

GAMBARAN HISTOPATOLOGIS DAN KLINIS AYAM HERBAL SETELAH DIUJI TANTANG DENGAN VIRUS AVIAN INFLUENZA H5N1

Histopathological and Clinical Studies on Herbal Chicken after Challenging with Avian Influenza H5N1 Virus

Agus Setiyono¹ dan Nurliani Bermawie²

¹Bagian Patologi, Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

²Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Kementerian Pertanian, Bogor

E-mail: agusetiyo@yahoo.com

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui perubahan histopatologis dan klinis ayam herbal setelah ditantang dengan virus *avian influenza* (AI) H5N1. Seluruh ayam dibagi atas 3 kelompok perlakuan Kelompok kontrol, Kelompok I (I-1, I-2, dan I-3), dan Kelompok II (II-1, II-2, dan II-3). Masing-masing kelompok terdiri atas 15 ekor ayam sehingga jumlah seluruh ayam yang digunakan adalah 105 ekor. Ayam Kelompok I dan II masing-masing diberi herbal I (sambiloto, temu ireng, adas bintang, sirih merah) dan herbal II (sambiloto, adas bintang, sirih merah) selama 3 minggu sebelum ditantang virus. Ayam kelompok perlakuan secara keseluruhan tidak ada yang hidup hingga hari ke-8. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 7 ekor ayam KII-3 (46,7%) masih hidup sampai hari ke-4 setelah uji tantang virus. Perubahan histopatologis sistem pernafasan ayam kelompok perlakuan menunjukkan pembendungan, edema, dan kerusakan sel epitel mukosa. Sistem limfoid juga menunjukkan pembendungan, deplesi folikel limfoid, dan fibrosis limpa dan bursa Fabrisius. Analisis imunohistokimia mengindikasikan partikel virus AI telah menyebar di organ atau jaringan sistem pernafasan dan sistem pertahanan.

Kata kunci: virus H5N1, herbal, ayam

ABSTRACT

The aims of this research were to overview the histopathological changes and to observe clinical sign of the herbal broiler after challenging with AI H5N1 virus. A total of 105 chicken were allotted into 3 treatment groups: control group, group I (I-1, I-2, and I-3), and group II (II-1, II-2, and II-3), 15 chicken each. Group I and II were fed with herbal I (sambiloto, temu ireng, adas bintang, sirih merah) and herbal II (sambiloto, adas bintang, sirih merah), respectively, for 3 weeks prior to be challenged. No chicken in treatment groups survived until day 8. The result showed that 7 chicken in group II-3 (46.7%) survived until day 4 post virus challenge. The histopathological changes of respiratory system in treated chicken group revealed congestion, oedema, and injury of the epithelial cells of mucosa. Lymphoid system also showed congestion, depletion of lymphoid follicle, and fibrosis of both spleen and bursa of Fabricius. The immunohistochemical analysis indicated that AI virus particle had already been spread in organ or tissue of respiratory and lymphoid system.

Key words: H5N1 virus, herbal, broiler

PENDAHULUAN

Tanaman obat merupakan salah satu pilihan dalam penanggulangan penyakit maupun pemecahan masalah kesehatan lainnya. Beberapa tanaman obat tersebut termasuk sambiloto (*Andrographis paniculata*), temu ireng (*Curcuma aeruginosa* L.), sirih merah (*Piper crocatum*), dan adas bintang (*Foeniculum vulgare*). Sambiloto mengandung andrografolid dilaporkan memiliki aktivitas sebagai antivirus dan telah dikembangkan sebagai obat modern antivirus (Verkerk *et al.*, 2006). Temu ireng mengandung minyak atsiri (*turmerone, zingiberene*), kurkuminoid (kurkumin I, II, dan III) dan alkaloid, saponin, pati, damar, lemak. Kurkuminoid diketahui memiliki efek antositokin.

Kadar sitokin pada penderita infeksi virus termasuk *avian influenza* (AI) H5N1 meningkat. Sitokin dapat menyebabkan perubahan oksigen (O_2) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) yang merusak sel paru-paru. Oleh karena adanya disregulasi sitokin dalam patogenesis virus H5N1, maka terapi berbasis peran imunomodulator patut dipertimbangkan (Malik Peiris *et al.*, 2007). Sirih merah mengandung flavonoid, alkaloid, tanin, dan minyak atsiri. Senyawa flavonoid

bersifat antikanker, anti-oksidan, antidiabetik, antiseptik, dan anti-inflamasi sedangkan adas banyak dimanfaatkan untuk mengobati diare, batuk, dan flu. Komponen utama dari buah adas adalah anetol, minyak atsiri, fenkom, anisaldehid, dan asam anisat.

Penyakit flu burung disebabkan oleh virus AI tipe A subtipen H5N1 (Murphy *et al.*, 1999) di Indonesia telah menimbulkan kerugian ekonomi yang besar karena membunuh jutaan ternak unggas. Vaksin merupakan cara terbaik penanganan maupun pencegahan penyakit viral (Shortridge, 1997). Upaya vaksinasi AI hingga saat ini belum menunjukkan hasil maksimal, bahkan ada indikasi terjadi mutasi virus penyebab AI pada unggas (Webster, *et al.*, 1992; Swayne dan Suarez, 2003). Penelitian terdahulu mengenai potensi ekstrak tanaman obat secara *in vitro* menunjukkan bahwa dalam komposisi kombinasi sambiloto, sirih merah, dan adas memiliki kemampuan sebagai penghambat infeksi virus H5N1 ke sel Vero (Setiyono *et al.*, 2007). Berdasarkan hasil kajian tersebut, maka pengujian lebih lanjut tentang efektivitas atau khasiat tanaman obat terhadap virus AI H5N1 secara *in vivo* khususnya pada ayam dinilai sangat penting dan perlu guna mendapatkan solusi alternatif penanganan AI pada

ternak unggas. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol sambiloto, sirih merah, dan adas pada ayam yang diikuti dengan uji tantang virus AI H5N1 dengan melihat gejala klinis dan gambaran histopatologis organ interna.

MATERI DAN METODE

Dalam penelitian ini digunakan 105 ekor ayam *day old chick* (DOC) strain Cobbs yang dipelihara di fasilitas kandang Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Ayam diberi makan dan minum *ad libitum* dan diadaptasikan selama 6 hari. Seluruh ayam dibagi atas 3 kelompok perlakuan Kelompok kontrol, Kelompok I (I-1, I-2, dan I-3), dan Kelompok II (II-1, II-2, dan II-3). Masing-masing kelompok terdiri atas 15 ekor ayam sehingga jumlah seluruh ayam yang digunakan adalah 105 ekor. Ayam Kelompok I dan II masing-masing diberi herbal I (sambiloto, temu ireng, adas bintang, sirih merah) dan herbal II (sambiloto, adas bintang, sirih merah) selama 3 minggu sebelum ditantang virus. Ayam dicekok 0,5 ml ekstrak tanaman obat/ekor dalam bentuk formulasi setiap hari dari umur 7 hari hingga berumur 4 minggu. Setelah uji tantang virus, gejala klinis yang muncul dicatat dan *sampling* organ pada ayam yang mati dilakukan untuk pemeriksaan lanjut histopatologis.

Ekstraksi Tanaman Obat

Ekstraksi etanol tanaman obat disiapkan dengan metode standar (Depkes RI, 1979). Secara ringkas bahan dikeringkan pada suhu tidak lebih dari 45°C, sampai kadar air ±10%, kemudian digiling dengan ukuran 60 mesh. Ekstraksi dilakukan secara bertingkat untuk memisahkan fraksi polar, fraksi semi polar, dan fraksi nonpolar. Kelompok I adalah herbal I (adas bintang, temu ireng, sirih merah, dan sambiloto), Kelompok II adalah herbal II (adas bintang, sirih merah, dan sambiloto) dan Kelompok K adalah kontrol yang tidak mendapat tanaman obat). Kelompok perlakuan seluruhnya dibagi sebagai berikut: KI-1 (pelarut heksana), KI-2 (pelarut etil asetat), KI-3 (pelarut etanol), KII-1 (pelarut heksana), KII-2 (pelarut etil asetat), dan KII-3 (pelarut etanol).

Analisis Ekstrak

Penentuan kadar komponen kimia dalam ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode gas kromatografi spektrometri massa (GC-MS). 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 menggunakan alat *rotavapor* sehingga dihasilkan ekstrak pekat. Ekstrak yang dihasilkan dianalisis kandungan kimianya.

Virus dan Uji Tantang

Virus AI yang digunakan adalah virus isolat lokal H5 N1/Legok/2003 diperoleh dari PT. Vaksindo Satwa

Nusantara, Cicadas, Gunung Putri, Bogor. Uji tantang dilakukan di fasilitas *Biosafety level 3* milik PT. Vaksindo Satwa Nusantara dengan dosis $10^{6.0}$ EID₅₀/0,1 ml per ekor.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tanaman obat sambiloto (*Andrographis paniculata*), temu ireng (*Curcuma aeruginosa* L.), sirih merah (*Piper crocatum*), dan adas bintang (*Foeniculum vulgare*) secara umum masing-masing memiliki potensi sebagai bahan pendukung (prekursor) untuk menangkal perlekatan dan infeksi virus AI H5N1 ke sel target pada ayam. Agen antivirus yang tersedia hingga saat ini adalah Amantadin dan Rimantadin (Govorkova *et al.*, 2001), namun seperti fraksi herbal dan campuran murni *Pandanus amaryllifolius* (PYM2), *Narcissus tazetta* (NTL), dan *Polygonatum odoratum* (POL) yang dilaporkan oleh Ooi *et al.* (2011), tanaman obat Indonesia yang digunakan dalam penelitian ini juga menunjukkan aktivitas yang baik sebagai antivirus AI H5N1.

Menurut Chu dan Whittaker (2004), virus AI masuk dan menginfeksi induk semang memerlukan senyawa glikoprotein-N, sedangkan preparat neuraminidase inhibitor hingga saat ini masih dipercaya efektif terhadap semua varian virus AI pada manusia (Hoffmann *et al.*, 2006). Ayam Kelompok K, tanpa herbal dan ditantang virus H5N1 mati dalam jumlah besar pada hari ke-3, 4, 5, dan sampai hari ke-6 *post challenge* (p.c). Hal ini sesuai dengan laporan Lipatov *et al.* (2004) dan Uyeki (2009), bahwa masa inkubasi infeksi virus H5N1 pada unggas umumnya adalah 2-5 hari, meskipun bisa mencapai 7 hari sebelum akhirnya mati.

Ayam kelompok perlakuan secara keseluruhan tidak ada yang hidup hingga hari ke-8 p.c. Namun ayam KII-3 menunjukkan hasil relatif lebih baik dibanding dengan formulasi lainnya dalam menghambat infeksi virus H5N1 karena ayam masih hidup 7 ekor (46,7%) dari total populasi sampai hari ke-4 p.c seperti yang disajikan dalam Tabel 1.

Kandungan bahan aktif tanaman obat yang digunakan dalam penelitian ini masing-masing adalah anetol, kurkumin, piperin, dan andrografolid seperti yang disajikan pada Tabel 2. Keempat bahan aktif tersebut digunakan untuk menyusun formula KI dan KII.

Perbedaan kandungan KI dan KII terletak pada kurkumin yang tidak terdapat pada KII. Namun demikian, kelompok ayam KI menunjukkan kematian merata di antara subkelompok dengan pelarut berbeda (Tabel 1). Sebaliknya, ayam pada kelompok KII (tidak mendapat kurkumin) baik dengan pelarut heksana, etil asetat, maupun etanol menunjukkan daya tahan yang relatif baik, khususnya pada kelompok KII-3 dengan ayam yang bertahan hidup 7 ekor (46,7%) hingga hari ke-4 p.c. Hal ini diduga ayam mampu mengaktifkan atau menstimulasi sel-sel pertahanan tubuh, sehingga tubuh lebih baik dalam merespons secara spesifik maupun nonspesifik agen asing yang masuk. Dalam penelitian ini peran kurkumin yang telah dikenal

Tabel 1. Hasil uji tantang virus AI H5N1/Legok/2003 ($10^{6.0}$ EID₅₀/0.1 ml /ekor) setelah pemberian ekstrak tanaman obat pada ayam Cobbs (*broiler*)

Kelompok	Ekstrak Tanaman Obat	Pelarut	Jumlah Ayam (ekor)	Jumlah Ayam mati pada hari ke-setelah uji tantang virus AI (ekor)							Total
				1	2	3	4	5	6	7	
I-1	adas bintang, temu ireng, heksana sirih merah, sambiloto		15	0	1	6	5	3	-	-	15
I-2	adas bintang, temu ireng, etil asetat sirih merah, sambiloto		15	0	0	4	8	2	1	-	15
I-3	adas bintang, temu ireng, etanol sirih merah, sambiloto		15	0	0	3	9	3	-	-	15
II-1	adas bintang, sirih merah, heksana sambiloto		15	0	0	7	3	4	-	1	15
II-2	adas bintang, sirih merah, etil asetat sambiloto		15	0	0	4	5	6	-	-	15
II-3	adas bintang, sirih merah, etanol sambiloto		15	0	0	4	4	7	-	-	15
K (kontrol)	-	-	15	0	0	7	4	1	3	-	15

Tabel 2. Hasil analisis kadar bahan aktif dalam tanaman obat menggunakan gas kromatografi spektrometri massa

Bahan Aktif	Bahan Baku			
	Adas Bintang	Temu Ireng	Sirih Merah	Sambiloto
Anetol, %	5,20			
Kurkumin, %		0,05		
Piperine, %			2,19	
Andrograflid, %				1,37

Tabel 3. Hasil titrasi antibodi ayam dengan uji *hemagglutination inhibition* sebelum ditantang dengan virus AI H5N1

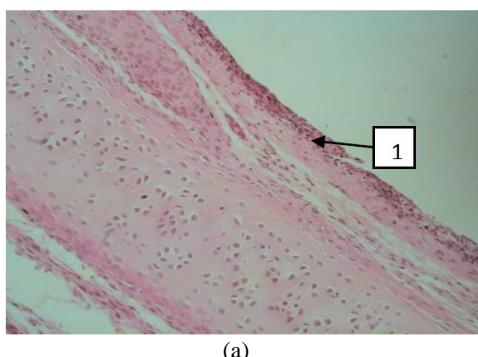
Kelompok	Ekstrak Tanaman Obat	Pelarut	Rataan Titer HI (log 2)	Keterangan
I-1	adas bintang, temu ireng, sirih merah, sambiloto	heksana	1,1	Rendah
I-2	adas bintang, temu ireng, sirih merah, sambiloto	etil asetat	1,1	Rendah
I-3	adas bintang, temu ireng, sirih merah, sambiloto	etanol	0,3	Rendah
II-1	adas bintang, sirih merah, sambiloto	heksana	0,5	Rendah
II-2	adas bintang, sirih merah, sambiloto	etil asetat	0,6	Rendah
II-3	adas bintang, sirih merah, sambiloto	etanol	0,8	Rendah
K (kontrol)	-	-	0	Rendah

memiliki efek antisitokin (Van Valkenburg *et al.*, 2002) belum dapat diuraikan secara jelas dibandingkan dengan kelompok ayam yang tidak mendapat kurkumin. Fenomena ini cukup menarik untuk dikaji lebih lanjut dengan parameter yang lebih terinci dan terukur.

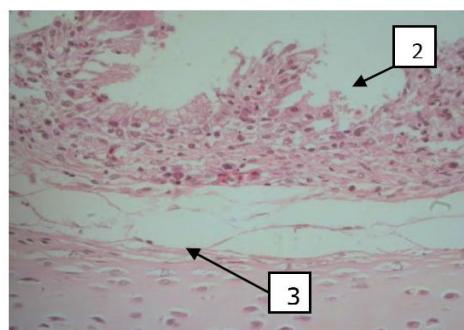
Rerata titer antibodi ayam sebelum uji tantang menunjukkan bahwa seluruh ayam tidak memiliki antibodi protektif terhadap virus AI. Hal ini sekaligus memberikan konfirmasi bahwa ayam yang diuji tantang

idealnya tidak memiliki kekebalan silang terhadap virus AI lingkungan (Darminto, 2006). Hasil uji titrasi antibodi disajikan pada Tabel 3.

Gambaran histopatologis organ respirasi ayam kelompok perlakuan setelah uji tantang virus H5N1 menunjukkan trachea mengalami edema dan deskuamasi epitel mukosa, sedangkan pada ayam kelompok kontrol, mukosa trachea tidak mengalami perubahan spesifik seperti yang disajikan pada Gambar 1.

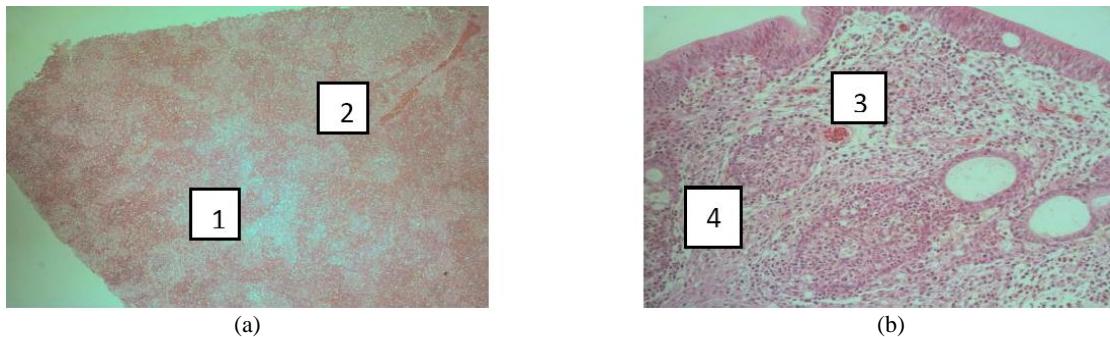


(a)



(b)

Gambar 1. Trachea ayam (a) kelompok kontrol, ayam tidak diberi tanaman obat dan tidak ditantang virus AI H5N1, dan (b) kelompok perlakuan (mendapat herbal dan ditantang virus) (1, epitel mukosa trachea normal; 2, epitel trachea deskuamasi; 3, edema; HE, 20X)



Gambar 2. Limpa (a) dan (b) bursa Fabricius (b) ayam kelompok perlakuan setelah uji tantang virus AI H5N1 (1, deplesi limfoid folikel; 2, kongesti; 3, deplesi limfoid folikel; 4, Fibrosis; HE, 20X)



Gambar 3. Kelompok ayam perlakuan (a) bursa Fabricius, (b) hati (Partikel virus AI H5N1 pada limfoid folikel dan jaringan pembuluh darah parenkim hati (sinusoid), 20X)

Deskuamasi sel epitel mukosa saluran pernafasan ayam diakibatkan oleh sifat merusak agen patogen. Kerusakan lapis atas struktur jaringan sistem pernafasan berpotensi untuk terjadinya infeksi sistemik apabila agen patogen berhasil masuk ke jaringan submukosa (Tumpey *et al.*, 2002). Virus AI H5N1 yang digunakan dalam penelitian ini merupakan virus lapang yang sangat patogen diisolasi tahun 2003 ketika *outbreak* AI di wilayah Legok-Tangerang. Perubahan patologis sistem respirasi juga ditemukan pada organ paru-paru berupa kongesti dan pneumonia. Mekanisme terjadinya kongesti pada paru-paru diduga merupakan upaya dari tubuh untuk memobilisasi sel-sel darah dengan peningkatan tekanan vaskular. Demikian pula edema akibat penimbunan cairan berlebihan di dalam jaringan ekstraseluler memberikan inisiasi respons terhadap adanya benda asing yang masuk ke jaringan parenkim paru-paru.

Histopatologis limpa menunjukkan terjadinya kongesti dan deplesi limfoid folikel tahap awal (Gambar 2). Berkurangnya sel-sel limfosit fungsional pada limpa akan memberikan pengaruh kurang menguntungkan bagi hewan akibat daya tahan yang semakin menurun. Peran imunomodulator yang dimainkan oleh tanaman obat diduga turut berkontribusi terhadap daya tahan ayam dengan sel-sel limfosit limpa masih berfungsi pada ayam-ayam yang masih hidup hingga hari ke-4 p.i.

Bursa Fabricius merupakan organ limfoid primer ayam yang sangat besar perannya dalam pertahanan tubuh khususnya ketika ayam masih berumur muda. Histopatologis organ bursa Fabricius pada ayam yang mati setelah ditantang virus AI H5N1 menunjukkan

perubahan yang moderat. Limfoid folikel terjadi deplesi dan ditemukan fibrosis yang mengisi ruang plika limfoid folikel.

Analisis imunohistokimia (Gambar 3) menunjukkan bahwa partikel virus sudah menyebar di berbagai organ dan jaringan ayam seperti trachea, bursa Fabricius, usus, dan hati. Hal ini seperti yang dilaporkan Bröjer *et al.* (2009) bahwa antigen AI telah ditemukan di otak, pankreas, dan saluran pernafasan bagian atas itik yang terinfeksi secara alam. Virus AI yang menginfeksi unggas juga dilaporkan telah menyebar hingga jantung dan sistem saraf tepi (Neufeld *et al.*, 2009). Penanganan yang tidak tuntas terhadap inaktivasi ataupun pemblokiran virus yang masuk kedalam tubuh *host* berpotensi terhadap risiko infeksi laten. Namun pada tahap infeksi virus AI H5N1 dapat diperlambat atau dihambat oleh bahan aktif yang terkandung di tanaman obat terpilih seperti pada uji *in vitro* (Setiyono *et al.*, 2007), maka akan memberikan harapan baru adanya invensi atau penemuan bahan baku asal herbal untuk penanggulangan flu burung.

KESIMPULAN

Ayam yang diberi herbal kombinasi sirih merah (*Piper crocatum*), adas bintang (*Foeniculum vulgare*), serta sambiloto (*Andrographis paniculata*) dan ditantang virus AI H5N1, secara bertahap sampai hari ke-7 seluruhnya mati dengan gambaran histopatologis berupa edema, kongesti, deskuamasi epitel mukosa sistem pernafasan, deplesi limfoid folikel, dan fibrosis pada limpa dan bursa Fabricius. Analisis imunohistokimia

menunjukkan bahwa partikel virus menyebar pada trachea, bursa Fabrisius, usus, dan hati ayam.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih yang setinggi-tingginya disampaikan kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian, atas dukungan dana penelitian melalui KKP3T. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada PT. Vaksindo Satwa Nusantara atas bantuan fasilitas BSL3 dan penyediaan virus AI H5N1 sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Bröjer, C, E.O. Agren, H. Uhlnhorn, K. Bernodt, T. Mörner, D.S. Jansson, R. Mattsson, S. Zohari, P. Thorén, M. Berg, and D. Gavier-Widén. 2009. Pathology of natural highly pathogenic avian influenza H5N1 infection in wild tufted ducks (*Aythya fuligula*). **J.Vet. Diagn. Invest.** 21(5):579-87.
- Chu, V.C. and G.R. Whittaker. 2004. Influenza viruses entry and infection require host cell N-linked glycoprotein. **PNAS**. 101:18153-18158.
- Darminto. Mengenal Penyakit Flu Burung dan Strategi Pengendaliannya.
- Depkes RI. 1979. **Materia Medika Indonesia**. Jilid III, Jakarta.
- Govorkova, E.A., I.A. Leneva, O.G., K. Goloubeva, K. Bush, and R.G. Webster. 2001. Comparison of efficacies of RWJ-270201, zanamivir, and oseltamivir against H5N1, H9N2, and other avian influenza viruses. **Antimicrob. Agents Chemother.** 45(10):2723-2731.
- Hoffmann, C., S. Korsman, and B.S. Kamps. 2006. **Influenza Report 2006: Treatment and Prophylaxis**. Flying Publisher, Paris, Cagliari, Wuppertal, Sevilla <http://www.jatim.litbang.go.id/template/prosiding/flu%20burungpdf>.
- Lipatov, A.S., E.A. Govorkova, R.J. Webby, H. Ozaki, M. Peiris, Y. Guan, L. Poon, and R.G. Webster. 2004. Influenza: Emergence and control. **J. Virol.** 78:8951-8959.
- Malik-Peiris, J.S., M.D. de Jong, and Y. Guan. 2007. Avian influenza virus (H5N1): A threat to human health. **Clin. Microbiol. Rev.** 87:243-267.
- Murphy, F.A., E.P. Gibbs, M.C. Horzinek, and M.J. Studdert. 1999. **Veterinary Virology**. Academic Press, San Diego, California.
- Neufeld, J.L., C. Embury-Hyatt, Y. Berhane, L. Manning, S. Ganske, and J. Pasick. 2009. Pathology of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) infection in Canada Geese (*Branta canadensis*): Preliminary Studies. **Vet. Pathol.** 46(5):966-970.
- Ooi, V.E.C., P.K.S. Chan, L.C.M. Chiu, S.S.M. Sun, H.N.C. Wong. 2011. Studies on Antiviral Activities of Chinese Medicine-Derived Phytochemicals Active Against SARS-Associated Coronavirus or Avian Influenza A (H5N1) Virus For Potential Development. **Report**. The Chinese University of Hong Kong, Shatin, Hong Kong.
- Setiyono A., W. Winarsih, N. Bermawie, dan M. Syakir. 2007. **Potensi Tanaman Obat Untuk Penanggulangan Flu Burung: Studi In Vitro**. Laporan Akhir Kegiatan : Kerjasama Kemitraan Penelitian Pertanian dengan Perguruan Tinggi (KKP3T). Kementerian Pertanian, Jakarta.
- Shortridge, K.F. 1997. Avian influenza outbreak in Hong Kong 1997: Chronology and virus isolation. **Vaccine**. 17:826-829.
- Swayne, D.E. and L.D. Suarez. 2003. Biology of Avian Influenza Especially the Change of Low Pathogenicity Virus to High Pathogenicity. **Proceeding Latin American Poultry Congress**:34-42.
- Tumpey, T.M., D.L. Suarez, L.E.L. Perkins, D.A. Senne, J. Lee , Y.J. Lee, I.P. Mo, H.W. Sung, and D.E. Swayne. 2002. Characterization of highly pathogenic avian influenza H5N1 avian influenza A virus isolated from duck meat. **J. Virol.** 76(12):6344-6355.
- Uyeki, T.M., 2009. Human infection with highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus: Review of clinical issues. **Clin. Infect. Dis.** 49:279-290.
- Van Valkenburg, J.L.C.H. and N. Bunyapraphatsara. 2002. **Medicinal and Poisonous Plants 2**. Prosea, Bogor, Indonesia.
- Verkerk, R., D. Downing, J. Meldrum, and S. Hickey. 2006. **The Pivotal Role for Natural Products in Countering an Avian Influenza Pandemic**. Alliance for Natural Health, USA.
- Webster, R.G., W.J. Bean, O.T. Gorman, T.M. Chambers, and Y. Kawaoka. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiol. Rev.** 56:152-179.