

RESEARCH ARTICLE

Efek Ekstrak *Acanthus Illicifolius* Terhadap Ekspresi Antibodi *Anticandida Albicans* Pada Tikus Wistar Terimunopresi dengan Oral Candidiasis

(The Effect of Acanthus Illicifolius Extract On Anticandida Albicans Antibody in Wistar Rats with Oral Candidiasis Immunosuppressed Model)

Dwi Andriani*, Dwi Setianingtyas**, Nafi'ah**

*Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah Surabaya

**Penyakit Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah Surabaya

ABSTRACT

Background: *Candida albicans* (C.Albicans) causes oral candidiasis. *Candida* adhesion proteins stimulate the immune system to eliminate C.albicans chloroform extract of acanthus leaves illicifolius have inhibitory against C.Albicans. **Purpose:** To proved the potential *Acanthus illicifolius* (A.illicifolius) extract to inhibit the growth of C.Albicans in rats with oral candidiasis. **Materials and Methods:** This study was true experimental with post test only control group design. Wistar rats were used and imunopresi with dexamethasone and ditetrasiklin peroral after that induced by C.albicans 6x10⁸ on the tongue of rats for 14 days. Divided into five groups, healthy (G1), candidiasis (G2), treatment group 1 (G3): candidiasis + nystatin, Treatment 2 (G4): candidiasis+extract A.illicifolius 8%, and Treatment 3 (G5) : candidiasis+extract A.illicifolius 16%. The rats was treated for 14 days after induction of candida. A.illicifolius chloroform extraction method was maceration. Samples was processed immunohistochemistry staining methods and added antibody anticandida albicans (IgG mouse). Observed the results using microscope (magnification 400x). Data were analyzed with the Kruskal-Wallis and Mann Whitney. **Results:** There was significant differences between G1 with G2, G3, G4, G5 ($p < 0,05$). There was significant difference between G2 to G3, G4 and G5 ($p < 0,05$). There was no significant difference between G3, G4, and G5 ($p > 0,05$). **Conclusion.** A.illicifolius extract have potential to inhibit the growth of *Candida albicans* in rats with oral candidiasis.

Keywords: *Anticandida albicans* antibody, Immunosuppressed, Oral candidiasis, *Candida albicans*, *Acanthus illicifolius*

Correspondence: Dwi Andriani, Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry, Hang Tuah University, Arif Rahman Hakim 150, Surabaya, Phone 031-5912191, Email: dwi.andriani@hangtuah.ac.id

ABSTRAK

Latar Belakang: *Candida Albicans* (*C.Albicans*) merupakan penyebab oral candidiasis. Perlekatan protein candida memacu sistem imun tubuh untuk mengeliminasi *C.albicans*. Ekstrak chloroform dari daun *Acanthus ilicifolius* memiliki daya hambat terhadap *C.Albicans*. **Tujuan:** Membuktikan potensi ekstrak *Acanthus ilicifolius* (*A.ilicifolius*) dalam menghambat pertumbuhan *C.Albicans* pada tikus dengan oral candidiasis. **Bahan dan Metode:** Jenis penelitian ini adalah true experimental dengan rancangan penelitian menggunakan post test only control group design. Menggunakan hewan coba tikus wistar yang diimunosupresi dengan dexamethasone dan ditetrasiklin peroral dan diinduksi dengan *C.albicans* 6×10^8 pada lidah tikus selama 14 hari. Dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok sehat (G1), Kelompok candidiasis (G2), Kelompok perlakuan 1 (G3) : candidiasis+nistatin, Perlakuan 2 (G4) : candidiasis+ekstrak *A.ilicifolius* 8%, dan Perlakuan 3 (G5) : candidiasis+ekstrak *A.ilicifolius* 16%. Pemberian terapi selama 14 hari setelah induksi candida. Metode ekstraksi chloroform *Acanthus ilicifolius* adalah maserasi. Pengecatan sampel dengan immunohistokimia ditambahkan antibodi anticandida albicans (IgG mouse). Hasil diamati dimikroskop (pembesaran 400x). Data dianalisa dengan Kruskal-wallis dan Mann withney. **Hasil:** Terdapat perbedaan signifikan antara G1 dengan G2,G3,G4,G5 ($p < 0,05$). Terdapat perbedaan signifikan antara G2 dengan G3,G4 dan G5 ($p < 0,05$). Tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara G3,G4, dan G5 ($p > 0,05$). **Simpulan:** Ekstrak *Acanthus ilicifolius* memiliki potensi menghambat pertumbuhan *Candida Albicans* pada tikus dengan oral candidiasis.

Kata Kunci: Antibody anticandida albicans, Immunosupresi, Oral candidiasis, *Candida albicans*, *Acanthus ilicifolius*

Korespondensi: Dwi Andriani, Bagian Biologi Oral, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah, Arif Rahman Hakim 150, Surabaya, Telepon 031-5912191, Email: dwi.andriani@hangtuah.ac.id

PENDAHULUAN

Infeksi oportunistik kandidiasis oral disebabkan oleh pertumbuhan berlebihan dari jamur *Candida*. Sekitar 85—95 % infeksi kandidiasis oral disebabkan oleh jamur *Candida albicans* (*C. albicans*).¹ Penelitian di Surabaya tahun 2007, pasien HIV/AIDS yang menderita kandidiasis oral didapatkan *C.albicans* 35,29% dan *C.non-albicans* 64,71% (*C. tropicalis* 29,41%, *C.dubliniensis* 14,71%, *C.glabrata* 14,71% dan *C.guilliermondii* 5,88%). Sudarmawan (2009) menyatakan bahwa dari 30

pemakai gigi-tiruan, 32,3% terdeteksi adanya *Candida albicans*.²

Oral candidiasis merupakan infeksi jamur yang paling banyak ditemukan pada rongga mulut yang disebabkan oleh jamur *Candida*, khususnya *C.albicans*. *Candida* merupakan mikroflora normal pada rongga mulut komensal yang bersifat patogen oportunistik dengan populasi mencapai 40-60 %.^{3,4} Perlekatan dan kontak fisik antara *C. albicans* dan sel inang mengaktifasi mitogen activated protein kinase (AMP-Kinase) yang dibutuhkan untuk pembentukan hifa invasive dan pembentukan biofilm.⁵

Perlekatan protein candida memacu sistem imun tubuh untuk mengeliminasi *C.albicans*. Sel fagosit yaitu makrofag mengenali dan menghancurkan patogen melalui beberapa reseptor merangsang substansi mikrobial melalui *Cluster Of Differentiation* (CD)14 yang diekspresikan ke permukaan sel akan mengaktifkan TLR yang merupakan mediator kunci imunitas alami. Aktivitas fagositosis oleh makrofag akan terhambat bila terjadi penurunan ekspresi TLR2 oleh *C. Albicans*.⁶ Immunoglobulin G dilaporkan terlibat dalam proses ini, sehingga dapat dijadikan salah satu marker untuk pemeriksaan candida pada pasien yang menderita candidiasis.⁷

Salah satu golongan anti jamur yang sering digunakan untuk pengobatan *oral candidiasis* secara topikal adalah nistatin. Nistatin dapat menyebabkan kematian sel melalui kerusakan membran sel, diikuti penghambatan terhadap glikolisis dan sintesis protein.⁸ Namun penggunaan obat-obat antifungi yang terbuat dari bahan kimia sering menimbulkan banyak masalah seperti adanya efek samping yang serius, resistensi, aturan pakai yang menyulitkan, dan perlunya pengawasan dokter, selain harganya mahal.⁹ Dibutuhkan obat anticandida alternatif untuk pengobatan candidiasis yang aman dengan efek samping minimum.

Salah satu tanaman alami yang telah lama dikenal sebagai tanaman obat tradisional adalah mangrove yang merupakan flora pesisir. Beberapa mangrove memiliki komponen bioactive yang dapat berfungsi sebagai antibakteri, antivirus, dan antifungi.¹⁰ *Acanthus ilicifolius* adalah tanaman mangrove dari family *Acanthaceae* yang tumbuh didaerah tropis di Asia

dan Afrika. Tumbuhan ini digunakan oleh masyarakat malaysia untuk mengobati rematik, neuralgia, dan luka dari panah beracun. Di India, tumbuhan yang dikenal dengan nama Sahachara ini digunakan untuk mengobati batuk dan asma. Ekstrak air dari tumbuhan ini juga digunakan untuk mengobati flu dan dermatitis oleh masyarakat Thailand.¹¹

Ganesh dan Vennila (2011)¹¹ melaporkan adanya kandungan komponen *phytochemical* aktif yaitu protein, resin, steroid, tanin, glikosid, *reducing sugar*, saponin, sterol, terpenoid, phenol, cardioglycoside dan catachol dari ekstrak daun *Acanthus ilicifolius*. Tumbuhan ini juga memiliki kemampuan sebagai antimikroba. Ekstrak chloroform dan n-hexane dari daun *Acanthus ilicifolius* memiliki kemampuan imhibusi kuat terhadap *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida Albicans*, *Aspergillus fumigatus* dan *Aspergillus niger*.¹²

Govindasamy C. dan Arulpriya M. (2013)¹³ melaporkan ekstrak chloroform dari daun *Acanthus ilicifolius* zona hambat tertinggi dibandingkan dengan metode ekstrak yang lainnya, MIC ekstrak chloroform *Acanthus ilicifolius* adalah 3mg/mL (3%) dan 4mg/mL(4%) untuk MBC terhadap *C.Albicans*. Kumar dkk (2012)¹⁴ melaporkan potensi anti-ulcer pada lambung tikus yang diterapi dengan ekstrak chloroform *Acanthus ilicifolius* dengan dosis 400mg/kgBB. Almagami dkk (2014)¹⁵ dalam penelitiannya melaporkan adanya efek anti kanker pada tikus yang diterapi dengan dosis 500mg/kgBB.

Berdasarkan uraian diatas dan adanya potensi anti candida dari tanaman *mangrove*, peneliti tertarik untuk menguji potensi anti candida albicans dari ekstrak tumbuhan

mangrove *Acanthus ilicifolius* sehingga dapat dijadikan bahan dasar pengobatan alternatif untuk candidiasis.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini tergolong penelitian *true experimental* dengan rancangan penelitian menggunakan *post test only control group design*. Unit penelitian adalah *ratus novergicus strain wistar* jantan, Usia 8-16 minggu, Berat badan 200-300 gram dan sehat sebanyak 16 ekor. Menggunakan hewan coba tikus wistar yang diimunosupresi dengan dexamethasone dan ditetrasiklin peroral dan diinduksi dengan *C.albicans* 6×10^8 pada lidah tikus selama 14 hari. Dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok sehat (K1), Kelompok candidiasis (K2), Kelompok perlakuan 1 (P1) : candidiasis diterapi dengan nistatin. Perlakuan 2 (P2) : candidiasis diterapi dengan ekstrak kloroform *achanthus ilicifolius* 8%, Kelompok perlakuan 3 (P3) : candidiasis diterapi dengan ekstrak kloroform *achanthus ilicifolius* 16%.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kotak kandang tikus, *disposable sputum*, timbangan analitik, kotak kaca, *portable Device Glucose test* (Glucosure), *scalpel*, cotton bud, gunting, tabung reaksi, tabung sentrifuse, pipet, erlenmeyer, pinset, *beaker glass*, mikroskop, kamera. Sedangkan Bahan dari penelitian ini adalah imunohistokimia kit, *Candida Albicans ATCC10231*, Saburoud Agar, Saburoud broth, PBS dan Antibodi Anti-candida (*Ig-G mouse*).

Tikus sehat adalah tikus yang tidak diimunosupresi dan diberi tetrasiklin peroral. Perlakuan pada kelompok ini hanya diberi CMC-Na 0,2% dan PBS sebanyak 1mL perhari

selama 28 hari. Sedangkan untuk kelompok candidiasis dan perlakuan, sebelumnya tikus diimunosupresi dan diberi tetrasiklin peroral dan kemudian diinduksi dengan *Candida Albicans ATCC10231*. Kelompok candidiasis dan perlakuan diimunosupresi dengan memberikan dexamethasone peroral selama 1 minggu dengan dosis 0,5mg/hari/tikus ditambahkan dengan tetrasiklin 1mg/hari/tikus. Setelah 1 minggu, tikus diinduksi dengan *Candida Albicans* sebanyak tiga kali dan selama induksi hingga perlakuan, tikus diberi tetrasiklin peroral dengan dosis 0,1mg/hari/tikus. Induksi candidiasis dilakukan dengan memberikan *Candida Albicans* sebanyak 0,1 cc yang mengandung 6×10^8 *C. albicans* dengan cara diulaskan pada seluruh permukaan lidah dengan menggunakan cotton bud steril dan dilakukan dua hari sekali selama 14 hari.

Terapi diberikan secara topikal selama 14 hari setelah tikus mengalami oral candidiasis dan kemudian dikorbankan. Sampel berupa lidah tikus, diproses dan disimpan dalam bentuk parafin blok dan siap untuk dilakukan pembedahan. Hasil potongan diletakkan dalam objek glass dan dilakukan pengecatan dengan imunohistokimia dan diberi antibodi anti-candida. Pengukuran jumlah antibodi dilakukan dengan mengamati di mikroskop dengan pembesaran 400x. Ekspresi antibodi anti-candida menunjukkan warna coklat tua (Gambar1). Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *Kruskal Wallis* dan *Mann Whitney*.

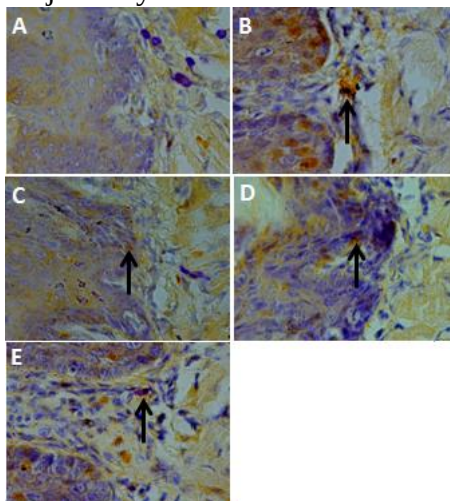
HASIL

Data hasil pengamatan berupa jumlah antibodi anticandida yang terdapat pada potongan lidah tikus yang telah diinduksi *C.Albicans* adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Jumlah antibodi anticandida pada kelompok tikus sehat, candidiasis, perlakuan dengan nistatin dan ekstrak daun *A.ilicifolius* 8% dan 16%.

KELOMPOK	REPLIKASI	MEAN $\pm$ SD
NORMAL	4	1,75 $\pm$ 0,5
CANDISIASIS	4	17 $\pm$ 3,7
NISTATIN	4	4,5 $\pm$ 1,3
A.Ilicifolius 8%	4	5,5 $\pm$ 1
A.Ilicifolius 16%	4	6,74 $\pm$ 2,1

Hasil penelitian ini menunjukkan jumlah antibodi anticandida pada kelompok candidiasis tanpa diberi terapi (K2) memiliki jumlah paling tinggi dibandingkan kelompok lainnya. Sedangkan pada kelompok sehat (K1), jumlah antibodi anticandida paling sedikit dibandingkan dengan yang lainnya. Pada kelompok perlakuan baik dengan nistatin maupun *acanthus ilicifolius* 8% dan 16%, dari rerata diketahui jumlah ekspresi antibodi anticandida hampir sama jumlahnya.



Gambar 1. Ekspresi antibodi anticandida Ekspresi antibodi (Panah hitam)

A. Kelompok sehat (K1): tidak tampak ekspresi antibodi anticandida, B. Kelompok Candidiasis (K2), C. Kelompok nistatin (P1), D. Kelompok *A.ilicifolius* 8% (P2) dan E. Kelompok *A.ilicifolius* 16% (P3).

Data ekspresi antibodi anticandida dianalisis menggunakan uji *Shapiro Wilk* ($p < 0.05$) dan dilakukan uji homogenitas *Levene test* ($p > 0.05$). Untuk mengetahui perbedaan antar kelompok digunakan analisis non parametrik *Kruskal Wallis* ($p < 0,05$). kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui perbedaan setiap kelompok, namun dari uji tersebut didapatkan ada perbedaan yang bermakna pada semua kelompok.

Dari hasil analisis diketahui terdapat perbedaan signifikan antara grup sehat (K1) dibandingkan dengan grup candidiasis (K2), grup perlakuan dengan nistatin (P1), grup perlakuan dengan *A.ilicifolius* 8% (P2) dan grup *A.ilicifolius* 16% ($p < 0,05$). Terdapat perbedaan signifikan antara K2 dengan grup perlakuan P1, P2 dan P3 ($p < 0,05$). Sedangkan untuk kelompok perlakuan, tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara P1, P2, dan P3 ($p > 0,05$).

PEMBAHASAN

Kondisi immunosupresi dan konsumsi antibiotik jangka panjang merupakan faktor predisposisi dari terjadinya oral candidiasis. Pada penelitian ini tikus diimunosupresi dengan memberikan dexamethasone dan dikombinasi dengan tetrasiklin. Pemberian tetrasiklin ini diharapkan menghilangkan bakteri pada rongga mulut sehingga candida albicans dapat tumbuh tanpa kontaminasi bakteri lain.

Lidah dari tikus wistar merupakan sampel dari penelitian ini. Tikus wistar sebagai hewan coba dalam penelitian ini karena mudah dalam pengelolaan dan memiliki rongga mulut yang cukup untuk inokulasi, perlakuan dan pengambilan sampel. Pengambilan sampel berupa lidah dengan pertimbangan bahwa oral candidiasis merupakan predileksi dari infeksi candidiasis, baik tipe eritematous, atropik, median rhumboid glositis dan pseudomembran.¹⁶

Dari hasil penelitian diketahui terdapat perbedaan signifikan ekspresi antibodi anticandida dari kelompok sehat dibandingkan dengan kelompok candidiasis ($p < 0,05$). Dari rerata jumlah ekspresi anticandida pada kelompok candidiasis paling tinggi dibandingkan dengan kelompok sehat maupun perlakuan, sedangkan kelompok sehat merupakan yang paling rendah. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah *C.albicans* yang menempel pada lidah tikus paling banyak pada kelompok candidiasis dan paling sedikit pada kelompok sehat. Sehingga dapat diasumsikan pada kelompok candidiasis sedang mengalami oral candidiasis.

Data dari kelompok candidiasis dibandingkan dengan kelompok perlakuan didapatkan perbedaan signifikan dari ekspresi antibodi anticandida ($p < 0,05$). Dari rerata jumlah ekspresi anticandida pada kelompok candidiasis paling tinggi dibandingkan perlakuan, baik yang diterapi nistatin maupun diterapi dengan *acanthus ilicifollius* 8% dan 16%. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah *C.albicans* pada tikus wistar menurun setelah diberi terapi nistatin dan *acanthus ilicifollius* 8% dan 16%. Nistatin dan *acanthus ilicifollius* 8%

dan 16% dapat menurunkan jumlah *c.albicans* pada oral candidiasis.

Dari rerata dapat dilihat bahwa jumlah ekspresi antibodi anticandida paling sedikit pada kelompok nistatin dibandingkan dengan yang lainnya. Setelah dilakukan analisis data dan dibandingkan antar kelompok perlakuan, tidak didapatkan perbedaan yang signifikan antara kelompok nistatin dibandingkan dengan kelompok *acanthus ilicifollius* 8% dan 16% ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak *acanthus ilicifollius* 8% dan 16% memiliki kemampuan yang sama dengan nistatin dalam menurunkan jumlah candida albicans pada oral candidiasis.

Beberapa penelitian telah meneliti telah melaporkan adanya potensi anticandida dari ekstrak *Acanthus ilicifollius*. Penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak chloroform *Acanthus ilicifollius* dapat menghambat pertumbuhan candida albicans. Kandungan metabolit ekstrak chloroform *Acanthus ilicifollius* diduga berperan sebagai anticandida. Kandungan ini antara lain alkaloid, flavonoid, steroid, triterpenoid dan tanin.¹¹

Senyawa alkaloid, triterpenoid, dan steroid akan menghambat biosintesa asam nukleat, fosforilasi oksidatif dan transport elektron. Alkaloid juga mempengaruhi perubahan permeabilitas membran lipid pada fungi. Tanin mempunyai aktivitas antioksidan, antiseptik dan antibakteri.¹⁷ Gunawan (2009)¹⁸ menyatakan bahwa pada alkaloid terdapat gugus basa yang mengandung nitrogen akan bereaksi dengan senyawa asam amino sehingga menimbulkan perubahan keseimbangan genetik pada rantai DNA materi yang berdampak kematian bakteri.

Senyawa flavonoid dan tanin merupakan komponen golongan fenol, dimana golongan ini sering digunakan sebagai desinfektan. Persenyawaan ini bekerja dengan cara mendenaturasi protein sel di membran sel, enzim dan materi genetik. Denaturasi protein di membran dapat menyebabkan terjadinya perubahan permeabilitas sel dimana membran sel tidak dapat mempertahankan komponen di dalam sel dan mengganggu transport membran sehingga mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan atau kematian sel.¹⁹

Flavonoid dilaporkan mampu menghambat enzim siklooksigenase yang mempengaruhi mediator nyeri dan memiliki aktivitas penangkapan radikal bebas.²⁰ flavanoid dapat membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler dan dinding sel mikroba. Selain itu flavanoid yang bersifat lipofilik juga dapat merusak membran mikroba.²¹

SIMPULAN

Ekstrak *Acanthus ilicifolius* memiliki potensi menghambat pertumbuhan *Candida Albicans* pada penderita *oral candidiasis*. Dalam penelitian ini konsentrasi 8% adalah konsentrasi yang efektif dalam menghambat pertumbuhan candida albicans. Perlu dilakukan penelitian uji toksisitas bahan ekstrak chloroform *Acanthus ilicifolius* sehingga dapat digunakan sebagai pengobatan yang diberikan pada manusia.

DAFTAR PUSTAKA

1. Maharani S. 2012. Skripsi: Pengaruh Pemberian Larutan Ekstrak Siwak (*Salvadora persica*) Pada Berbagai Konsentrasi Terhadap Pertumbuhan *Candida albicans*. Semarang. FK Universitas Diponegoro.
2. Sudarmawan. 2009. Toksisitas dan Efektifitas Minyak Kayu Manis Dalam Menghambat Pertumbuhan Koloni *Candida albicans* pada resin akrilik Heat cured. Tesis. Universitas Airlangga Surabaya.
3. Silverman. S Jr at al, 2001, Essential of Oral Med, BC. Decker Inc, Hamilton, London, h. 170 – 177
4. William D.W., Kuriyama T., Silvia S., Malic S., Lewis M.A.O. 2011. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontology* 2000 Vol. 55. Pp. 250–265
5. Kusumaningtyas E. 2004. Mekanisme Infeksi *Candida Albicans* Pada permukaan Sel. Prosiding Lokakarya Nasional Zoonosis Vol.26 No.6. Pp.304-313
6. Netea MG, Gow NAR, Munro CA, Bates S, Collins C, Ferwerda, G, Hobson RP, Bertram G, Hughes HB, Jansen T, Jacobs J, dkk. 2006. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *The Journal of Clinical Investigation* 116 (6): 1642-1650
7. Qiu-li F., Chun-fang M., Li-ning S., Jing-fen L., Wang Y., Huang M., Qian-qian K. 2013. Diagnostic value of immunoglobulin G antibodies against *Candida* enolase and fructose-bisphosphate aldolase for candidemia. *BMC Infectious Diseases* 13:253. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/13/253>
8. Arian SLO, Zeichner ML, Chiu V, Paetznick D, Gordon T, Rex. 2002. *In vitro* Activity of Nystatin Compared with Those of Liposomal Nystatin, Amphotericin B, and Fluconazole Against Clinical *Candida* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol.4(40):1406-1412.
9. Baskara GY. Uji Daya Antifungi Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium polianthum* [Wight] Walp.) Terhadap *Candida Albicans* ATCC 10231 Secara In Vitro [Skripsi]. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta; 2012. Available from http://eprints.ums.ac.id/22008/1/11_naskah_publicasi.pdf
10. Plimpiskar M, Shinde P, Savakare V, Jadhav V, Jadhav BI. Comparative Performance of Activity of Antimicrobial Principles of Mangrove *Rhizophora* Species Along Mumbai Coast. *Indo-Global Research Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012; 2(4).

11. Ganesh S, Vennila JJ. Phytochemical Analysis of *Acanthus ilicifolius* and *Avicennia officinalis* by GC-MS. *Research Journal of Phytochemistry*. 2011;5(1):65-60.
12. Singh D, Aeri V. Phytochemical and pharmacological potential of *Acanthus ilicifolius*. *Journal Pharm Bioallied Sci*. 2013;5(1):20-17.
13. Govindasamy C., Arulpriya M. Antimicrobial activity of *Acanthus ilicifolius*: skin infection pathogen. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine*. 2013;3(3):183-180.
14. Kumar MSKT, Puia Z, Samanta SK, Barik R, Dutta A, Gorain B, Roy DK, Adhikari D, Karmakar S, Sen T. 2012. The Gastroprotective Role of *Acanthus ilicifolius* - A Study to Unravel the Underlying Mechanism of Anti-Ulcer Activity. *Sci Pharm*. 2012;80(3):701-17.
15. Almagrabi AA, Alshawsh MA, Saif-Ali R, Shwter A, Salem SD, Abdulla MA (2014) Evaluation of Chemopreventive Effects of *Acanthus ilicifolius* against Azoxymethane-Induced Aberrant Crypt Foci in the Rat Colon. *PLoS ONE*. 2014; 9(5):e96004.
16. Samaranayake LP. *Essential Microbiology for Dentistry*, 3rd Ed. Edinburgh : Churcil Livingstone; 2006.
17. Khikmah N, Widaryanti B. Ekstrak daun ketapang (*Terminalia catappa* L) sebagai anti fungi *Candida albicans*. Prosiding simposium nasional Peluang dan tantangan obat tradisional dalam pelayanan kesehatan formal. Jogjakarta: Farmasi UGM; 2014. p. 249-251.
18. Gunawan SG, Setiabudy R, Nafrialdi E, 2009. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 5. Jakarta. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia p. 585
19. Sandika P, Nuryanti A, Wahyudi IA. Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guajava*) sebagai *ultrasonic scaler coolant water* Terhadap Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri *Phorphyromonas gingivalis* (Kajian *In Vitro*). Prosiding Simposium nasional "Peluang dan Tantangan Obat Tradisional dalam Pelayanan Kesehatan Formal". Yogyakarta: Farmakologi Fakultas Kedokteran UGM; 2014. p. 83-87.
20. Susanti D, Nugraha DP, Bebasari E. The Analgesic Effect of Ethanol Extract of the Cogon Grass Rhizome (*Imperata cylindrica* (L.) Beauv.) of Mice (*Mus.musculus*). Prosiding simposium nasional Peluang dan tantangan obat tradisional dalam pelayanan kesehatan formal. Jogjakarta: Farmasi UGM; 2014. p. 178-185.
21. Fitrial Y, Astawan M, Soekarto SS, Wiryawan KG, Wresdiyati T, Kharina R, 2008. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Teratai (*Nymphaea pubescens* Willd) Terhadap Bakteri Patogen Penyebab Diare. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 2008;19(2).