Indonesia Medicus Veterinus Juli 2020 9(4): 604-612
pISSN : 2301-7848; eISSN : 2477-6637 DOI: 10.19087/imv.2020.9.4.604
online pada http://ojs.unud.ac.id/php.index/imv

Pemberian Jamu Daun Ashitaba pada Ayam Kampung Tidak Memengaruhi Respons Antibodi terhadap Flu Burung Subtipe H5N1

(*ASHITABA LEAF HERBAL MEDICINE DISTRIBUTION DOESN'T INFLUENCE ANTIBODY RESPONSES AGAINST H5N1 SUBTYPE AVIAN INFLUENZA TO KAMPONG CHICKEN*)

I Putu Krisna Ardhia Pradnyandika[1], I Wayan Sudira[2], Ida Bagus Kade Suardana[3]

[1]Mahasiswa Pendidikan Sarjana Kedokteran Hewan,
[2]Laboratorium Fisiologi, Farmakologi dan Farmasi Veteriner,
[3]Laboratorium Virologi Veteriner,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,
Jl. Sudirman, Sanglah, Denpasar, Bali, Indonesia, 80234;
Telp/Fax: (0361) 223791
e-mail: krisnaardhia@gmail.com

ABSTRAK

Flu burung (*Avian Influenza*) atau AI merupakan penyakit zoonosis berbahaya dengan angka morbiditas dan mortalitas tinggi. Pencegahan penyakit flu burung dilakukan dengan cara melakukan vaksinasi. Permasalahan di lapangan, tidak semua vaksin dapat menghasilkan titer antibodi yang tinggi akibat berbagai faktor. Salah satu upaya yang bisa dilakukan untuk mengatasi hal tersebut adalah pemberian bahan yang mampu merangsang sistem imun (imunostimulator). Bahan alami yang mempunyai sifat sebagai imunostimulator adalah *chalcone* yang banyak terkandung pada tanaman ashitaba (*Angelica keiskei*). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pemberian jamu daun ashitaba untuk meningkatkan titer antibodi pada ayam kampung pascavaksinasi flu burung. Penelitian ini menggunakan 25 ekor ayam kampung yang dibagi menjadi lima perlakuan yang terdiri dari: P_0 (kontrol), P_1 (50 mg/ekor/hari), P_2 (100 mg/ekor/hari), P_3 (200 mg/ekor/hari) dan P_4 (400 mg/ekor/hari). Pemberian jamu daun ashitaba dilakukan satu kali sehari selama dua minggu. Pada hari ke-21 dilakukan vaksinasi dengan vaksin flu burung subtipe H5N1. Minggu ke-1, ke-2 dan ke-3 pascavaksinasi dilakukan pengambilan darah. Pemeriksaan titer antibodi flu burung dilakukan dengan uji serologi *Haemaglutination Inhibition* (HI). Hasil penelitian menunjukkan rataan titer antibodi setiap perlakuan yaitu 2,4 HI log 2; 2,6 HI log 2; 3,8 HI log 2; 3,4 HI log 2; dan 1,8 HI log 2 yang artinya pemberian jamu daun ashitaba tidak dapat meningkatkan titer antibodi, sedangkan waktu pengambilan darah berpengaruh sangat nyata terhadap peningkatan titer antibodi pada minggu ketiga pascavaksinasi. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian jamu daun ashitaba pada ayam kampung tidak meningkatkan titer antibodi flu burung subtipe H5N1.

Kata-kata kunci: ashitaba; flu burung/*avian influenza*; titer antibodi; ayam kampung

ABSTRACT

Avian Influenza or AI is a dangerous zoonotic disease with high morbidity and mortality rates. Prevention of Avian Influenza could be done by giving vaccination. The frequent problems with vaccination, is not all vaccines can produce high antibody titers due to various factors. One effort that can be done to overcome the problem is the provision of materials that can stimulate the immune system (immunostimulator). Natural ingredient that has properties as an immunostimulator is *chalcone* which is contained in ashitaba (*Angelica keiskei*). The aim of this research was to determine the application of ashitaba leaf herbal medicine to increase antibody titer in kampong chicken postvaccination of Avian Influenza. This study used 25 kampong chickens, divided into five

treatments consisting of: P_0 (control), P_1 (50 mg/head/day), P_2 (100 mg/head/day), P_3 (200 mg/head/day), and P_4 (400 mg/head/day). The treatments were given once a day for two weeks. On the 21th day was treated a vaccination with Avian Influenza H5N1 subtype vaccine. The first, second and third week after vaccination, blood sample test was taken. Examination of Avian Influenza antibody titer was performed by serologic test Haemaglutination Inhibition (HI). The results showed the mean of antibody titers for each treatment is 2.4 HI log 2; 2.6 HI log 2; 3.8 HI log 2; 3.4 HI log 2 and 1.8 HI log 2 means ashitaba leaf herbal medicine cannot increase antibody titer, while blood sampling time has a very significant effect on increasing antibody titer in the third week post-vaccination. This shows that the giving of ashitaba leaf herbal medicine to kampong chickens does not increase the H5N1 subtype Avian Influenza antibody titer.

Keywords: ashitaba; avian influenza; antibody titer; kampong chicken

PENDAHULUAN

Sektor peternakan unggas, terutama peternakan ayam masih menjadi prioritas untuk memenuhi kebutuhan protein hewani masyarakat. Salah satu jenis ayam yang banyak diternakan adalah ayam kampung. Banyaknya jumlah ayam kampung yang diternakkan karena pemeliharaannya relatif mudah dengan teknologi yang sederhana dan sewaktu-waktu dapat dijual jika ada keperluan rumah tangga yang mendesak (Noferdiman *et al.*, 2014). Menurut Mahmud *et al*. (2017), ayam kampung merupakan ayam asli Indonesia yang memiliki keunggulan cita rasa daging yang khas, dapat beradaptasi dengan lingkungan sekitar, lebih tahan terhadap cuaca dan penyakit dibandingkan dengan ayam pedaging/*broiler*. Meskipun tahan terhadap penyakit, ada beberapa penyakit yang menjadi perhatian khusus pada ayam kampung salah satunya adalah flu burung/*Avian Influenza*.

Flu burung termasuk dalam kelompok penyakit hewan menular berbahaya karena bersifat zoonosis yang mematikan. Upaya pencegahan flu burung dilakukan dengan cara meningkatkan *biosecurity* dan melakukan vaksinasi (Nurcholis *et al.*, 2009). Permasalahan yang ada di lapangan, tidak semua vaksin dapat menghasilkan titer antibodi yang tinggi. Hal ini terjadi karena beberapa faktor, seperti jenis vaksin, vaksinator, dan individu yang divaksin (Pratiwi *et al.*, 2019). Titer antibodi pascavaksinasi merupakan parameter keberhasilan vaksinasi. Salah satu upaya yang bisa dilakukan untuk mengatasi hal tersebut adalah pemberian bahan yang mampu merangsang sistem imun (imunostimulator) sehingga dapat meningkatkan titer antibodi pascavaksinasi. Salah satu bahan alami yang mempunyai sifat sebagai imunostimulator adalah tanaman ashitaba (*Angelica keiskei*). Selain sebagai imunostimulator, tanaman ashitaba juga mempunyai aktivitas sebagai imunomodulator yang dapat memperbaiki sistem imun dengan menekan reaksi imun yang abnormal (Sudira dan Merdana, 2017).

Ashitaba merupakan tanaman yang mempunyai banyak khasiat seperti antioksidan dan mengatasi kanker, dari famili *Apiaceae* (*Umbelliferae*) yang banyak tumbuh di Desa Sembalun, Lombok Timur, Nusa Tenggara Barat (Wirasisya *et al*., 2018; Okuyama *et al*., 2007). Pada tanaman ashitaba, terdapat senyawa *chalcone* yang mengandung metabolit sekunder golongan flavonoid yaitu *4-hydroxyderricin* dan *xanthoangelol* yang dianggap sebagai senyawa aktif utama karena fungsi fisiologisnya (Nakamura *et al*., 2012; Akihisa *et al*., 2003). Menurut Okuyama *et al*. (2007), ekstrak ashitaba pada respons imun spesifik dapat meningkatkan proliferasi limfosit T dan meningkatkan sekresi *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF-α), *Interferon gamma* (IFN-γ), dan *Interleukin 10* (IL-10).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian jamu daun ashitaba secara oral dengan dosis bervariasi dan waktu pengambilan darah terhadap peningkatan titer antibodi ayam kampung pascavaksinasi flu burung subtipe H5N1.

METODE PENELITIAN

Objek yang digunakan dalam penelitian ini adalah serum darah 25 ekor ayam kampung yang telah diberikan jamu daun ashitaba dan vaksin flu burung subtipe H5N1. Ayam kampung dibagi ke dalam lima perlakuan secara acak yaitu: perlakuan kontrol yang tidak diberikan jamu daun ashitaba (P_0), perlakuan jamu daun ashitaba dengan dosis 50 mg/ekor/hari (P_1), perlakuan jamu daun ashitaba dengan dosis 100 mg/ekor/hari (P_2), perlakuan jamu daun ashitaba dengan dosis 200 mg/ekor/hari (P_3), dan perlakuan \jamu daun ashitaba dengan dosis 400 mg/ekor/hari (P_4). Ayam kampung terlebih dahulu diadaptasikan dengan lingkungan kandang selama tujuh hari. Setelah itu, dilakukan pemberian jamu daun ashitaba secara oral melalui air minum selama 14 hari dan dilakukan pengambilan darah awal sebelum vaksinasi.

Pada hari ke-21 dilakukan vaksinasi dengan vaksin flu burung subtipe H5N1. Pengambilan darah ayam kampung dilakukan pada minggu pertama, kedua, dan ketiga pascavaksinasi. Darah diambil melalui jantung (*intracardial*) sebanyak 0,5-1,0 mL menggunakan spuit 1 mL. Disisakan ruang kosong pada spuit dan ditempatkan pada posisi datar kemudian didiamkan pada suhu ruangan selama 30 menit sampai dengan 1 jam hingga serum keluar. Serum yang telah terbentuk selanjutnya dipisahkan dan dimasukkan pada tabung *eppendorf*. Serum diuji dengan uji serologi *Haemaglutination Inhibition* (HI) untuk mengetahui titer antibodi. Uji *Haemaglutination Inhibition* dilakukan berdasarkan prosedur

baku dari OIE (2012) dengan dua kali ulangan. Serum diencerkan berkelipatan dua dengan larutan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) pada sumuran plat mikro 96 sumuran. Setiap sumuran ditambahkan suspensi virus flu burung 4 HA unit dan dibiarkan pada suhu kamar selama satu jam. Setelah digoyang-goyang selama 30 detik, diamati adanya hambatan hemaglutinasi pada setiap sumuran. Titer HI dinyatakan sebagai antilog pengenceran tertinggi serum yang masih mampu menghambat virus untuk menghemaglutinasi sel darah merah secara sempurna.

Data hasil penelitian diuji menggunakan sidik ragam. Data antar perlakuan yang terdapat perbedaan nyata dilanjutkan dengan uji Duncan, untuk mengetahui perbedaan pengaruh jamu daun ashitaba dari masing-masing dosis yang diberikan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian rataan titer antibodi flu burung subtipe H5N1 antar perlakuan disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rataan titer antibodi (HI log 2) ayam kampung pascavaksinasi flu burung subtipe H5N1

Perlakuan	Sebelum Vaksinasi	Minggu ke-n Pascavaksinasi		
		Minggu ke-1	Minggu ke-2	Minggu ke-3
P_0	0,0	0,0	0,6	2,4
P_1	0,0	0,4	0,6	2,6
P_2	0,0	0,4	1,6	3,8
P_3	0,0	0,4	0,2	3,4
P_4	0,0	0,8	0,8	1,8

Keterangan: P_0 = Kontrol (tanpa perlakuan); P_1 = Dosis perlakuan 50 mg/ekor/hari; P_2 = Dosis perlakuan 100 mg/ekor/hari; P_3 = Dosis perlakuan 200 mg/ekor/hari; P_4 = Dosis perlakuan 400 mg/ekor/hari.

Berdasarkan hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa pemberian jamu daun ashitaba tidak berpengaruh nyata ($P>0,05$) terhadap peningkatan titer antibodi. Pada minggu ketiga pascavaksinasi, perlakuan P_0 dan P_1 telah mencapai titer antibodi dengan tingkat protektif sebesar 40%. Perlakuan P_2 dan P_3 memiliki titer antibodi dengan tingkat protektif sebesar 80% dan perlakuan P_4 sebesar 20%. Waktu pengambilan darah pada ayam kampung berpengaruh sangat nyata ($P<0,01$) terhadap peningkatan titer antibodi flu burung subtipe H5N1 sehingga dilanjutkan dengan uji Duncan. Hasil uji Duncan disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Rataan titer antibodi (HI log 2) ayam kampung sebelum dan setelah vaksinasi

Waktu Pengambilan Darah	Rataan
Sebelum Vaksinasi	0,00[a]
Minggu ke-1 Pascavaksinasi	0,40[a]
Minggu ke-2 Pascavaksinasi	0,76[a]
Minggu ke-3 Pascavaksinasi	2,80[b]

Keterangan**:** Huruf yang sama dalam kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata, sedangkan huruf yang tidak sama menunjukkan berbeda nyata.

Hasil uji Duncan menunjukkan titer antibodi antara sebelum vaksinasi dengan minggu pertama dan kedua pascavaksinasi tidak berbeda sangat nyata (P>0,01), tetapi berbeda sangat nyata (P<0,01) dengan minggu ketiga pascavaksinasi.

Hasil penelitian menunjukkan respons imun yang terbentuk adalah respons imun primer. Respons imun primer dimulai saat tubuh unggas terpapar antigen untuk pertama kalinya sehingga titer antibodi yang terbentuk agak lambat dan relatif rendah (Suardana *et al.*, 2009). Respons sistem imun pada ayam kampung adalah respons imun spesifik humoral yang sebagai pemeran utamanya adalah sel B atau limfosit B. Sel B yang dirangsang oleh benda asing akan berproliferasi, berdeferensiasi, dan berkembang menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi (Baratawidjaja dan Rengganis, 2012). Implikasi dari rangsangan respons imun pada ayam kampung adalah terbentuknya antibodi spesifik di dalam serum. Proses terbentuknya antibodi pascavaksinasi dipengaruhi oleh berbagai faktor. Dari data titer antibodi ada beberapa individu ayam kampung yang tidak memiliki antibodi terhadap flu burung (0 HI log 2). Perbedaan tingkat respons imun pada ayam pascavaksinasi kemungkinan dipengaruhi oleh adanya perbedaan respons individu, stres saat pengambilan darah, serta dosis jamu daun ashitaba yang diminum tidak sesuai dengan dosis pemberian.

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian jamu daun ashitaba dapat meningkatkan titer antibodi ayam kampung pascavaksinasi, tetapi secara statistika tidak berpengaruh nyata. Pada perlakuan pemberian dosis jamu daun ashitaba sebesar 100 mg/ekor/hari dan 200 mg/ekor/hari dapat meningkat titer antibodi dengan tingkat protektif sebesar 80% dibandingkan dengan perlakuan kontrol yang hanya mencapai tingkat protektif sebesar 40% pada minggu ketiga pascavaksinasi. Hal ini disebabkan karena kandungan *chalcone* pada daun ashitaba berperan sebagai agen imunostimulator yang dapat meningkatkan kemampuan proliferasi sel T (Akihisa *et al*., 2003). Sel T umumnya berperan pada inflamasi, aktivasi fagositosis makrofag, serta aktivasi dan proliferasi sel B dalam

meproduksi antibodi (Baratawidjaja dan Rengganis, 2012). Namun, perlakuan dengan pemberian dosis jamu daun ashitaba sebesar 400 mg/ekor/hari justru menunjukkan hasil yang paling rendah dengan tingkat protektif sebesar 20%. Hal ini diduga disebabkan karena rasa dari jamu daun ashitaba, sehingga memerlukan waktu yang lebih lama untuk dikonsumsi oleh ayam kampung dan berkurangnya volume minum dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Lama konsumsi dari jamu daun ashitaba berpengaruh terhadap kerusakan senyawa aktif pada daun ashitaba karena lebih lama terpapar sinar matahari dibanding perlakuan lainnya. Pengurangan volume minum dapat menyebabkan dehidrasi dan kemungkinan ayam menjadi stres.

Ayam yang mengalami stres menyebabkan melemahnya sistem pertahanan tubuh. Stres akan menstimulir saraf pada hipotalamus untuk aktif mengeluarkan *Corticotropic Relasing Hormone* (CRH). Senyawa CRH akan mengaktifkan sekresi *Adrenocorticotropic Hormone* (ACTH) dalam jumlah banyak. Peningkatan senyawa ACTH akan merangsang korteks adrenal untuk aktif mengeluarkan kortikosteroid serta menyebabkan peningkatan pada sekresi glukokortikoid. Peningkatan kadar kortikosteroid dan glukokortikoid berpengaruh buruk terhadap kesehatan ayam karena menimbulkan imunosupresif yang dapat menurunkan sistem pertahanan tubuh (Naseem *et al.*, 2005). Akhir dari peristiwa tersebut adalah terjadinya atropi pada organ limfoid (bursa fabrisius) ini akan menurunkan produksi antibodi ayam (Nurkholis *et al*., 2014). Stres juga dapat memengaruhi sel limfosit melalui produksi hormon kortisol. Kortisol akan memodulasi sistem imun dengan menghambat produksi Interleukin-1 (IL-1) dari makrofag dan Interleukin-2 (IL-2) dari sel T. Dengan demikian, terjadi penurunan respons sel T, dengan berkurangnya populasi sel *T-helper*, menyebabkan berkurangnya sel B maupun sel plasma, sehingga terjadi penurunan produksi antibodi.

Pada penelitian ini yang berpengaruh sangat nyata terhadap peningkatan titer antibodi adalah waktu pengambilan darah (Tabel 2). Pemeriksaan titer antibodi pertama pada ayam kampung dilakukan sebelum vaksinasi. Pemeriksaan titer antibodi ini bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya maternal antibodi yang dimiliki ayam kampung tersebut. Hasil uji HI pada pemeriksaan pertama menunjukkan bahwa tidak ada titer antibodi yang terdeteksi pada seluruh sampel dari masing-masing perlakuan (titer antibodi 0 HI log 2) (Tabel 1). Hasil ini menunjukkan ayam kampung yang digunakan tidak memiliki maternal antibodi. Apabila terdapat maternal antibodi yang tinggi, akan mengganggu pembentukan antibodi karena maternal antibodi akan menetralisir antigen vaksin (Okwor *et al*., 2014).

Pemeriksaan titer antibodi pada minggu pertama dan kedua pascavaksinasi belum menunjukkan hasil yang baik. Dilihat dari data rataan titer antibodi (Tabel 1) menunjukkan titer antibodi masih rendah dan belum mampu melindungi ayam terhadap infeksi flu burung karena nilainya di bawah 4 HI log 2. Hal ini karena vaksin flu burung yang digunakan adalah vaksin inaktif. Vaksin inaktif mengandung *oil adjuvant* yang berfungsi sebagai depo antigen sehingga antigen vaksin akan dilepaskan secara perlahan-lahan. Diperlukan waktu yang relatif lama untuk memicu pembentukan antibodi maksimal, namun respons kekebalan yang terbentuk dapat bertahan lebih lama di dalam tubuh ayam dibandingkan dengan penggunaan vaksin aktif (Aiyer-Harini *et al*., 2013). Menurut Yulistiya *et al*. (2016) vaksin flu burung inaktif akan menghasilkan titer antibodi yang protektif setelah 3-4 minggu pascavaksinasi.

Pemeriksaan titer antibodi terakhir pada ayam kampung dilakukan pada minggu ketiga pascavaksinasi. Dari rataan titer antibodi hasil uji HI menunjukkan adanya peningkatan titer antibodi (Tabel 1). Hal ini disebabkan karena pada minggu ketiga pascavaksinasi telah terjadi proliferasi dan deferensiasi sel T dan sel B. Dari hasil uji statistika yakni uji Duncan menunjukkan titer antibodi pada ayam kampung berbeda sangat nyata, mengalami peningkatan yang signifikan dibandingkan dari pengambilan darah sebelum vaksinasi, minggu pertama dan kedua pascavaksinasi. Namun, data rerata titer antibodi pada minggu ketiga pascavaksinasi belum mencapai titer antibodi yang protektif. Rendahnya rerata titer antibodi (< 4 HI log 2) karena ayam mendapatkan vaksinasi flu burung pertama kali sehingga belum ada sel memori di sistem imun terhadap virus flu burung yang menyebabkan respons imun terhadap antigen vaksin menjadi rendah, hal ini sejalan dengan laporan Putri *et al*. (2012) yang menyatakan bahwa titer antibodi pada vaksinasi flu burung yang pertama belum mampu menghasilkan titer antibodi yang protektif.

SIMPULAN

Pemberian jamu daun ashitaba pada ayam kampung, tidak meningkatkan titer antibodi terhadap flu burung, dan waktu pengambilan darah pada ayam kampung berpengaruh terhadap peningkatan titer antibodi pada minggu ketiga pascavaksinasi.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis yang optimal dari jamu daun ashitaba untuk meningkatkan titer antibodi pascavaksinasi flu burung dan lama waktu pemberian jamu daun ashitaba sebelum vaksinasi flu burung pada ayam kampung.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Balai Besar Veteriner Denpasar, Provinsi Bali yang telah membantu dan memfasilitasi penulis dalam pemeriksaan sampel penelitian serta semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Aiyer-Harini P, Ashok-Kumar HG, Kumar GP, Shivakumar N. 2013. An overview of immunologic adjuvants-a review. *Journal Vaccines and Vaccination.* 4(1): 1-4.

Akihisa T, Tokuda H, Ukiya M, Iizuka M, Schneider S, Ogasawara K. 2003. Chalcones, coumarins, and flavanones from the exudate of *Angelica keiskei* and their chemopreventive effects. *Cancer Letters.* 201(2): 133–137.

Baratawidjaja K, Rengganis I. 2012. *Imunologi Dasar*. Edisi ke 10. Jakarta: Balai Penerbit FKUI. Pp:93-96.

Mahmud ATBA, Rudi A, Damiana RE, Irma IA. 2017. Profil darah, performans dan kualitas daging ayam persilangan kampung broiler pada kepadatan kandang berbeda. *Jurnal Veteriner.* 18(2): 247-256.

Nakamura T, Tokushima T, Kawabata K, Yamamoto N, Miyamoto M, Ashida H. 2012. Absorption and metabolism of 4-hydroxyderricin and xanthoangelol after oral administration of *Angelica keiskei* (Ashitaba) extract in mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 521: 71–76.

Naseem MT, Naseem S, Yunus M, Iqbal Z, Ghafoor A, Aslam A, Akhter S. 2005. Effect of pottasium chloride and sodium bicarbonate supplementation on thermotolerance of broiler exposed to heat stress. *Journal of Poultry Science.* 4(11): 891-895.

Noferdiman, Fatati, Handoko H. 2014. Penerapan teknologi pakan lokal bermutu dan pembibitan ayam kampung menuju kawasan village poultry farming (VPF) di Desa Kasa Lopak Alai Kabupaten Muaro Jambi (Indonesia). *Jurnal Pengabdian Masyarakat.* 29: 60-70.

Nurcholis, Dewi H, Barep S. 2009. Tatalaksana pemeliharaan ayam ras petelur periode layer di populer farm Desa Kuncen Kecamatan Mijen Kota Semarang. *Mediagro.* 5(2): 38-49.

Nurkholis DR, Tantalo S, Santosa PE. 2014. Pengaruh pemberian kunyit dan temulawak melalui air minum terhadap titer antibodi AI, IBD, dan ND pada Broiler. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu.* 2(2): 37-43.

Office International Des Epizooties (OIE). 2012. *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animal*. 7th ed. Volume 1. Paris, Perancis. Pp: 442.

Okuyama T, Takata M, Takayasu J, Hasegawa T, Tokuda H, Nishino A. 2007. Antitumor promotion by principles obtained from *Angelica keiskei*. *Planta Medica.* 57(3): 242-246.

Okwor GO, El-Yuguda A, Baba SS. 2014. Profile of maternally derived antibody in broiler chicks and in-ovo vaccination of chick embryo against newcastle disease. *World Journal of Vaccines.* 4(1): 72-80.

Pratiwi NMDK, Ardana IBK, Suardana IBK. 2019. Penambahan tepung temulawak dalam pakan meningkatkan respons imun ayam pedaging pascavaksinasi flu burung. *Indonesia Medicus Veterinus.* 8(1): 72-78.

Putri DD, Candra AA, Zairiful. 2012. Waktu vaksinasi avian influenza (AI) yang tepat untuk menghasilkan respon imunologis protektif pada ayam ras pedaging. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan.* 12(3): 150-155.

Suardana IBK, Dewi IMRK, Mahardika IGNK. 2009. Respons imun itik bali terhadap berbagai dosis vaksin avian influenza H5N1. *Jurnal Veteriner.* 10(3): 150-155.

Sudira IW, Merdana IM. 2017. Extract ashitaba (*Angelica keiskei*) improving the immune response Il-2, Ifn-Γbalb/C mice vaccinated with rabies vaccine. *Journal of Veterinary and Animal Sciences.* 1(2): 50-54.

Wirasisya DG, Juliantoni Y, Hajrin W. 2018. Pengaruh dua metode pengeringan pada aktivasi antibakteri ashitaba (*Angelica keiskei*) terhadap Streptococcus mutans. *Jurnal Farmasi Galenika.* 4(1): 18-25.

Yulistiya E, Edy P, Suharyati S. 2016. Pengaruh pemberian dosis vaksin avian influenza inaktif pada itik jantan terhadap jumlah sel darah putih dan titer antibodi yang dihasilkan. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu.* 4(4): 272- 276.