

Submitted : 14 April

Revised : 25 April

Accepted : 28 April

KARAKTERISASI SENYAWA FLAVONOID EKSTRAK SAMBILOTO (*Andrographis paniculata*) YANG MEMPUNYAI AKTIVITAS INHIBISI TERHADAP ENZIM SIKLOOKSIGENASE-2 SECARA *IN VITRO*

Agus Rochmat^{1*}

¹Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik, Universitas Sultan Ageng Tirtayasa Banten

*Email: agus_rochmat@untirta.ac.id

Abstrak

Sambiloto (*Andrographis paniculata*) adalah tanaman medis tradisional digunakan untuk pengobatan dingin, demam, radang tenggorokan dan beberapa infeksi. Beberapa penelitian menunjukkan, sambiloto memiliki aktivitas antiinflamasi. Kemampuan senyawa aktifnya memberikan efek penghambatan secara tetap dan sampel ekstrak memenuhi standar yang ditetapkan BPOM RI. Hasil ekstraksi sambiloto dengan etanol dan air memberi informasi sebagai senyawa flavonoid. Hasil uji senyawa flavonoid dari ekstrak air memiliki penghambatan terhadap enzim COX-2 sebesar 98,97 % dan ekstrak etanol memiliki penghambatan 16,70 %. Karakterisasi ekstrak etanol memiliki spectrum IR dan UV sesuai dengan pola senyawa Flavon. Sementara, fraksi etanol memberikan spektrum IR dan UV Pola untuk memperkirakan untuk polifenol senyawa.

Kata Kunci: Ekstrak, Enzim Siklooksigenase-2, Flavonoid, Sambiloto

Abstract

Sambiloto (Andrographis paniculata) is a medical plant traditionally used for the treatment cold, fever, laryngitis and several infection. Some research showed that samboloto has antiinflammation activity. The reability active compound gives consistency inhibition effect when extract sample has standardised to conform standard of BPOM RI. In this research Sambiloto that was extracted with water and ethanol solvent gave fraction of flavonoid compound. Ability flavonoid compound from fraction of water extract has inhibition of 98,97 % dan fraction of ethanol extract has inhibition 16,70% to COX-2 enzym. characteristic of ethanol ekstrak had IR and UV spectrum that showed the same of pola with flavon compound. Mean while, ethanol fraction had IR and UV spectrum that showed the pola which was can be used to estimate poliphenol compound.

Keywords: Extract, Cyclooxygenation-2 Enzym, Flavonoid, Sambiloto,

1. PENDAHULUAN

Sambiloto salah satu tanaman obat yang telah lama digunakan sebagai bahan ramuan obat tradisional. Beberapa uji khasiat sambiloto terhadap penyakit seperti demam, infeksi lambung, infeksi pernafasan, demam malaria, repellent serangga, komplikasi diabetes, melindungi dari penyakit – penyakit hati, antiviral, immunostimulator dan menekan retenosis pada pasien angiosplastis.

Ekstrak sambiloto diyakini memiliki kemampuan untuk menghambat antiradang. Hal ini terlihat pada ekstrak sambiloto yang mampu menginduksi TNF- α

pada ekspresi adesi interseluler molekul-1 dan mengurangi induksi TNF pada adesi endothelial-monocyte (Hebtemariam, 1998). Kemudian dipertegas dengan kemampuan Andrographolide menghambat ekspresi beberapa protein anti radang dengan menunjukkan daya inhibisi nuclear factor kappa B (NF- κ B) yang terikat pada DNA (Hidalgo *et.,al*, 2005).

Sediaan obat antiinflamasi non-steroid (OAINS) dikenal sebagai inhibitor enzim COX-2 dalam menghambat pembentukan prostaglandin. Obat antiradang ini biasanya digunakan untuk menghambat biosintesis prostaglandin, prostasiklin, dan

tromboksan melalui penghambatan aktivitas enzim siklooksigenase-2 (COX-2). Peran enzim COX-2 dapat mengkatalisis pembentukan prostaglandin yang menyebabkan peradangan (Dannhardt and Laufer, 2000). Salah satu contoh OAINS adalah asam asetil salisilat, dimana kerja asam asetil salisilat mampu menghambat dan memblokir secara irreversibel enzim COX-2 melalui reaksi asetilasi residu serin-529 atau -516 pada enzim tersebut (Lawson et.,al, 1999). Senyawa - senyawa lain yang memiliki peran menghambat enzim COX-2 seperti: curcumin (Zhang et., al, 1999), γ -tokoferol (Jiang et., al, 2000), asam ursolat (Subbarmaiah, et., al, 2000) dan tricrin (Cai et., al, 2005).

Kandungan bahan aktif pada suatu tanaman sangat dipengaruhi oleh mutu simplisia, sehingga untuk menghasilkan ekstrak terstandar diperlukan metode ekstraksi yang tepat. Apabila diperoleh ekstrak sambiloto terstandar telah didapatkan metode produksinya, maka kebutuhan bahan baku industri fitofarmaka untuk menghasilkan formula suatu obat dapat dipenuhi baik kualitas, kuantitas maupun kontinuitas keaktifannya.

Berdasarkan pada potensi sambiloto sebagai antiradang, maka tujuan penelitian ini adalah melakukan standarisasi perolehan ekstrak air dan ekstrak etanol sambiloto yang memiliki daya inhibisi enzim COX-2 secara *in vitro* dan melakukan karakterisasi senyawa aktif pada fraksi yang memiliki daya inhibisi ini.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah satu set alat-alat gelas laboratorium, satu set alat *freeze dryer*, satu set alat uji KLT, AA7000 shimadzu, HPLC Shimadzu A20, Spektrofotometer UV Vis 1700 shimadzu, Spektrofotometri FTIR, dan LC-MS/MS.

Bahan yang digunakan adalah daun sambiloto, Etanol 95%, H₂SO₄, HClO₄, H₂O₂, n-heksana, NaOH, logam Zn, HNO₃, HCl, MgNO₃, larutan baku Cu, larutan baku Pb, larutan baku Zn, larutan Molibdat, SnCl₂, larutan baku arsen, NaBH₄, etil aquades, aqua bidestilata, aluminium foil, dan tissue.

2.2 Metode Penelitian

2.2.1 standarisasi ekstrak sambiloto

Simplisia yang telah memiliki kadar air dibawah 10% kemudian dihaluskan dengan penggilingan lalu diekstrak dengan cara maserasi menggunakan pelarut air dan pelarut etanol, selanjutnya dilakukan penyaringan (Aromdee et.al., 2005). Filtrat yang diperoleh di *freeze drying* hingga menjadi ekstrak kasar dengan kadar air dibawah 2%. Kemudian, ekstrak ini dilakukan pengujian standarisasi ekstrak yakni: organoleptik, senyawa penciri, kadar air, kadar abu, cemaran logam: Pb; Cd; As, cemaran aflatoxin dan cemaran mikrobiologi: angka lempeng total dan angka kapang / khamir. Standarisasi ekstrak mengacu pada BPOM RI, 2004.

2.2.2 Uji daya inhibisi terhadap enzim siklooksigenase-2 secara *in vitro*

Uji daya inhibisi dilakukan dengan metode ELISA, dengan menggunakan *COX Inhibitor Screening Assay Kit (Cayman Chemical Catalog No. 560131)* pada konsentrasi 900 μ g/ml. Sebanyak 0,1 ml dan 0,05 ml bufer EIA dimasukkan ke dalam sumur NSB dan B₀ secara berurutan. Larutan standar prostaglandin diisi ke dalam sumur S8-S1. Sumur BC diisi dengan larutan background, sumur (‡) diisi dengan larutan aktivitas awal COX-2, sumur (★) diisi dengan larutan ekstrak air, ekstrak dan fraksi teraktif.

Setiap sumur ditambahkan PG AchE *tracer* kecuali sumur TA dan Blk, kemudian setiap sumur ditambahkan antiserum prostaglandin kecuali sumur TA dan NSB. Plat ditutup dan diinkubasi selama 18 jam pada suhu ruang. Setelah inkubasi, plat dicuci dengan bufer pencuci, kemudian setiap sumur ditambahkan pereaksi Ellman, dan sumur TA diisi dengan *tracer*. Plat ditutup dan dibiarkan bereaksi selama 90 menit. Pembacaan plat dilakukan dengan menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 405 dan 415 nm.

2.2.3 Karakterisasi senyawa aktif flavonoid yang memiliki peran sebagai inhibisi enzim siklooksigenase - 2 secara *in vitro*

Karakterisasi dilakukan terhadap fraksi teraktif yang memiliki daya inhibisi terbesar. Untuk mengetahui jenis komponen/gugus fungsi di dalamnya, fraksi diidentifikasi pola spektrumnya dengan *Fourier Transformation Infra Red (FT-IR) Spectroscopy*, dan UV-Vis spectroscopy

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Standarisasi Ekstrak Air dan Etanol Sambiloto

Penelitian ini diawali dengan pengujian standarisasi ekstrak yakni: organoleptik, senyawa penciri, kadar air, kadar abu, cemaran logam: Pb; Cd; As, cemaran aflatoxin dan cemaran mikrobiologi: angka lempeng total dan angka kapang / khamir yang mengacu pada standarisasi ekstrak BPOM RI, 2004.

Sample simplisia sambiloto dilakukan maserasi menggunakan pelarut air dan pelarut etanol selama 3 hari. Semua pelarut dipisahkan dari ampasnya kemudian dilakukan *freeze drying* untuk mendapatkan ekstrak kasar. Adanya senyawa penciri andrographolide ditunjukkan pada uji HPLC yang muncul pada t_R 6,7.

Hasil pada ekstrak kasar didapat kandungan air 2,4% - 2,8%. Kandungan air dalam suatu bahan ini akan mempengaruhi daya tahannya terhadap serangan mikroba, sehingga dapat diperkirakan cara penanganan terbaik bagi sampel dalam hal tempat dan waktu penyimpanan. Bila kandungan air yang terkandung dalam suatu bahan berkisar 3% - 7%, maka kestabilan optimum bahan akan tercapai, pertumbuhan mikroba dapat dikurangi dan memperpanjang masa simpan tanaman kering (Winarno, 1997). Ini dibuktikan dengan hasil uji cawan tuang yang memiliki nilai kecil.

Pada kadar abu yang diperoleh sedikit lebih besar dari yang ditetapkan yakni 1,03% - 1,15%. Hal ini dikarenakan proses pengabuan yang kurang sempurna dengan ditandai dengan bentuk abu yang tidak semua berwarna putih.

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi guna mencegah rusaknya senyawa metabolit

sekunder yang tidak tahan terhadap suhu tinggi. Maserasi dilakukan dengan 2 pelarut yakni air dan etanol, dilakukan selama 3 hari dan setiap hari diganti dengan pelarut yang baru. Sementara pelarut yang telah digunakan, dikumpulkan dan dikeringkan dengan menggunakan *freeze drying*. Secara umum hasil standarisasi ekstrak dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Perbandingan Standar Ekstrak Sambiloto

Uji	B POM	Hasil Penelitian
Organoleptik:		
Bentuk ekstrak	Kental	Kental agak menggumpal
Warna	Hijau kecoklatan	Hijau (ekstrak etanol) Kecoklatan (ekstrak air)
Bau	Khas	Khas
Rasa	Pahit	Pahit
Senyawa penciri:		
Andrographolid	Ada	Ekstrak Etanol : ada Ekstrak Air : ada
Kadar Air Ekstrak	<< 4 %	2,4% - 2,8%
Kadar Abu total	<< 1%	1,03% - 1,15%
Cemaran		
Pb	<< 10 mg/kg	0,0149 mg/kg
Cd	0,3 mg/kg	0,0007 mg/kg
As	10 µg/kg	1,8 µg/kg
Aflatoksin	20 µg/kg	B ₁ : nil; B ₂ : nil G ₁ : nil; G ₂ : nil
Angka lempeng total	<< 10 koloni/gram	14 kol/g ekstrak etanol 34 kol/g ekstrak air
Angka Kapang/Khamir	<< 10 koloni/gram	22 kol/g ekstrak etanol 16 kol/g ekstrak air

3.2 Penentuan Daya Inhibisi Ekstrak Air dan Ekstrak Etanol Sambiloto terhadap Enzim COX-2 secara In Vitro

Uji fitokimia pendahuluan dilakukan pada simplisia untuk melihat adanya metabolit sekunder flavonoid.

Kemudian dilakukan uji fitokimia pada ekstrak etanol, ekstrak air dan fraksi - fraksi yang memiliki rendemen tinggi untuk memastikan bahwa fraksi yang didapat termasuk golongan flavonoid. Hasil uji fotokimia tersaji pada Tabel 2.

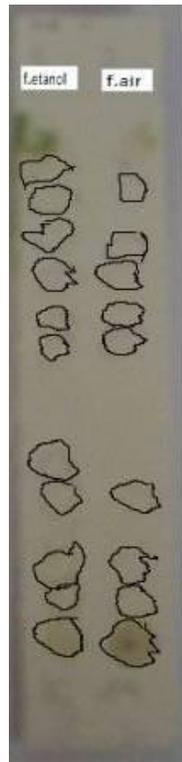
Tabel 2. Uji Fitokimia

EKSTRAK ETANOL			EKSTRAK AIR		
NO	Flavonoid	Warna	NO	Flavonoid	Warna
F-1-E			F-1-A	++	Kemerahan
F-2-E	+	Kekuningan	F-2-A		
F-3-E	+	Kemerahan	F-3-A		
F-4-E			F-4-A		
F-5-E			F-5-A	++	Kekuningan
F-6-E	++	Kemerahan	F-6-A	+	Kekuningan
F-7-E			F-7-A	+	Kekuningan
F-8-E	+	Kekuningan	F-8-A	+	Kekuningan
F-9-E	+	Kekuningan	F-9-A	+	Kekuningan
F-10-E	++	Kekuningan			
F-11-E	-	bening			

Fraksinasi ekstrak kasar flavonoid dilakukan secara bergradien dengan tingkat kepolaran rendah hingga kepolaran tinggi pada kisaran penggunaan komponen eluen terbaiknya. Dari sini diharapkan akan terjadi pola pemisahan yang lebih sempurna, fraksi yang didapatkan akan lebih murni, dan senyawa aktif didapat akan lebih banyak terisolasi. Eluen

terbaik yang didapat adalah campuran CHCl₃:MeOH, 8:2.

Penggunaan CHCl₃:MeOH sebagai eluen pada pemisahan flavonoid menggunakan penjerap silika gel pernah dilaporkan dan berhasil dengan perbandingan 15:1 sampai 3:1 dengan senyawa yang diperoleh golongan flavon, flavonol, flavonoid aglikon dan isoflavon (Markham, 1988).



Gambar 1. Pola pemisahan KLT ekstrak kasar sambilito dengan $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (8:2) yang dibaca pada λ 254 nm

Hasil eluen terbaik ini dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan KLT Preparatif. Pola yang dihasilkan antara ekstrak etanol dan air memberikan jumlah spot yang berbeda. Ekstrak etanol memberikan 11 spot dan ekstrak air memberikan 9 spot, sementara spot warna hijau yang berada paling atas diduga klorofil.

Tabel 3. Profil Hasil KLT Preparatif Ekstrak Sambilito

EKSTRAK ETANOL		EKSTRAK AIR	
NO	% rendemen	NO	% rendemen
F-1-E	1,79	F-1-A	0,99
F-2-E	1,82	F-2-A	0,63
F-3-E	2,73	F-3-A	0,22
F-4-E	1,46	F-4-A	0,78
F-5-E	1,20	F-5-A	0,85
F-6-E	2,26	F-6-A	0,81
F-7-E	1,75	F-7-A	1,82
F-8-E	2,00	F-8-A	0,66
F-9-E	7,36	F-9-A	0,76
F-10-E	3,42		
F-11-E	1,89		

Sample yang ditotolkan dari ekstrak etanol sebesar 1,2745 gram dan ekstrak air sebesar 1,6961 gram. Meski yang ditotolkan ke KLT Preparatif berbeda jauh, namun hasil rendemennya sangat jauh berbeda. Hal ini dikarenakan, banyaknya fraksi flavonoid yang tidak ikut terekstrak oleh air dan dibuktikan jumlah spot antara ekstrak air lebih sedikit dibanding ekstrak etanol pada eluen kloroform:metanol

3.3 Uji Inhibisi Ekstrak dan Fraksi terhadap Aktivitas Enzim Siklooksigenase-2 Secara *In vitro*

Uji ini yang dilakukan berdasarkan kemampuan ekstrak dan fraksi dalam menghambat sintesis prostaglandin, dimana asam arakidonat berperan dalam sintesis prostaglandin yang akan dikatalisis oleh enzim COX-2 (Darmawi, 2008). Semakin banyak jumlah prostaglandin yang direduksi oleh SnCl_2 maka semakin banyak Prostaglandin G_2 (PGG_2) yang tereduksi.

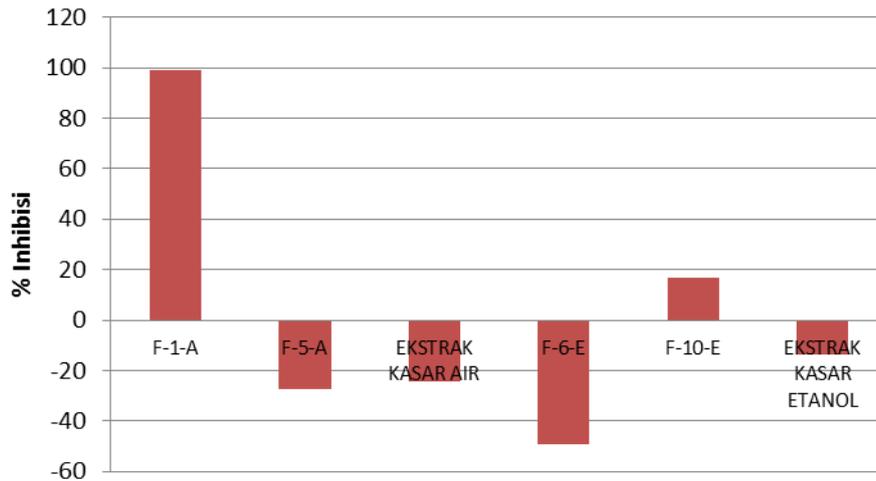
Gambar 2. Reaksi inhibisi siklooksigenase pada asam arakidonat menjadi PGG_2

Uji *in vitro* daya inhibisi ekstrak etanol, ekstrak air dan fraksi flavonoid dari sambilito terhadap aktivitas enzim COX-2 dilakukan dengan menggunakan konsentrasi 900 $\mu\text{g/ml}$. Fraksi yang terpilih ini didasarkan pada besarnya % rendemen dan uji fitokimia flavonoid.

Hasil uji daya inhibisi ekstrak dan fraksi sambilito terhadap aktivitas COX-2 secara *in vitro* (Gambar 3) menunjukkan bahwa fraksi ekstrak air F-1-A

memberikan daya inhibisi tertinggi 98,97 %. Sedang pada sambilito fraksi ekstrak etanol F-10-E hanya memberikan daya inhibisi 16,70 %. Semakin besar % inhibisinya maka PGG_2 semakin sedikit. Banyak tidaknya kandungan PGG_2 pada larutan uji, terlihat secara visual. Semakin banyak PGG_2 , larutan uji semakin berwarna kekuningan dan semakin sedikit warnanya lebih bening.

Uji Daya Inhibisi Ekstrak Air, Ekstrak Etanol dan Fraksi Sambiloto pada Enzim COX-2 secara *In Vitro*



Keterangan:

F-1-A : fraksi no 1 ekstrak air F-6-E : fraksi no 6 ekstrak etanol

F-5-A : fraksi no 5 ekstrak air F-10-E : fraksi no 10 ekstrak etanol

Gambar 3. Daya Inhibisi Ekstrak Air, Ekstrak Etanol dan Fraksi Sambiloto pada Enzim COX-2 secara *In Vitro*

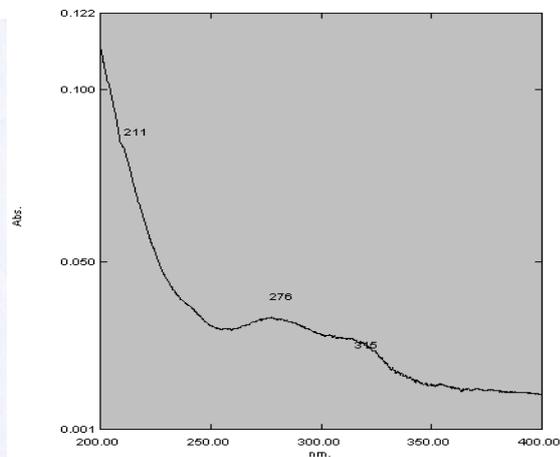
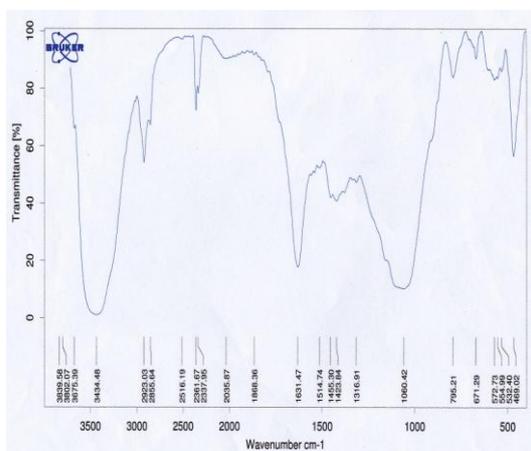
3.4 Karakterisasi Senyawa Flavonoid dalam Fraksi Teraktif

Fraksi yang dianalisis menggunakan metode spektroskopi UV-Vis dan spektroskopi IR dipilih fraksi yang memiliki nilai daya inhibisi yang tinggi terhadap enzim COX-2 secara *in vitro*, yaitu fraksi ekstrak air F-1-A dan fraksi ekstrak etanol F-10-E.

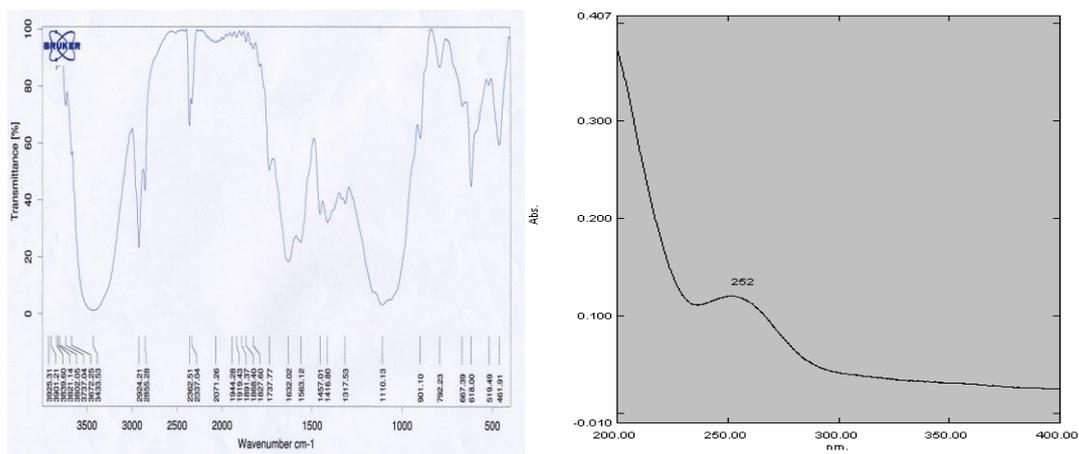
Spektra infra merah menunjukkan bahwa fraksi F-1-A kemungkinan mengandung gugus fungsi -OH ($3434,48\text{ cm}^{-1}$) yang didukung munculnya serapan pada daerah bilangan gelombang $1060,42\text{ cm}^{-1}$ untuk ikatan C-O alkohol. C-H alifatik muncul pada bilangan gelombang $2923,03\text{ cm}^{-1}$ dan diperkuat dengan munculnya serapan bending pada daerah bilangan gelombang $1423,84$ dan $1455,30\text{ cm}^{-1}$. Gugus ikatan C=C alkena dan aromatik ditunjukkan dengan munculnya serapan pada $1631,47\text{ cm}^{-1}$.

Ikatan hidrogen pada gugus OH selalu muncul pada flavon dengan memberikan nilai vibrasi ulur pada bilangan gelombang 3400 dan diperkuat pada 1100, sementara gugus fungsi alkena dan aromatik sering muncul pada ekstraksi flavonoid dengan menggunakan pengekstrak polar (Andersen, 2006). Bilangan - bilangan gelombang ini mengarahkan pada kelompok flavonoid golongan flavon.

Hal ini diperkuat dengan informasi spektrum UV-Vis bahwa fraksi F-1-A memberikan serapan puncak spektrum yang kuat pada 211 nm. Sementara itu, serapan puncak lemah terjadi pada 276 nm dan 316 nm. Secara umum, serapan spektrum pada 276 nm ini mengacu pada ciri golongan flavonoid yang memiliki serapan sistem cincin benzoil yang berada pada 270 - 290 nm dan serapan lemah pada 325 nm mengacu pada serapan sistem cincin cinamoil yang berada pada 310 - 330 nm (Markham, 1988).



Gambar 4. Spektrum IR dan UV dari fraksi F-1-A



Gambar 5. Spektrum FTIR dan UV fraksi F-10-E

Spektra infra merah menunjukkan bahwa fraksi F-10-E kemungkinan mengandung gugus fungsi -OH ($3434,48\text{ cm}^{-1}$) yang didukung munculnya serapan pada daerah bilangan gelombang $1110,13\text{ cm}^{-1}$ untuk ikatan C-O alkohol. C-H alifatik muncul pada bilangan gelombang $2924,21\text{ cm}^{-1}$ dan $2855,33\text{ cm}^{-1}$ yang diperkuat dengan munculnya serapan bending pada daerah bilangan gelombang $1423,84\text{ cm}^{-1}$ dan $1455,30\text{ cm}^{-1}$. Gugus ikatan C=C aromatik ditunjukkan dengan munculnya serapan pada $1632,02\text{ cm}^{-1}$ dan $1563,12\text{ cm}^{-1}$. Gugus -C=C- aromatik muncul pada serapan gelombang $1632,02\text{ cm}^{-1}$; $1563,12\text{ cm}^{-1}$; $1457,01\text{ cm}^{-1}$, yang diperkuat munculnya -C-H aromatik pada serapan gelombang $461,91\text{ cm}^{-1}$; $618,00\text{ cm}^{-1}$; dan $792,23\text{ cm}^{-1}$.

Pada tiga bilangan gelombang 1737 , 1632 dan 1563 secara nyata lebih mengarahkan pada spektrum yang kuat untuk senyawaan alkaloid, turunan flavon dan senyawa karbonil (Andersen, 2006).

Hasil analisa spektrum UV-Vis memberikan informasi bahwa fraksi F-10-E hanya memberikan serapan puncak spektrum yang kuat pada 252 nm . Fraksi ini diduga termasuk golongan senyawa polifenol, dimana senyawa polifenol memiliki 2 karakteristik absorpsi pada $240 - 285\text{ nm}$ dan $330 - 550\text{ nm}$ (Andersen, 2006). Padahal pada di $330 - 550\text{ nm}$, F-10-E tidak muncul serapan spektrum.

4. SIMPULAN

Standarisasi ekstrak air dan ekstrak sambiloto pada penelitian ini memenuhi standar ekstrak yang ditetapkan oleh BPOM RI, 2004 kecuali cemaran mikrobiologi. Pada konsentrasi $900\text{ }\mu\text{g/ml}$, ekstrak air dan ekstrak etanol tidak memiliki kemampuan untuk menghinibisi enzim COX-2 secara *in vitro*, sementara fraksi no 1 ekstrak air memiliki kemampuan menghinibisi $98,97\%$ dan fraksi no 10 ekstrak etanol memiliki kemampuan menghinibisi $16,70\%$. Diduga fraksi kesatu ekstrak air ini merupakan golongan senyawa flavonoid, sedangkan fraksi kesepuluh ekstrak etanol diduga golongan polifenol.

5. DAFTAR PUSTAKA

Andersen Oyvin M, Kenneth R Markham. Flavonoid: Chemistry, Biochemistry and Application. CRC Press. London. 2006.

[Anonim], COX Inhibitor screening assay. Catalog No. 560131. [Journal]. Cayman chemical company. Ann Arbor, MI, All rights reserved. USA. Planta med: 1-11. [26 Februari 2007].

Badan POM RI, Monografi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia, Volume 1, Cetakan Pertama, Jakarta, 2004.

Cai Hong, Muhammad Al Fayez, Richard G Tunstall, Sharon Platton, Peter Greaves, William P Stewart, Andreas J Gescher., The Rice Bran Constituent Tricin Potently Inhibit Cyclooxygenase Enzyme and Interferens with Intestinal Carcinogenesis in *Apc^{Min}* Mice, Molecular Cancer Journal, American Assosiation for Cancer Research, USA, 2005.

Dannhardt, G., Laufer S.. Structural Approach to Explain the Selectivity of COX-2 Inhibitors: Is There a Common Pharmacophore. Curr. Med. Chem.. 2000, (7), 1101-1112.

Jiang, Q., Elson Schwab, I., Courtemance, C., Ames, B.N., Gammatocopherol and its major metabolite, in kontras to alpha tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cell. Canadian Journal Anestheologist Society, USA, 2000.

Lambart, Joseph B., Herbert E Shurvell, David A Lightner, R Graham Cooks. Organic Structural Spectroscopy, Prentice Hall Inc. New Jersey, 1998.

Li Menkui, Xudong Xu, Hongjie Zhang, Cuiying Ma, Harry Fong, Richard Van Breemen, John Fitzloff. Secondary Metabolites from *Andrographis paniculata*, Chemical Pharmacy Bulletin, 2007, 55 (3), 455 - 458.

Mishra K Siddharta, Neelam S Sangwah, Rajender S Sangwan, Phcog Rev.: Plant Review. *Andrographis paniculata* (Kalmegh): A Review. Pharmacognosy Reviews. Central Institute of medical and Aromatic Plants (CIMAP), India, 2007, 1(2).

Markham K.R., Cara Mengidentifikasi Falvonoid. Diterjemahkan oleh Padmawinata, ITB Bandung, 1998.

Subbaramaiah Kotha, Pedro Michaluart, Michael B Sporn, Andrew j Dannenberg, Ursolic Acid Inhibits Cyclooxygenase Transcription in Human Mammary Epithelial Cell, Cancer Research, New York, 2000.

Zhang Fan, Nasser K Altorki, Juan R Mestre, Kortha Subbaramaiah, Andrew J Dannenberg, Curcumin Inhibits Cyclooxygenase2 Transcription in Bile Acid and Phorbol Ester-treated Human

Gastrointestinal Epithel Cell, Carcinogenesis, New York, 1999, 20(3).