

Potensi Tanaman Obat untuk Penanggulangan Flu Burung: Uji In Vitro pada Sel Vero

Potency of Medicinal Plants for Eradication of Avian Influenza : In Vitro Test on Vero Cells

Agus Setiyono¹, Nurliani Bermawie²

¹Bagian Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor,

²Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik, Bogor

Email: agussetiyo@yahoo.com

Abstract

Some of medicinal plants indicate their potency as anti-viral such as Sambilotto (*Andrographis paniculata* Nees), Temu Ireng (*Curcuma aeruginosa* L.), Beluntas (*Pluchea indica* L.) Sirih Merah (*Piper crocatum*) and Adas (*Foeniculum vulgare*). Avian Influenza (AI) H5N1 strain viruses used in this study was isolated from field in Cikole area, West Java in July 20th 2007. To explore the potency of medicinal plants as anti-viral substance, the consecutive assays were performed by virus infection inhibition test in in vitro study using Vero cells. After the Vero cells were growing confluent, they were treated with sterilized-extract of medicinal plants either in single or combination. Furthermore, the culture cells were infected with AI H5N1 strain virus, then incubated at 37°C and examined for cytopathic effect (CPE) microscopically. The result showed that extract of Sambilotto and combination of Sambilotto and Temu Ireng were stronger than others in inhibition of virus attachment and infection to the cells. The Vero cells still alive up to 3rd day post infection with AI H5N1 virus after treatment with Sambilotto and Temu Ireng. In conclusion, extract of Sambilotto and Temu Ireng showed their potency as candidate for anti-viral substances that may needed for eradicating AI infection.

Key words : Avian Influenza, Medicinal Plants, H5N1 Virus

Abstrak

Beberapa tanaman obat menunjukkan potensinya sebagai anti-virus seperti Sambilotto (*Andrographis paniculata* Nees), Temu Ireng (*Curcuma aeruginosa* L.), Beluntas (*Pluchea indica* L.) Sirih Merah (*Piper crocatum*) dan Adas (*Foeniculum vulgare*). Virus Avian Influenza strain H5N1 yang digunakan dalam studi ini diisolasi dari lapangan di daerah Cikole, Jawa Barat pada 20 Juli 2007. Untuk mengeksplorasi potensi tanaman obat sebagai zat anti-virus, serangkaian uji hambat infeksi virus ke sel secara in vitro dilakukan menggunakan sel Vero. Setelah sel Vero tumbuh confluent, sel diperlakukan dengan ekstrak tanaman obat steril baik tunggal maupun kombinasi. Selanjutnya sel diinfeksi dengan virus Avian Influenza H5N1, diinkubasi pada suhu 37°C dan diperiksa *cytopathic effect* (CPE) menggunakan mikroskop. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak Sambilotto dan Temu Ireng baik dalam komposisi tunggal atau kombinasi lebih kuat dalam menghambat perlekatan virus dan infeksi pada sel dibandingkan dengan tanaman obat lainnya. Sel Vero masih hidup sampai hari ke-3 post-infeksi dengan virus AI H5N1 setelah perlakuan Sambilotto dan Temu Ireng. Kesimpulan penelitian ini adalah ekstrak Sambilotto dan Temu Ireng berpotensi sebagai kandidat bahan anti-virus yang mungkin diperlukan untuk memberantas infeksi AI.

Kata kunci : Avian Influenza, Tanaman Obat, Virus H5N1

Pendahuluan

Penyakit flu burung yang disebabkan virus avian influenza (AI) tipe A galur H5N1 telah menimbulkan kerugian besar karena membunuh jutaan ternak unggas di Indonesia sampai 70% dan mempengaruhi industri peternakan ayam skala kecil maupun besar. Virus yang awalnya hanya menyerang unggas kini telah merebak menyerang babi, anjing, kucing dan manusia. Hal yang paling ditakuti para ahli adalah apabila terjadi mutasi yang tidak diinginkan pada virus H5N1 maka akan terjadi pandemi yang akan menelan korban jiwa manusia sangat besar karena obatnya belum ditemukan. Di Indonesia, sampai dengan November 2011, terdapat 182 kasus flu burung positif dan 150 orang (82,42 %) diantaranya meninggal dunia (Anonim, 2012). Kondisi demikian telah menjadikan Indonesia sebagai negara dengan resiko tertinggi penyebaran flu burung di dunia. Penyakit ini dianggap sangat berbahaya karena resiko kematian pasien > 50%.

Sampai saat ini belum ditemukan cara pencegahan dan penanggulangan AI yang efektif. Obat yang ditetapkan pemerintah untuk penderita flu burung pada manusia adalah *oseltamivir carboxylate* (Tamiflu), yang bekerja sebagai inhibitor neuraminidase dan bahan bakunya berasal dari tanaman *Star anise* (*Illicium verum*). Obat ini ternyata sudah menunjukkan indikasi resistensi. Obat lainnya adalah Amantadine dan Rimantadine yang bekerja sebagai ion *channel blocker*, namun juga dilaporkan telah memicu resistensi pada virus. Mozes (2012) melaporkan bahwa 16% dari kasus H1N1 pada manusia mempunyai tipe virus yang resisten terhadap Tamiflu maupun Amantadine dan Rimantadine.

Untuk mengatasi penyakit flu burung selain menggunakan obat-obatan anti viral, penggunaan obat yang bersifat immunomodulator terhadap infeksi virus merupakan pendekatan yang penting dan bermakna. Telaah hasil penelitian penggunaan ekstrak tanaman obat terbukti dapat merubah aktivitas sistem imun terhadap infeksi melalui pengaturan sitokin (Spelman dkk., 2006). Uji coba ekstrak sirih dan kemuning untuk mengatasi penyakit TBC, ternyata mampu mengubah subset sel limfosit T-helper 2 ke arah T-helper 1, seperti yang dkehendaki pada pengobatan anti viral. Kandungan tanaman lain seperti andrographolide dari sambiloto mampu meningkatkan sekresi IL-2 dan produksi TNF- α dan meningkatkan proliferasi sel limfosit yang berperan dalam sistem imun. Data penelitian lainnya menunjukkan bahwa ekstrak temu-temuan mampu meningkatkan aktivitas sistem imun pada hewan coba (Chang dkk., 1995; Spelman dkk., 2006).

Berdasarkan kenyataan diatas maka sangat perlu dan mendesak ditemukan obat alami untuk flu burung dari tanaman obat yang berasal dari alam Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi beberapa tanaman obat dalam menghambat infeksi virus AI H5N1 melalui studi in vitro menggunakan sel lestari Vero.

Materi dan Metode

Kultur sel Vero ditumbuh-kembangkan dalam media MEM 1 dengan 10% Fetal Bovine Serum (FBS) pada temperatur 37°C, CO₂ 5%. Setelah terbentuk monolayer, sel di-passage dan didistribusikan ke dalam flask kultur dengan 96 sumuran. Setelah 2-3 hari diinkubasi, kultur sel siap

digunakan untuk eksperimen uji hambat infeksi virus AI H5N1 ke sel Vero. Penyiapan ekstrak tanaman terstandar Sambiloto, Temu Ireng, Beluntas, Sirih Merah dan Adas diawali dengan sortasi bahan, pencucian, pengeringan, penggilingan, dan ekstraksi. Ekstraksi dilakukan secara bertingkat untuk memisahkan fraksi polar, fraksi semi polar dan fraksi non polar sesuai dengan protokol *Materia Medika Indonesia* (Anonim, 1977).

Ekstraksi tanaman obat dilakukan secara tunggal. Masing-masing bahan dimasukan dalam alat ekstraktor, direndam dengan pelarut non polar (heksan) dengan perbandingan 1: 5. Dikocok selama 2 jam, kemudian didiamkan satu malam, disaring lalu saringan dipisahkan. Selanjutnya bagian ampas direndam kembali dengan heksan (1:5), dikocok selama 1 jam, disaring. Saringan pertama dan kedua dicampurkan. Bagian ampas digunakan untuk ekstraksi fraksi berikutnya. Saringan diupkan dengan vacum rotary evaporator hingga semua pelarut teruapkan, sehingga diperoleh fraksi non polar. Bagian ampas direndam dengan pelarut semi polar (etil asetat), perbandingan 1:5, dilakukan 2 kali seperti diatas. Bagian ampas digunakan untuk ekstraksi fraksi berikutnya. Saringan diupkan sehingga diperoleh fraksi semi polar. Bagian ampas direndam dengan pelarut polar (etanol), dilakukan seperti diatas. Dari saringan terakhir diperoleh fraksi polar.

Pengujian komponen fitokimia pada tahap awal dilakukan analisis skrining masing-masing bahan meliputi uji senyawa alkaloid, terpenoid, steroid, saponin, flavonoid dan tanin. Uji alkaloid dilakukan dengan ekstrak diberi 10 ml kloroform dan beberapa tetes amonia. Fraksi kloroform dipisahkan dan

diasamkan dengan H_2SO_4 2M. Fraksi asam diambil, kemudian ditambahkan dengan pereaksi Meyer, Dragendorf, dan Wagner secara sendiri-sendiri. Jika terdapat endapan putih dengan pereaksi Meyer, endapan merah jingga dengan Dragendorf dan endapan coklat dengan pereaksi Wagner maka dinyatakan positif terdapat alkaloid.

Uji terpenoid dilakukan dengan sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan eter, kemudian dipanaskan dalam gelas piala yang telah berisi air hingga pelarut menguap. Residu yang diperoleh ditambahkan beberapa ml eter. Fraksi yang larut dalam eter dipisahkan dan diletakkan dalam pelet tetes kemudian ditambahkan pereaksi Liebermann-Bouchard, yaitu 3 tetes anhidrida asam asetat dan 2 tetes H_2SO_4 pekat. Larutan positif mengandung triterpenoid jika timbul warna merah atau ungu.

Uji steroid, sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan eter, kemudian dipanaskan dalam gelas piala yang telah berisi air hingga pelarut menguap. Residu yang diperoleh ditambahkan beberapa ml eter. Fraksi yang larut dalam eter dipisahkan dan diletakkan dalam pelet tetes kemudian ditambahkan pereaksi Liebermann-Bouchard, yaitu 3 tetes anhidrida asam asetat dan 2 tetes H_2SO_4 pekat. Larutan positif mengandung triterpenoid jika timbul warna hijau atau biru.

Uji saponin, sampel ditambahkan dengan air secukupnya dan dipanaskan selama 5 menit lalu didinginkan dan dikocok kuat. Adanya saponin ditandai dengan timbulnya busa stabil selama 10 menit.

Uji flavonoid, sampel dimasukkan ke dalam gelas piala dan ditambahkan 20 ml akuades, lalu dipanaskan sampai mendidih, selanjutnya disaring

dan filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Filtrat ditambahkan 0.5 g serbuk Mg dan 0.2 ml HCl pekat serta amil alkohol kemudian dikocok dan dibiarkan memisah. Flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning dan jingga pada lapisan amil alkohol.

Uji tanin, sampel ditambahkan air secukupnya dan dipanaskan selama 5 menit. Filtrat ditambahkan FeCl_3 1% jika terbentuk warna biru tua atau hijau kehitaman berarti positif mengandung tanin.

Analisis Ekstrak

Penentuan luas area komponen kimia dalam ekstrak dilakukan analisis menggunakan metode gas kromatografi spektrometri massa (GC-MS) (Lee et al., 2005). Masing-masing bahan diekstrak sesuai dengan metode ekstraksi terbaik untuk masing-masing tanaman dengan menggunakan etanol 70%, kemudian didiamkan satu malam, baru disaring. Selanjutnya filtrat yang diperoleh diuapkan dengan menggunakan alat *rotavapor* sehingga dihasilkan ekstrak pekat. Ekstrak yang dihasilkan dianalisis kandungan kimianya. Parameter yang diamati adalah rendemen ekstrak, luas area bahan aktif, sisa pelarut serta luas area komponen kimia. Bahan aktif yang dianalisis adalah andrografolid (sambiloto), kurkuminoid (temu ireng), piperin (sirih merah), anetol (adas) dan beluntas.

Radiasi Ekstrak

Sterilisasi ekstrak tanaman obat menggunakan teknologi radiasi dilakukan agar bahan siap digunakan dan tidak ada kontaminasi pada saat pelaksanaan uji hambat infeksi secara *in vitro* di laboratorium. Radiasi dilakukan dengan tingkat radiasi yang berbeda yaitu 5 kilogray (Kgy), 7.5 Kgy

dan 10 Kgy di setiap ekstrak tanaman obat yang digunakan dalam penelitian. Pelaksanaan radiasi di Latex Radiator, Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi, Badan Tenaga Atom Nasional, Serpong, Jawa Barat.

Uji Hambat Infeksi Virus ke Sel Vero

Uji hambat infeksi virus AI ke sel Vero menggunakan metode Mi (2012) dengan minor modifikasi. Secara singkat, sel kultur yang telah didistribusikan ke dalam cawan mikrotiter 96 sumuran diinkubasi pada 37°C , CO_2 5% selama 2-3 hari hingga terbentuk monolayer, kultur kemudian dicuci dengan PBS dan diberi perlakuan 50 μl ekstrak tanaman obat setiap sumuran baik dalam komposisi tunggal maupun kombinasi selama 60 menit pada temperatur ruang. Sel kultur kemudian dicuci dengan PBS dan diinfeksi virus H5N1 isolat lokal (Cikole) dengan dosis 1×10^5 $\text{TCID}_{50}/0,1$ ml/sumuran dan dibiarkan dalam temperatur ruang selama 30 menit. Sel kultur selanjutnya dicuci lagi dengan PBS dan diinkubasi pada 37°C , CO_2 5% lalu diamati selama 3-4 hari. Evaluasi potensi tanaman obat berupa penghambatan infeksi virus H5N1 ke sel Vero diukur dengan jumlah sel kultur terinfeksi dan terbentuk cytopathic effect (CPE).

Hasil dan Pembahasan

Analisa kandungan bahan kimia tanaman obat menggunakan metode GC-MS menunjukkan variasi perbedaan yang sangat tinggi diantara tanaman obat yang digunakan dalam penelitian ini. Masing-masing tanaman dengan luas area komponen kimia tertinggi dalam kandungannya dirangkum dalam Tabel 1.

Tabel 1. Beberapa Senyawa dengan Luas Area Tertinggi Hasil Analisa Ekstrak Tanaman Obat Menggunakan Metode Gas Kromatografi Spektrometri Massa (GC-MS)

No.	Tanaman obat	Jumlah senyawa	Senyawa dengan luas area tertinggi	Luas area (%)
1.	Temu Ireng Yogyakarta	47	8H-acenaphtho [1,2-c] pyridazin - 9-on	13.97
2.	Temu Ireng Jakarta	48	2 ethyl-5,6,7,8-tetrahydro-8,9,9 (5)	12.92
3.	Temu Ireng Bogor	46	1,8,8-trimethylfuro [3,4-c] bycyclo	19.51
4.	Beluntas Bogor	22	9, 12, 15-octadecatrienoic acid, met (Omega 3)	27.67
5.	Beluntas Cicurug	30	9, 12, 15-octadecatrienoic acid, met (Omega 3)	28.71
6.	Beluntas Manoko	39	9, 12, 15-octadecatrienoic acid, met (Omega 3)	22.43
7.	Sirih Merah Bogor	28	Phenol, 2-methoxy-4-(2-Propenyl)-	41.44
8.	Sirih Merah Jogjakarta	37	Morpholine, 4-[(3,4-dihydro-2H-Pyr	38.55
9.	Sirih Hijau Bogor	30	Phenol, 2-methoxy-4-(1-Propenyl)- (Isoeugenol)	36.39
10.	Sirih papua	14	Phenol, 2-methoxy-4-(1-Propenyl)- (Isoeugenol)	56.04
11.	Adas Pahit	11	Benzene, 1-methoxy-4-(1-propenyl)-	97.72
12.	Adas Manis	32	Estragol \$\$ 4-allyl methoxybenzene (Metil kavikol)	55.75
13.	Sambiloto	14	6-Octadecenoic acid, methyl ester	31.16

Sambiloto telah banyak digunakan untuk bahan jamu dan dipercaya berkhasiat untuk pembersih darah, anti diare, demam, anti fertilitas dan anti bakteri (Heyne, 1987). Paten yang berkaitan dengan sambiloto di luar negeri yang didaftarkan di berbagai negara (USA, Jepang) mengklaim bahwa kegunaan sambiloto untuk pengobatan diantaranya adalah sebagai hepatoprotektif (hepatitis B dan E), anti virus, pengobatan HIV, HCV, anti infeksi, antipiretik, analgesik (Anonim, 2004). Sedangkan di Cina fitofarmaka sambiloto (*Chuan-Xin-Lian*) telah banyak digunakan untuk pengobatan infeksi lambung, gangguan pernafasan dan ginjal (Xiao Peigen dalam Vijesekera, 1991).

Sambiloto mengandung bahan aktif andrographolide dan deoxy-andrographolide serta

neo-andrographolide pada seluruh bagian tanaman, namun bagian tanaman yang tertinggi mengandung andrographolide adalah bagian daun (sekitar 1%). Andrographolide merupakan diterpene lactone yang banyak digunakan dalam komposisi obat (Anonim, 2004). Kandungan komponen aktif dipengaruhi oleh mutu simplisia yang dipengaruhi oleh karakter genetik (varietas), cara budidaya (kondisi lahan, tinggi tempat.) dan penanganan pasca panen (Bermawie dkk., 2002, Vijesekera, 1991). Terdapat 14 jenis senyawa yang terdeteksi oleh GC-MS, namun senyawa aktif andrographolide terurai menjadi beberapa turunannya. Senyawa dengan luas area tertinggi adalah 6-Octadecenoic acid, methyl ester yang mencapai lebih dari 30%.

Tabel 2. Pengaruh Ekstrak Tanaman Obat terhadap Infeksi Virus AI H5N1 pada Sel Vero.

No.	Tanaman Obat	Laju Dosis Radiasi (KGy)	Hari ke- setelah infeksi Virus AI H5N1				
			1	2	3	4	5
1.	Beluntas Bogor	5	+	+	-	-	-
		7.5	-	-	-	-	-
		10	+	-	-	-	-
2.	Beluntas Manoko	5	+	-	-	-	-
		7.5	+	-	-	-	-
		10	+	-	-	-	-
3.	Beluntas Cicurug	5	+	-	-	-	-
		7.5	+	-	-	-	-
		10	-	-	-	-	-
4.	Adas Pahit	5	+	+	-	-	-
		7.5	+	-	-	-	-
		10	+	-	-	-	-
5.	Adas Manis	5	+	-	-	-	-
		7.5	+	-	-	-	-
		10	-	-	-	-	-
6.	Sirih Hijau	5	+	-	-	-	-
		7.5	-	-	-	-	-
		10	-	-	-	-	-
7.	Sirih Papua	5	-	-	-	-	-
		7.5	+	-	-	-	-
		10	+	-	-	-	-
8.	Sirih Merah Bogor	5	+	-	-	-	-
		7.5	+	+	-	-	-
		10	+	+	-	-	-
9.	Sirih Merah Yogya	5	+	-	-	-	-
		7.5	+	+	-	-	-
		10	+	-	-	-	-
10.	Temu Ireng Bogor (TIB)	5	+	+	+	-	-
		7.5	+	+	-	-	-
		10	+	+	-	-	-
11.	Temu Ireng Jakarta	5	+	-	-	-	-
		7.5	+	-	-	-	-
		10	+	-	-	-	-
12.	Temu Ireng Yogya	5	+	-	-	-	-
		7.5	-	-	-	-	-
		10	-	-	-	-	-
13.	Sambiloto	5	+	+	+	-	-
		7.5	+	+	+	-	-
		10	+	+	-	-	-
14.	Kombinasi Sambiloto & TIB	5	+	+	+	-	-
		7.5	+	+	+	-	-
		10	+	+	-	-	-

Keterangan: (+) Sel Vero masih baik.

(-) Sel Vero terinfeksi virus AI H5N1, terbentuk CPE

Tanaman obat Sambiloto (*A. paniculata*), Temu Ireng (*C. aeruginosa* L.), Beluntas (*P. indica* L.), Sirih Merah (*Piper sp.*) dan Adas (*F. vulgare*) secara umum masing-masing memiliki potensi sebagai bahan pendukung (prekursor) untuk menangkal infeksi virus AI H5N1 ke sel lestari Vero. Khusus Sambiloto dan Temu Ireng baik dalam komposisi tunggal maupun kombinasi mampu menahan infeksi virus ke sel Vero hingga hari ke-3 setelah infeksi. Hasil selengkapnya uji laboratorium khasiat tanaman obat disajikan pada Tabel 2.

Ekstrak Beluntas dan Adas mampu menghambat infeksi virus hingga hari ke-1 setelah infeksi virus, sedangkan ekstrak Sirih Merah masih dapat melindungi sel Vero terhadap infeksi virus AI hingga hari ke-2. Seluruh sel Vero akhirnya terinfeksi virus H5N1 dan mati dengan diikuti adanya gambaran efek kerusakan sel (CPE). Perbedaan laju dosis radiasi yang digunakan dalam sterilisasi ekstraksi tanaman obat tidak memberikan pengaruh terhadap kemampuan ekstrak tanaman dalam menangkal paparan virus AI. Namun penggunaan radiasi dengan laju dosis 5 KGy pada setiap jenis tanaman obat menunjukkan hasil sedikit lebih baik dibandingkan dengan dosis 7,5 KGy ataupun 10 KGy (Tabel 2). Kemungkinan dosis radiasi yang tinggi berdampak merusak komposisi kimia dari ekstrak sehingga menyebabkan efikasi ekstrak tanaman obat menurun.

Sambiloto dengan kandungan senyawa tertinggi 6-Octadecenoic acid, methyl ester (31.16%) dan Temu Ireng Bogor dengan komponen kimia tertinggi 1,8,8-trimethylfuro [3,4-c] bycyclo (38.55%) telah menunjukkan hasil uji *in vitro* yang lebih baik dalam menahan infeksi virus AI H5N1, meskipun pada hari ke-4 post infeksi akhirnya sel

Vero terinfeksi dan mati. Kajian lebih lanjut untuk mengeksplorasi potensi Sambiloto dan Temu Ireng asal Bogor khususnya dalam keterbatasannya memblokir infeksi virus AI H5N1 masih diperlukan. Beberapa tanaman obat telah dilaporkan berpotensi mengandung bahan aktif anti virus influenza namun bekerja hanya sebatas sebagai prekursor. Sehingga perlu bahan aktif lainnya untuk bersintesa dan bersinergis dengan bahan aktif tanaman obat, dan setelah melalui serangkaian reaksi akhirnya agregat bahan aktif tersebut menjadi obat anti virus.

Studi lanjutan potensi tanaman obat ini perlu dilakukan guna mengetahui sejauh mana pengaruhnya pada kajian *in vivo* dengan menggunakan hewan model sebelum kelak digunakan sebagai salah satu bahan pembuat sediaan anti virus. Selain itu juga penting dilakukan penelitian lainnya guna mengetahui senyawa aktif apa yang memberikan peran utama dalam penghambatan infeksi virus.

Kesimpulan hasil penelitian ini adalah Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan Temu Ireng (*Curcuma aeruginosa* L.) asal Bogor dalam komposisi tunggal maupun kombinasi menunjukkan potensi yang baik secara *in vitro* dalam menghambat infeksi virus AI H5N1 ke sel Vero sampai dengan hari ke-3 post infeksi. Kandungan senyawa tertinggi sambiloto adalah 6-Octadecenoic acid, methyl ester (31.16%) dan Temu Ireng adalah 1,8,8-trimethylfuro [3,4-c] bycyclo (38.55%).

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini merupakan kegiatan kerjasama kemitraan penelitian pertanian dengan perguruan

tinggi (KKP3T). Ucapan terima kasih disampaikan kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian, Republik Indonesia yang telah memberi dana penelitian dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Kegiatan Nomor 1551/LB.620/J.1/5/2007.

Daftar Pustaka

- Anonim. (1977) *Materia Medika Indonesia*. Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Anonim., 2012. Penyakit Menular Masih Menjadi Ancaman. <http://www.antaraneews.com/berita/290545/penyakit-menular-masih-jadi-ancaman>. Diakses pada tanggal 4 Januari 2012.
- Anonim., 2004. *Andrographis paniculata*. <http://www.herbalnet.Medicinal.plants.Html>. Diakses pada tanggal 19 April 2013.
- Bermawie, N., M. Januwati and Soediarto. (2002) *Conservation and cultivation of herbal and medicinal plants*. A country report on 'Workshop on the conservation of herbal and medicinal plants'. 12-13 Des. 2002. Bogor, Indonesia.
- Chang, C-P., Chang, J-Y, Wang, F-Y. and Chang, J-G. (1995) The effect of Chinese herb Zingiber rhizoma extract on cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *J. Ethnopharmacol.* 48:13-19.
- Heyne, K. (1987) *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Badan penelitian dan pengembangan kehutanan. Jakarta.
- Lee, S-J., Umamo, K., Shibamoto, T. and Lee, K-G. (2005) Identification of Volatile Components in Basil (*Ocimum basilicum* L.) and Thyme Leaves (*Thymus vulgaris* L.) and Their Antioxidan Properties. [www. Sciencedirect.com](http://www.Sciencedirect.com)
- Mi, Z., Yonghong, M. and Yigang, T. (2012) Avian influenza virus H5N1 induces rapid interferon-beta production but shows more potent inhibition to retinoic acid-inducible gene I expression than H1N1 in vitro. *Virology* 9:145.
- Mozes, A., 2012 *Cases of Tamiflu-resistant flu concern experts in 2007/2008*. Diakses pada tanggal 4 Januari 2012.
- Spelman K, Burns J.J , Nichols D, Winters N, Ottersberg S. and Tenborg, M. (2006) Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. *Alternative Med. Rev.* 11: 128-146
- Vijsekera, R.O.B. (1991) *Plant derived medicine and their role in global health in the medicinal plant industry*. CRC Press. Florida, USA.