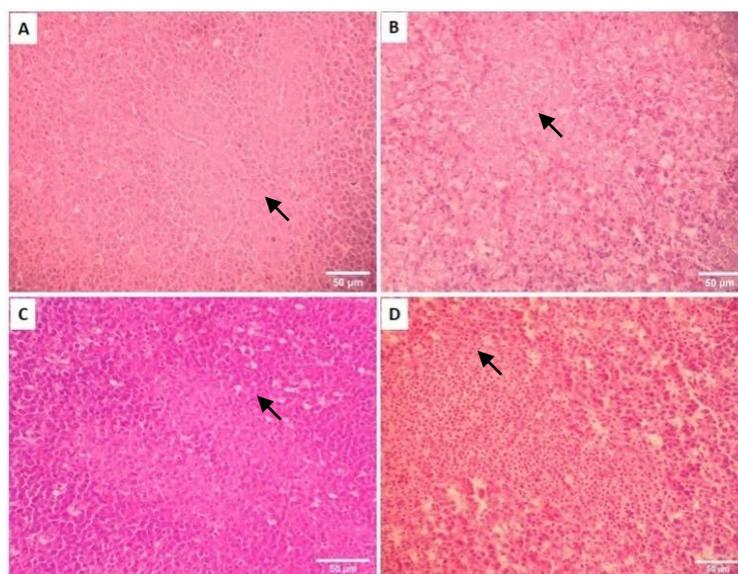


Keterangan: ^{A,B,C,D} Superksrip huruf besar menyatakan berbeda sangat nyata ($p < 0,01$)
^{a,b,c} Superksrip huruf kecil menyatakan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Gambar 1. Grafik nilai skor perubahan histopatologi pada limpa yang diinfeksi virus *Newcastle Disease*

Penelitian ini juga menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak dan simplisia tanaman ciplukan maka kemampuan imunostimulan semakin meningkat sehingga konsistensi dan ukuran limpa membesar merupakan bentuk respon velogenik yang merangsang sel-sel limfosit untuk membentuk antibodi dalam melawan infeksi ND strain velogenik pada organ limfoid. Fry dan McGavin (2012) menyatakan bahwa bagian pulpa merah limpa berfungsi dalam menyaring material asing, mikroorganismen serta membuang

eritrosit tua dan rusak, sedangkan pulpa putih berperan dalam membentuk kekebalan tubuh. Pulpa putih limpa mengandung limfosit T maupun limfosit B. Sel limfosit B berperan dalam respon imun humoral dan menghasilkan antibodi. Sel limfosit T berperan dalam respon imun selular Wiranto (2020) menambahkan tingkatan umur unggas adalah faktor yang mempengaruhi berat limpa, diameter dan bentuk histologis organ limpa.



Gambar 2. Gambaran mikroskopis organ limpa (A. Kontrol negatif, B. Kontrol positif, C. Ekstrak 0,35 mg/10 ml dan C. Simplisia dosis 17,5 mg/ 10 mg).

KESIMPULAN

Pemberian sediaan ekstrak dan simplisia tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.) memiliki efektivitas terhadap gambaran histopatologi limpa ayam broiler yang diinfeksi virus *Newcastle Disease* (ND). Ekstrak dan simplisia tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.) efektif sebagai imunomodulator dalam menekan kerusakan sel-sel limfoid pada limpa dengan pemberian dosis tertinggi. Pemberian sediaan simplisia variasi dosis pada dosis tertinggi 17,5 mg/10 mg memiliki efektivitas lebih baik sebagai

imunomodulator dibandingkan sediaan ekstrak dosis tertinggi 0,35 mg/10 ml.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., dan Lichtman, A. H. 2015. Basic immunology: Functions and disorders of the immune system.,PA: Elsevier Saunders, Philadelphia.
- Abdisa, T. dan Tagesu T. 2017. Review on Newcastle Disease of Poultry and Its Public Health Importance. *J. Vet. Sci.Technol.*, 08(03):1-7.
- Angi, A.H., I.W.T. Wirawan, dan S. Murtini. 2009. Kemampuan netralisasi antibodi spesifik *Avian*

- Influenza* H5 terhadap beberapa virus h5n1 isolat lapang. *Forum Pascasarjana*. 32(1) : 55-66
- Astuti, S. 2016. Aktivitas Antioksidan Ekstraks Kloroform Daun Tomat (*Solanum lycopersicum L.*) Daun Cabe Merah (*Capsicum Annum L.*) dan Daun Ciplukan (*Physalis angulata L.*) dengan Metode dpph. *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Univeristas Sebelas Maret, Surakarta.
- Dewanti, V.S. 2017. Respon Antibodi Ayam Broiler Yang Divaksinasi Newcastle Disease (ND) dan Diberikan Ramuan Herbal Fermentasi. *Tesis*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Fry, M.M., dan M.D. McGavin. 2012. Bone Marrow, Blood Cells, and lymphatic System. In McGavin., MD. Zachary JF. (Ed) *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 5th ed. St Louis. Mosby Elsevier. 698-770.
- Jannah, M. 2021. Uji Aktivitas Antidiare Ekstrak Etanol Daun Ciplukan (*Physalis Angulata Linn.*) pada Tikus Jantan yang diinduksi Oleum Ricini. *Skripsi*. Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Kurnia I. A. G. A., I. W. Sudira, dan I. B. O. Winaya. 2020. Pemberian Jamu Daun Ashitaba pada Ayam Kampung yang Divaksin Tetelo Memperkecil Diameter dan Menekan Jumlah Pulpa Putih Limpa. *Indonesia Medicus Veterinus*. 9(5): 695-704.
- Nofantri, L., Berata I.K., Anak A. A. M. A. 2017. Studi Histopatologi Limpa dan Otak Ayam Terinfeksi Penyakit Tetelo. *Indonesia Medicus Veterinus*. 6(5): 417-427
- Pranatha, W.D., R. Irhas1, H. N. P. Arhiono1, N. W. H. Widyasanti, dan I. M. Kardena. 2018. Laporan Kasus *Newcastle Diseases* Dan *Avian Influenza* Pada Ayam Buras. *Indonesia Medicus Veterinus*. 7(5): 498-507
- Risa, E., R. Semaun, dan I.D. Novita. 2014. Evaluasi Penurunan Angka Mortalitas dan Morbiditas Ayam Pedaging yang Mendapatkan Penambahan Tepung Lempuyang (*Zingiber Aromaticum Val*) Dalam Ransum. *Jurnal Galung Tropika*. 3(3) : 192-200
- Shunlin, H., H. Ma, Y. Wu, W. Liu, X. Wang, Y. Liu, dan X. Liu. 2009. A vaccine candidate of attenuated genotype VII Newcastle disease virus generated by reverse genetics. *Vaccine*. 27: 904-910
- Wibowo, S.E, Asmara W, Wibowo MH, Sutrisno B. 2013. Perbandingan tingkat proteksi program vaksinasi *Newcastle disease* pada *broiler*. *Jurnal Sains Veteriner*. 31(1) : 16-26.
- Wiranto, L. 2020. Pengaruh Metode Pemberian Probiotik *Lactobacillus* sp. Yang Berbeda Terhadap Bobot Relatif Organ Imun Ayam Broiler Fase Finisher. *Skripsi*. Fakultas Peternakan dan Pertanian UNDIP, Semarang.
- Wirawan, W. 2019. Uji ekstrak etanol daun ciplukan terhadap gambaran histopatologi ginjal tikus putih jantan diinduksi streptozotocin. *Farmakologika. Jurnal Farmasi*. 15 (2) : 124- 133.