



Pemanfaatan Nano Ekstrak Etanolik Kombinasi Meniran (*Phyllanthus Niruri* L.) Dan Bawang Putih (*Allium Sativum* L.) Sebagai Immunomodulator Alami Dalam Pengembangan Nanoherbal, Studi *In Silico* Dan *In Vitro*

Utilization Of Nano Ethanolic Extract Combination Chamber Bitter (*Phyllanthus Niruri* L.) And Garlic (*Allium Sativum* L.) As A Natural Immunomodulator In Nanoherbal Development, *In Silico* And *In Vitro* Study

Kadek Hendra Darmawan^{1*}, Ronny Martien², Nugraha Dian Erlangga³, Sarah Marisa Sitohang⁴, Hamindar Pambudi⁵

¹ Bachelor students in Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada

² Departement of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Gadjah Mada University

³ Bachelor students in Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada

⁴ Bachelor students in Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada

⁵ Bachelor students in Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada

*Email korespondensi : hendradarmawan62@gmail.com

Abstrak : Senyawa filantin dalam meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dan lektin dalam bawang putih (*Allium sativum* L.) terbukti sebagai agen immunomodulator melalui interaksi dengan reseptor TLR. Sediaan immunomodulator yang beredar masih terdapat banyak kekurangan, salahsatunya adalah rendahnya potensi obat. Pengembangan nano teknologi merupakan solusi yang tepat karena mampu meningkatkan absorpsi obat dan memperkecil dosis obat sehingga mampu menaikkan potensi obat yang ada. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui interaksi senyawa filantin dan lektin dengan protein reseptor TLR2-TLR1 melalui *Molecular Docking* dan dihasilkannya sediaan nanoemulsi dari kombinasi ekstrak etanolik meniran dan bawang putih yang memiliki aktivitas fagositosis terhadap sel makrofag. Uji *in silico* melalui *Molecular Docking* memperlihatkan senyawa filantin memiliki afinitas untuk berikatan dengan TLR2-TLR1, Skor docking senyawa lektin (-33.5389) lebih rendah dibanding skor docking senyawa filantin (-31.5112). Hal ini menunjukkan bahwa senyawa lektin memiliki afinitas lebih tinggi untuk berikatan dengan TLR2-TLR1. Formulasi nanoemulsi kombinasi kedua ekstrak dihasilkan dengan menggunakan metode SNEDDS dengan komposisi ko-surfaktan:surfaktan:minyak adalah 1:5.25:1. Formulasi nanoemulsi stabil pada kadar 0.414 % (b/v). Uji *in vitro* yaitu indeks fagositasi (5,03) dan rasio fagositasi (95%) menunjukkan bahwa hasil formulasi nanoemulsi kombinasi ekstrak meniran dan bawang putih memiliki indeks dan rasio

fagositasi lebih tinggi dibandingkan kombinasi ekstrak tanpa formulasi nanoemulasi maupun kontrol positif. **Abstract :** The Filantin compounds in chamber bitter (*Phyllanthus niruri* L.) and lectin in garlic (*Allium sativum* L.) was proven as immunomodulatory agents through interaction with *Toll-Like Receptors* (TLR) which have role in innate immune responds. Immunomodulators drug available on the market still have many shortcomings such as the low potential. Drug developing by nanotechnology is the right solution to increase the potential of the drug by increasing the absorption and minimize the dose. This research aimed to know the interaction of filantin and lectin with TLR2-TLR1 receptors through *molecular docking* and produce the nanoemulsion combination of chamber bitter and garlic ethanolic extracts that have phagocytosis activity. *In silico* assay through *molecular docking* showed that filantin has affinity for binding to TLR2-TLR1, docking score of lectin (-33,5389) was lower than the filantin (-31.5112). That means lectin has higher affinity for binding to TLR2-TLR1. Nanoemulsion was formulated by SNEDDS methods with composition of co-surfactant: surfactant: oil is 1: 5,25: 1. The nanoemulsion stable at 0,414% (w/v). *In vitro* assay of phagocytic index (5,03) and ratio (95%) showed that the formulation with nanoemulsion of the combination has higher phagocyte index and ratio than the formulation without nanoemulsion or even the positive controls.

Keywords : *Allium sativum* L., Immunomodulator, *Phyllanthus niruri* L., nano-herbs, TLR1-TLR2

1. Pendahuluan

Penyakit terkait gangguan sistem imun merupakan salah satu penyakit dengan tingkat insidensi tertinggi di dunia. Salah satu jenis penyakit terkait lemahnya sistem imun ini adalah penyakit infeksi saluran bawah (lower respiratory infections) yang menempati peringkat ke-3 dalam 12 besar penyakit yang menyebabkan kematian manusia di dunia dan juga penyakit AIDS (Immunodeficiency Virus/Acquired Immune Deficiency Syndrome) yang menempati peringkat ke-6 pada tahun 2008 (WHO,2008). Infeksi saluran nafas bawah terjadi karena defisiensi imun sehingga bakteri patogen dapat menyerang tubuh sedangkan HIV/AIDS disebabkan oleh virus HIV yang menyerang sel CD4 darah putih yang mengakibatkan rusaknya sistem imun (Cooper et al., 2013). Sedangkan sistem kekebalan tubuh (sistem imunitas) sendiri merupakan kumpulan komponen seluler, kimia, dan soluble kompleks yang dirancang untuk melindungi tubuh terhadap zat asing termasuk agen infeksi dan sel tumor (Smith, 1999).

Menanggapi tingginya insidensi penyakit terkait sistem imun maka dewasa ini semakin banyak diproduksi produk immunomodulator. Namun produk immunomodulator yang tersedia di masyarakat masih terdapat beberapa kelemahan di antaranya adalah efek terapi obat yang kurang poten dan munculnya efek samping yang merugikan. Berbagai penelitian dilakukan untuk meningkatkan potensi pengembangan produk agen immunomodulator, salah satunya melalui pengembangan ke arah herbal yang lebih poten dan memiliki efek samping minimal. Banyak senyawa dalam tumbuhan yang telah terbukti memiliki efek immunomodulator. Salah satunya adalah senyawa filantin yang terkandung dalam meniran (*Phyllanthus niruri* L.) yang berfungsi sebagai agen immunomodulator dengan mekanisme peningkatan aktivitas fagositosis sel makrofag (Sunarno,2007). Selain filantin, senyawa lektin yang ditemukan dalam bawang putih (*Allium sativum* L.) terbukti dapat memodulasi sistem imun dengan mengaktifkan *murine macrophage cell line* (Koo et al., 2003). Studi lain menunjukkan bawang putih mempunyai efek

immunomodulator seperti proliferasi T-cell dan aktivasi makrofag (Chandrashekar, P. M., 2011), mengurangi produksi IL12, TNF α , IL1 α , IL6, IL8, IFN γ , IL2; meningkatkan IL10 (Hodgeet al, 2002), serta meningkatkan level plasma NO dan IFN α (Bhattacharyya et al, 2007).

Efek produk herbal akan maksimal maka diperlukan formulasi yang mampu meningkatkan kelarutan, stabilitas, bioavailabilitas, dan sistem yang tertarget agar penggunaan simplisia lebih efektif. Pendekatan inovatif yang banyak diteliti adalah penerapan nanoteknologi untuk menghasilkan partikel atau sistem pembawa berukuran nanometer (1-100 nm). Salah satunya adalah dengan sediaan nanopartikel kombinasi ekstrak etanolik meniran dan bawang putih. Produk nanopartikel telah digunakan untuk menciptakan teknologi baru untuk memelihara lingkungan dan melindungi kesehatan masyarakat (Wiesner, 2007). Melalui penelitian ini didapatkan formulasi nanopartikel dari kombinasi kedua ekstrak senyawa, pengujian aktivitas fagositasi makrofag dengan parameter indeks fagositasi dan rasio fagositasi, serta dilakukan uji *in silico* dengan *molecular docking* guna mengetahui aktivitas senyawa pada aras molekuler.

2. Metodologi Penelitian

2.1. Alat

Alat-alat gelas (Pyrex), *vacuum rotary evaporator* (Erweka), seperangkat kandang tikus, seperangkat alat gelas, spuit p.o, spuit i.v, pipa kapiler, timbangan tikus, sentrifus, alat *flowcytometer* (BD Facs Calibur), Spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U-2900), mikropipet 20-200 μ L (Transferpette), mikropipet 100-1000 μ L (Transferpette), kuvet 1 mL (Spectra), *vortex*, lampu UV 254 nm dan UV 366 nm, oven, pipa kapiler, bejana pengembang.

2.2. Bahan

Meniran yang sudah dideterminasi B2POOT, Tawangmangu dan umbi Bawang Putih, etanol teknis (General Labora), *n*-heksan teknis (General Labora), metanol teknis (General Labora), aquadest (General Labora), metanol, etil asetat, kloroform, toluen, reagen Dragendorff, reagen Vanilin-asam sulfat, reagen AlCl₃, reagen *Molisch*, dan silika gel GF 254.

2.3. Jalannya Penelitian

2.3.1. Pengumpulan Bahan dan Ekstraksi

Bahan uji berupa serbuk Meniran yang sudah dideterminasi B2POOT, Tawangmangu dan umbi Bawang Putih yang didapatkan dari daerah Yogyakarta dan dideterminasi di Laboratorium Farmakognosi Farmasi UGM, Yogyakarta. Pembuatan ekstrak Meniran dan bawang putih yang telah diperoleh dikeringkan kemudian dimaserasi dengan menggunakan Etanol 70%.

2.3.2. Formulasi Nanopartikel

Penentuan jenis minyak, surfaktan dan ko-surfaktan : pada tahapan ini diteliti minyak nabati, surfaktan, dan ko-surfaktan yang memberikan kelarutan paling baik untuk kedua ekstrak dan memberikan sistem nano yang paling baik.

Optimasi formula : minyak, surfaktan dan ko-surfaktan yang sudah dipilih kemudian ditentukan perbandingannya yang paling optimal. Kemudian dilihat ukurannya menggunakan TEM (*Transmission Electron Microscope*).

2.3.3. Docking senyawa

Preparasi Protein dan Senyawa Uji : file protein target diolah menggunakan *software* YASARA untuk mengatur kondisi lingkungan sesuai dengan kondisi fisiologis manusia. Dibuat struktur filantin dan lektin menggunakan *software* MarvinSketch.

Docking Ligan Senyawa Eksperimental dan Ligan Senyawa Uji : dilakukan docking ligan dengan protein TLR2-TLR1 lalu dibandingkan skor yang didapat antara kompleks protein target dan ligan aslinya dengan kompleks protein dengan filantin dan lektin.

2.3.4. Pelaksanaan Uji *in Vitro*

2.3.4.1. Isolasi Makrofag

Tikus dikorbankan dengan kloroform, dibuat irisan dan dibuka kulit perutnya. Dimasukkan media RPMI dingin ke dalam rongga perut (10 ml) menggunakan syringe, syringe ditarik, dibiarkan selama 5 menit sambil ditekan. Cairan RPMI dalam rongga perut tikus diambil, dipindahkan ke dalam tabung polipropilen dan dimasukkan ke dalam es. Kemudian disentrifugasi suspensi tersebut selama 10 menit (1000 rpm), dibuang supernatan dan disuspensikan dalam RPMI lengkap.

2.3.4.2. Uji fagositosis makrofag menggunakan lateks

Kaca *coverslip* ditempatkan ke dalam sumuran dari 24-well *multiwell plate*. Ditambahkan 1 ml suspensi makrofag dalam RPMI, diinkubasi selama 1 malam. Media kultur dibuang, ditambahkan 1 ml media kultur yang baru. Kemudian ditambahkan sampel uji, pelarut dan control positif, diinkubasi selama 1 jam. Ditambahkan 10 µl suspensi lateks, diinkubasi selama 1 jam di dalam inkubator. Ditambahkan 1 tetes larutan FBS dan dibiarkan 5 menit. Kemudian *coverslip* dicuci dengan PBS, ditambahkan cat Giemsa yang dibuat baru, dibiarkan selama 15 menit, dicuci dengan bufer. *Coverslip* diperiksa di bawah mikroskop untuk melihat partikel yang difagositasi oleh makrofag.

2.3.5. Analisis Hasil

2.3.5.1. Formulasi Nanoemulsi

Data yang diperoleh berupa perbandingan ko-surfaktan:surfaktan:minyak. Kemudian dibuat rentang bawah dan atas untuk mencari formulasi yang paling optimal.

2.3.5.2. Analisis *docking*

Dari hasil pen-*docking*-an akan diperoleh skor docking. Semakin rendah skor, maka ikatannya semakin kuat dan stabil. Jika semakin kuat ikatan antara phylantin dan lektin dengan TLR1-TLR2 maka makin tinggi potensi senyawa uji untuk berinteraksi aktivitas TLR1-TLR2.

2.3.5.3. Analisis *in Vitro*

Dari uji *in Vitro* ditentukan indeks fagositosis (jumlah rata-rata partikel yang difagositasi tiap 100 makrofag) dan rasio fagositosis (persentase makrofag yang memfagositosis partikel tiap 100 makrofag).

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Molecular Docking Filantin dan Lektin dengan TLR2-TLR1

Kuat/lemahnya ikatan yang dapat terbentuk antara senyawa uji dengan reseptor dibandingkan ligand- reseptor dapat dilihat dari harga skor docking, Menurut referensi semakin rendah nilainya maka menunjukkan semakin mudah ikatan yang terbentuk.

Tabel 1. Skor docking antara TLR2-TLR1 dengan senyawa uji

Ligand	Score Docking
BMA- 924	-33.2946
Filantin	-31.5112

Skor *docking* antara TLR2-TLR1 dengan filantin memiliki nilai yang lebih rendah dibandingkan skor *docking* TLR2-TLR1 dengan BMA-9264, senyawa yang sudah diketahui memicu sistem imun. Hal ini bukan berarti bahwa senyawa filantin tidak mempunyai aktivitas sebagai imunomodulator karena filantin merupakan senyawa alam yang beberapa di antaranya bertindak sebagai adjuvan dalam imunomodulator yang berikatan pada reseptor bukan pada sisi aktifnya. Berbeda dengan senyawa lektin yang mempunyai nilai skor *docking* yang lebih rendah, berarti senyawa lektin mempunyai afinitas yang tinggi dan mudah berikatan dengan TLR2-TLR1 dibandingkan ikatan antara BMA dengan TLR2-TLR1.

3.2. Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan secara maserasi (1:10) menggunakan etanol 70% selama 3 hari, dilanjutkan remaserasi (1:5) selama 2 hari. Hasil ekstraksi didapatkan 90.46 gram ekstrak kental meniran dari 500 g serbuk meniran dan 1.281 kg ekstrak kental bawang putih dari 6.42 kg gram umbi basah bawang putih. Dengan demikian didapatkan randemen 18.09 % ekstrak kental meniran dan 19.96 % ekstrak kental bawang putih.

3.3. SNEDDS

Formulasi nanoemulsi kombinasi ekstrak dibuat dalam *Self Nano Emulsifying Drug Delivery Systems*. Pemilihan ko-surfaktan, surfaktan dan minyak nabati didapatkan data berat kering sisa ekstrak setelah dilakukan perlakuan (vortex, sonikasi, waterbath oven) sesuai pada tabel 2.

Tabel 2. Berat kering ekstrak setelah perlakuan

Komposisi	Jenis	Berat kering (gram)
Ko-surfaktan	PEG 400	0.29
	Propilen Glikol	0.10
Surfaktan	Tween 80	0.15
	Span 80	0.17
	Span 20	0.21
Minyak Nabati	<i>Corn Oil</i>	0.13
	<i>Rice Brand Oil</i>	0.10
	<i>Virgin Coconut Oil</i>	0.11

Pemilihan jenis ko-surfaktan, surfaktan dan minyak nabati menghasilkan masing-masing 1 jenis komposisi, yaitu propilen glikol sebagai ko-surfaktan, tween 80 sebagai surfaktan dan *RBO* (*Rice Brand Oil*) sebagai minyak nabati. Selanjutnya ketiga komposisi tersebut diformulasikan dengan berbagai perbandingan untuk mendapatkan perbandingan masing-masing komposisi optimal formulasi SNEDDS. Formula yang digunakan seperti pada tabel 3.

Tabel 3. Persen transmittan formulasi SNEDDS tanpa ekstrak

Propilen glikol	Tween 80	RBO	% Transmittan (%)
-----------------	----------	-----	-------------------

1	6	1	33.4
1	5	1	80.2
1	4	1	29.4
1	3	1	9.8
1	2	1	11.5

Komposisi optimal sistem SNEDDS dari komposisi propilen glikol: tween 80: RBO adalah 1:5:1 dengan % transmitten sebesar 80.2%. % transmitten belum mencapai 90% sehingga diperlukan penggantian komposisi ko-surfaktan, surfaktan dan minyak nabatinya (tabel 4) yang selanjutnya dilakukan pembuatan rentang bawah sampai rentang paling tinggi (tabel 5). Ukuran partikel dilihat dengan menggunakan TEM (*Transmission Electron Microscope*). Hasil dari pengukuran dapat dilihat pada gambar 3.

Tabel 4. Nilai transmitan (%) formulasi SNEDDS tanpa ekstrak dengan perbandingan 1:5:1

Komposisi	Transmittan(%)
Propilen glikol: span 80: RBO	63.8
Propilen glikol: span 80: VCO	40.5
Propilen glikol: tween 80: VCO	99.0

Tabel 5. Persen transmitten formulasi SNEDDS baru tanpa ekstrak

<u>Propilen glikol</u>	Tween 80	VCO	<u>% Transmittan (%)</u>
1	4.25	1	33
1	4.5	1	14.7
1	4.75	1	46.6
1	5.0	1	98.6
1	5.25	1	99.8
1	5.5	1	25.6
1	5.75	1	69.3

Hasil pengujian menunjukkan formulasi optimal adalah propilen glikol, tween 80, VCO dengan perbandingan 1:5.25:1. Pembuatan nanoekstrak dilakukan dengan menambahkan kedua ekstrak dengan perbandingan 1:1 ke dalam sistem SNEDDS formula optimal. Hasil dari penambahan ekstrak bisa dilihat pada gambar 1 dan tabel 6.

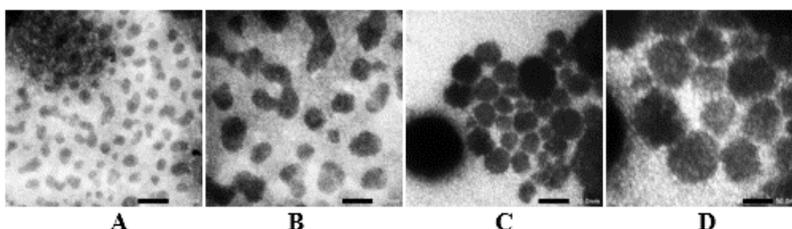


Gambar 2. Kelarutan ekstrak dalam formulasi

Tabel 6. Persen transmitten formulasi SNEDDS dengan ekstrak

Berat ekstrak kombinasi (mg)	Transmittan (%)
2 (1+1)	98.4
6 (3+3)	97.8
10 (5+5)	93.2
24 (12+12)	93.0
30 (15+15)	90.9
40 (20+20)	-*

*formula tidak stabil dan mengendap pada penambahan ekstrak 40 mg sehingga formulasi optimal adalah penambahan 30 mg ekstrak (kadar=0.414%).

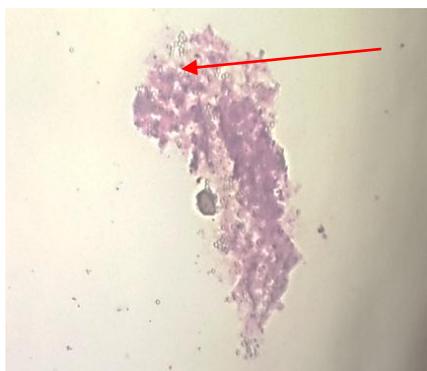


Gambar 3a. & 3b. merupakan ukuran partikel dari formulasi dengan kadar 0.083% dan 3c. & 3d. merupakan ukuran partikel dari formulasi dengan kadar 0.414%.

Dapat dilihat bahwa ukuran partikel dari nanoemulsi kombinasi ekstrak meniran dan bawang putih baik dengan kadar 0.083% maupun 0.414%. memiliki ukuran partikel kurang dari 100 nm. Namun kadar 0.083% memiliki penyebaran partikel yang lebih baik.

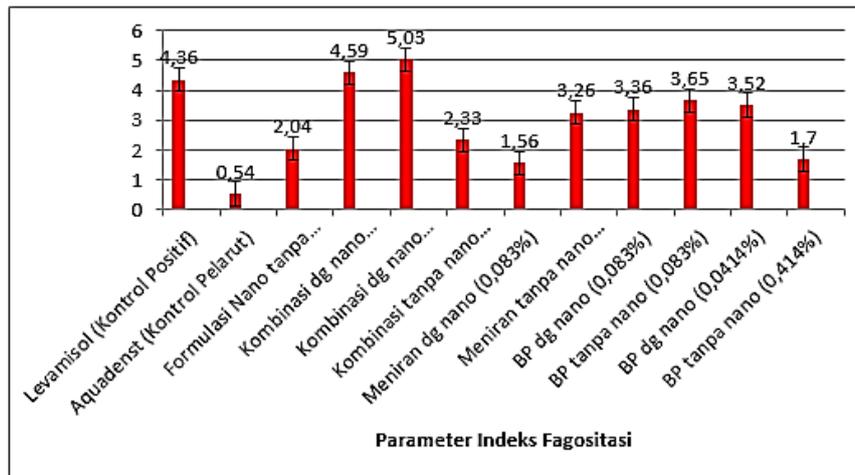
3.4. Uji *in vitro*

Uji *in vitro* dilakukan dengan menghitung nilai indeks dan rasio fagositasi. Indeks fagositasi adalah purata lateks yang dimakan oleh 100 makrofag yang memakan lateks. Sedangkan rasio fagositasi adalah persentase makrofag yang memakan lateks dari 100 makrofag. Hasil dari uji dapat dilihat pada Gambar 3, Grafik 1 dan Grafik 2.



Gambar 4. Makrofag memakan lateks

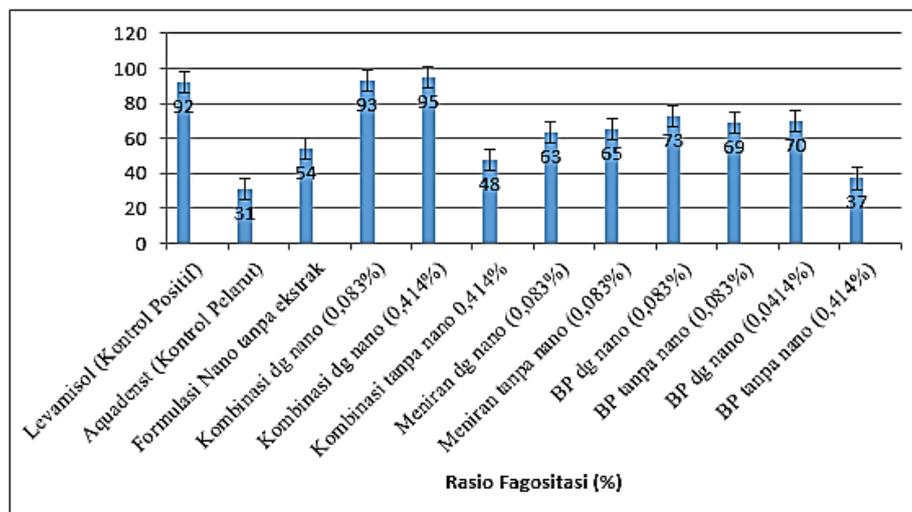
Tanda anak panah menunjukkan lateks yang dimakan makrofag. Dari semua sampel yang diuji menunjukkan selalu ada makrofag yang memakan lateks, namun berbeda jumlah yang dimakannya.



Grafik 5. Grafik Indeks Fagositasi Makrofag

Gambar-5 yaitu grafik indeks fagositosis makrofag dapat dilihat bahwa kombinasi ekstrak meniran & BP dengan formulasi SNEDDS memiliki nilai indeks fagositasi lebih tinggi dibandingkan kombinasi tanpa formulasi SNEDDS maupun kontrol positif. Hal ini menunjukkan hasil formulasi mempunyai efek imunomodulator lebih poten dari pada tanpa formulasi maupun control positif dengan mekanisme aktivasi makrofag.

Rasio fagositasi hasil uji berbanding lurus dengan indeks fagositasinya. Rasio fagositasi dari formulasi nanoemulsi kombinasi dengan kadar 0.414 % memiliki rasio fagositasi lebih tinggi daripada rasio fagositasi tanpa formulasi nano maupun control positif, levamisol 0.5%. Ini menunjukkan hasil formulasi mempunyai efek imunomodulator lebih poten dari pada tanpa formulasi maupun control positif dengan mekanisme aktivasi makrofag. hal ini disebabkan karena semakin kecil ukuran partikel maka semakin mudah senyawa itu terabsorpsi oleh makrofag, sehingga makrofag lebih cepat terstimulasi untuk memakan lateks, tersaji pada gambar-6.



Gambar 6. Grafik Rasio fagositasi makrofag

Kesimpulan

Pada penelitian ini dihasilkan formulasi nanopartikel ekstrak meniran dan bawang putih yang stabil pada kadar 0,414% b/v. Pembawa dengan sistem SNEDDS yang digunakan adalah PEG,

tween 80 dan VCO dengan perbandingan 1:5.25:1 dan penambahan kombinasi ekstrak ((1:1) sebanyak 30 mg. Formulasi nano yang dihasilkan terbukti dapat memodulasi sistem imun dengan meningkatkan fagositasi makrofag dilihat dari indeks dan rasio fagositasi yang lebih tinggi dari pada kontrol positif dan formulasi tanpa sistem nano, di mana semakin tinggi indeks dan rasio fagositasi menunjukkan aktivitas fagositasi makrofag semakin meningkat. Senyawa lektin dapat berikatan dengan TLR1-TLR2, lebih baik daripada ligan *native*-nya, yang ditunjukkan oleh skor docking lektin yang lebih rendah dari ligan *native*-nya.

Ucapan Terimakasih

Terimakasih kami ucapkan kepada KEMENRISTEK DIKTI melalui program Pekan Kreativitas Mahasiswa tahun pelaksanaan 2015 yang telah mendanai penelitian ini. Serta seluruh pihak yang turut andil membantu dalam penyusunan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bhattacharyya M, Girish GV, Karmohapatra SK, Samad SA, Sinha AK. *Systemic production of IFN-alpha by garlic (Allium sativum) in humans*. J. Interferon Cytokine Res. 2007;27(5): 377–382. [PubMed]
- Chandrashekar, P. M., 2011, *An Investigation of the Immunomodulatory Activities of Garlic (Allium Sativum L.)*, PhD thesis, University of Mysore.
- Cooper Arik, et al., 2013, *HIV-1 causes CD4 cell death through DNA-dependent protein kinase during viral integration*, Nature 498, 376-379
- Hodge G, Hodge S, Han P. *Allium sativum (garlic) suppresses leukocyte inflammatory cytokine production in vitro: Potential therapeutic use in the treatment of inflammatory bowel disease*. Cytometry .2002;48(4): 209–215. [PubMed]
- Koch, H.P., Lawson, L.D. (Eds.), 1996, *Garlic: The Science and Therapeutic Application of Allium sativum L. and Related Species*, 2nded, Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1–329.
- Koo, H.N., Hong, S.H., Seo, H.G., Yoo, T.S., Lee, K.N., Kim, N.S., Kim, C.H., Kim, H.M., 2003, *Inulin stimulates NO synthesis via activation of PKC-alpha and protein tyrosine kinase, resulting in the activation of NF-kappaB by IFN-gamma-primed RAW 264.7 cells*, J. Nutr. Biochem 14, 598–605
- Meredith, T. J., 2008, *The Complete Book of Garlic: A Guide for Gardeners, Growers, and Serious Cooks*. Timber Press, Portland, Oregon.
- Paithankar V. V., et al, 2011, *Phyllanthus Niruri: A magic Herb*, Research in Pharmacy 1(4): 1-9.
- Robert A, Freitas Jr, 1999, [Nanomedicine, Volume I: Basic Capabilities, ISBN 1- 57059-645-X](#).
- Sunarno, 2007, *The Effect of Phyllanthus niruri L in Neutrophil Percentages, Splenic Bacterial Colonies and Liver Histopathology of Balb/C Mice Infected by Salmonellatyphimurium* (Tesis), Universitas Diponegoro, Semarang.

Smith DA, Germolec DR, 1999, *Introduction to immunology and autoimmunity*, Environmental Health Perspective;107 (Suppl 5):661-665.

Wiesner, M. R. 2007. Environmental Nanotechnology Application and Impacts of Nano materials. United States of America: The McGraw-Hill Companies. Halaman 9.