

RESEARCH ARTICLE

Pengaruh Pemberian Ekstrak *Methanol* Daun *Acanthus ilicifolius* Topikal Terhadap Jumlah Makrofag Pada Penyembuhan Model Oral Candidiasis Dengan Kondisi Imunosupresi

(The Effect Of Granting Acanthus ilicifolius Leaf Topical Methanol Extracts To The Amount Of Macrophags In Healing Of Oral Candidiasis Models With Immunosupression Condition)

Ghora Setyawan*, Dwi Andriani**, Diana Soesilo ***

* Sarjana Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah Surabaya

** Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah

*** Konservasi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah

ABSTRACT

Background: Corticosteroid has a strong anti-inflammatory effect, unfortunately long-term use of corticosteroid drugs can suppress immune system. This condition makes *Candida albicans* as an opportunistic pathogen caused Oral Candidiasis. Macrophages have an important role in the first defense against infection. Methanol extract of *A. ilicifolius* leaf has anti-fungal, anti-inflammatory compounds to fight the growth of *Candida albicans*. **Purpose:** To determine the effect of methanol extract of *A. ilicifolius* leaf therapy to the amount of macrophages in the healing process of oral candidiasis models with immunosuppressed conditions. **Materials and Method:** This study was true experimental with post test only control group design. Thirty-six strain wistar, 3 months old, and 250 grams of weight which were given dexamethason 0.5 mg and tetracycline 0.5mg for 7days, after *Candida albicans* (ATCC10231) was induced for 2 weeks (3 times/week). Rats were divided into 6 groups: untreated(K-), nystatin(K+), *A. ilicifolius* 8%(P1), *A. ilicifolius* 12%(P2), *A. ilicifolius* 16%(P3), *A. ilicifolius* 20%(P4) all groups were treated for 2 weeks. After being treated, the rats tongue biopsied to examine the macrophages with Haematoxylin-eosin staining and observed with microscope (400x magnification). Data analyzed statistically by One-way ANOVA. **Results:** the amount of macrophages at K+(47.60±4.16), P4(40.20±3.56), P3(36.20±1.92), P2(17.00±2.45) were greater than K-(15.60±4.56), P1(14.60±2.70). there are no significant difference between group K- with P1 and P2, P3 with P4. There are significant difference between group K- with K+, K- with P3 and P4. K+ with P1, P2, P3 and P4. Group P1 with P3 and P4. Group P2 with P3 and P4. **Conclusion:** *A. ilicifolius* extract can increase the amount of macrophages in oral candidiasis immunosuppression models.

Keywords : Macrophages, Oral-Candidiasis, *A. ilicifolius*, immunosuppressed, nystatin

Correspondence: Dwi Andriani, Bagian Biologi Oral, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah, Jl Arif Rahman Hakim 150, Surabaya, Indonesia. Ph 031-71536336, e-mail address: riadwiandriani@yahoo.com

ABSTRAK

Latar Belakang: Kortikosteroid memiliki efek anti-inflamasi yang kuat, tetapi pada penggunaan jangka panjang dapat menekan sistem kekebalan tubuh. Kondisi ini membuat *Candida albicans* sebagai patogen oportunistik yang menyebabkan Oral Kandidiasis. Makrofag memiliki peran penting dalam pertahanan pertama melawan infeksi. Ekstrak metanol daun *A.ilicifolius* memiliki senyawa anti-jamur, anti-inflamasi untuk melawan pertumbuhan *Candida albicans*. **Tujuan:** untuk mengetahui pengaruh ekstrak Metanol daun *A.ilicifolius* terhadap jumlah makrofag dalam penyembuhan model Oral kandidiasis dengan kondisi immunosupresi. **Bahan dan Metode:** penelitian ini menggunakan metode true experimental dengan post test only control group design. 36 strain wistar, berusia 3 bulan, dan berat badan 250 gram yang diberi dexamethason 0,5mg dan tetracycline 0,5mg selama 7hari, setelah itu *Candida albicans*(ATCC10231) diinduksi selama 2 minggu (3 kali/minggu). Tikus dibagi menjadi 6 kelompok: tanpa perlakuan(K-), nistatin(K+), *A.ilicifolius* 8%(P1), *A.ilicifolius* 12%(P2), *A.ilicifolius* 16%(P3), *A.ilicifolius* 20%(P4) semua kelompok dirawat selama 2 minggu. Setelah dirawat, lidah tikus dibiopsi untuk memeriksa makrofag dengan pewarnaan Haematoxylin-eosin dan diamati dengan mikroskop (perbesaran 400x). Data dianalisis secara statistik dengan One-way ANOVA. **Hasil:** jumlah makrofag pada K+(47.60±4.16), P4(40.20±3.56), P3(36.20±1.92), P2(17.00±2.45) lebih besar dari K-(15.60±4.56), P1(14.60±2.70). Tidak ada hasil yang signifikan dalam kelompok K- dengan P1 dan P2, P3 dengan P4. Ada hasil yang signifikan dalam kelompok K- dengan K +, K- dengan P3 dan P4. K + dengan P1, P2, P3 dan P4. Kelompok P1 dengan P3 dan P4. Kelompok P2 dengan P3 dan P4. **Simpulan:** Ekstrak *A.ilicifolius* dapat meningkatkan jumlah makrofag dalam model oral kandidiasis dengan kondisi immunosupresi.

Kata kunci: Makrofag, Oral-Kandidiasis, *A.ilicifolius*, immunosupresi, nistatin

Correspondence: Dwi Andriani , Bagian Biologi Oral, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah, Arif Rahman Hakim 150, SurabayaPh 031-71536336, e-mail address: riadwiandriani@yahoo.com

PENDAHULUAN

Oral Kandidiasis memiliki faktor predisposisi seperti kondisi terimunosupresi dengan obat kortikosteroid, menurunnya sistem imun, AIDS, usia, jenis kelamin, merokok, penggunaan obat jangka waktu lama baik antibiotik maupun antiviral.¹ Berdasarkan survey yang dilakukan sejak 2010 hingga 2014 di Rumah Sakit Hasan Sadikin di Bandung, sebanyak 49 orang terkena oral kandidiasis.² Berdasarkan survei World Health Organization (WHO) pada tahun 2001 kasus oral kandidiasis antara 5,8% hingga 98,3%. Menurut data dari Departemen kesehatan RI

menunjukkan penderita AIDS di Indonesia yang mengalami oral kandidiasis mencapai 80,0% dari 1408 pasien.³ Berdasarkan hasil penelitian pada anak dibawah 6 tahun yang menderita asma, di dapatkan 63,3% menunjukkan efek samping dari konsumsi obat kortikosteroid inhaler, 10,7 % diantaranya menderita oral kandidiasis.⁴ Penyakit oral lichen planus yang menggunakan obat kortikosteroid sebagai pengobatan selama 2 minggu, memiliki 13,6% terinfeksi oral kandidiasis.⁵

Oral Kandidiasis merupakan infeksi oportunistik yang terdapat pada rongga mulut yang disebabkan oleh pertumbuhan berlebih dari *Candida*.

Flora normal pada rongga mulut yang dapat menyebabkan *Oral Candidiasis* yaitu *Candida albicans*.⁶ Faktor predisposisi dapat mempengaruhi perkembangan *Oral Candidiasis* dibagi atas faktor sistemik dan faktor lokal. Faktor lokal berupa perubahan flora mikroba, iritasi lokal kronis.⁷ Sedangkan faktor sistemik berupa diabetes melitus (DM), malnutrisi, kerusakan sel imun T, Human Immunodeficiency Virus / *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (HIV/AIDS), kanker, konsumsi obat imunosupresi, dan kanker.⁸

Imunosupresi merupakan tindakan untuk menekan respon imun, bertujuan untuk regulasi reaktivitas imunologik dan menghambat antibodi pada penyakit autoimun. Penggunaan obat kortikosteroid dalam jangka yang lama merupakan salah satu yang dapat menekan sistem imun. Obat kortikosteroid adalah derivat hormon steroid yang berfungsi untuk mengontrol respon inflamasi.⁹

Makrofag adalah salah satu sel inflamasi. Makrofag diproduksi oleh sumsum tulang belakang dari sel myeloid yang mengalami proliferasi dan beredar dalam darah pada fase promonosit. Monosit yang bermigrasi dari sirkulasi darah karena ada rangsangan berupa toksik bakteri atau virus, produk degeratif dari jaringan yang meradang, produk komplemen, ataupun dari beberapa produk pembentukan plasma, akan memasuki jaringan dalam bentuk makrofag.¹⁰

Makrofag merupakan bagian dari sistem imun non spesifik yang berperan memusnakan dan merusak secara tidak selektif, dimana memiliki fungsi sebagai perlindungan pertama terhadap jaringan yang terinfeksi. Proses mekanisme aktivasi makrofag dengan cara menerima sinyal dalam

mengikat patogen ke reseptor ancaman. Pengaktifan makrofag dihasilkan oleh sitokin proinflamasi dan interleukin. Sitokin yang berperan yaitu monosit, neutrofil, *Macrophage inflammatory protein (MIP)* dan sel T.^{11,12}

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki banyak sekali sumber daya alam terutama sumber daya dari laut, salah satunya adalah *Acanthus ilicifolius*. tumbuhan yang memiliki senyawa bioaktif yaitu antibakterial, antifungal, antiinflamasi, antioksidan, antikanker, antileukemia dan analgesik. Tumbuhan ini memiliki kandungan senyawa berupa senyawa 2-Benzoxazolinone, glukosida, alkaloid, flavonoid, asam lemak, steroid, lignan, dan komponen fenol dan terpenoid yang berfungsi sebagai antibiofilm. Flavonoid memiliki kemampuan sebagai antioksidan sehingga dapat merusak membran sel dari antimikroba.^{13,14,15,16}

Ekstrak methanol daun *Acanthus ilicifolius* menghasilkan aktivasi antimikroba yang sangat baik dibandingkan ethanol dan *aqueous*.²⁵ dimana ekstrak methanol daun *Acanthus ilicifolius* memiliki daya hambat minimum sebesar $0,416 \pm 0,104$.²⁶ serta memiliki efek anti-inflamasi²⁷, dan Peningkatan Ekspresi IL-22 Pada Model *Oral Candidiasis* pada Kondisi Imunosupresi dengan Terapi Ekstrak *Acanthus ilicifolius* didapatkan bahwa Ekstrak kloroform dari daun *Acanthus ilicifolius* dapat meningkatkan ekspresi IL-22 pada model *Oral candidiasis* dengan kondisi imunosupresi. *Acanthus ilicifolius* 8% efektif dalam meningkatkan ekspresi IL-22 dan memiliki efek yang sama dalam perbandingan baik nystatin dan *A. ilicifolius* 16%.²⁴

Berdasarkan penjelasan diatas peneliti ingin mengetahui mekanisme ekstrak methanol daun *Acanthus ilicifolius* L. pada konsentrasi 8%, 12%, 16% dan 20% Terhadap peningkatan jumlah makrofag dalam proses peratahanan pada model yang terimunosupresi.

BAHAN DAN METODE

Penelitian yang dilakukan merupakan jenis penelitian *true eksperimental laboratories* dengan rancangan penelitian secara *posttest only control group design*. Unit eksperimen yang digunakan pada penelitian ini berupa *Rattus novergicus strain Wistar* yang memiliki kriteria berat 200-250gr, umur 3 bulan, jenis kelamin laki-laki dan tidak memiliki cacat fisik dengan jumlah 36 ekor. Hewan coba dibagi menjadi 6 kelompok, setiap kelompok terdiri dari 6 ekor. K- (non-treatment), K+ (Nystatin), P1 (*Acanthus ilicifolius* 8%), P2 (*Acanthus ilicifolius* 12%), P3 (*Acanthus ilicifolius* 16%), P4 (*Acanthus ilicifolius* 20%).

Tikus yang telah diaklimatisasi selama 1 minggu dan dibagi

Kelompok	M ± SD	
K-	15.60 ± 4.56	berd
K+	47.60 ± 4.16	asar
P1	14.60 ± 2.70	kan
P2	17.00 ± 2.45	kelo
P3	36.20 ± 1.92	mpo
P4	40.20 ± 3.56	k,

dexamethason 0,5mg/ml/ 250gr BB tikus dan tertrasiklin 0,5mg/ml/250gr

BB tikus selama 1 minggu dengan sondase.¹⁷ Pada minggu ke-2 dan ke-3 dosis obat dexamethason dan tetrasiklin di turunkan menjadi 0,05mg/ml/ 250gr BB tikus serta dilakukan inokulasi *Candida albicans*(ATCC 10231) 1 Mcfarland 2 hari sekali selama 2 minggu.¹⁷

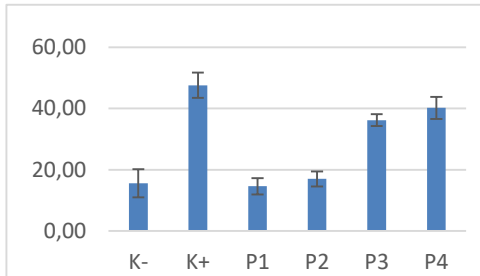
Pada minggu ke-4 dilakukan terapi dengan menghentikan konsumsi obat dexamthason, serta obat tetrasiklin tetap diberikan sebanyak 0,05mg/ml/250gr BB tikus dan ekstrak *acanthus ilicifolius* 8%,12%,16% dan 20%. Hewan diterapi selama 2 minggu. Terapi ini dilakukan berdasarkan terapi pada umumnya yang diberikan pada penderita *oral candidiasis*.

Setelah diterapi selesai, dilakukan euthanasia semua hewan coba untuk diambil organ lidah dan dilakukan pembuatan Histopatologi anatomi. Setelah itu dilakukan pewarnaan menggunakan *Haematoxylin-eosin*. Setelah itu dibaca menggunakan microscope dengan perbesaran 400x.

HASIL

Data hasil penelitian dianalisis secara deskriptif dengan tujuan memperoleh gambaran distribusi dan peringkasan data guna memperjelas penyajian hasil. Kemudian dilakukan uji hipotesis menggunakan statistik analitik dengan nilai signifikansi 95% ($p \leq 0,05$) dengan menggunakan program SPSS versi 23.

Tabel 1. Hasil rata-rata dan simpang baku jumlah makrofag setelah dilakukan terapi

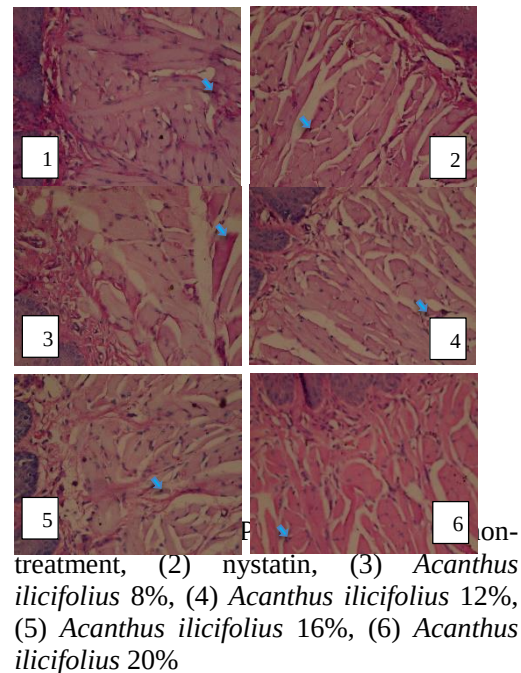


Gambar 1. Grafik Batang Rerata jumlah sel makrofag

Pada tabel 1 dan gambar 1 menunjukkan rata-rata jumlah makrofag yang terendah terdapat pada kelompok P1 (14.60 ± 2.70) yaitu kelompok tikus yang diberi ekstrak methanol *Acanthus ilicifolius* 8%. Sedangkan rata-rata tertinggi adalah kelompok K+ (47.60 ± 4.16) yaitu pada kelompok tikus yang diberi terapi obat nystatin.

Data di uji menggunakan *Shapiro Wilk* dan *Levene Statistic* menunjukkan hasil $p > 0,05$ yang berarti data terdistribusi normal dan homogen. Sehingga dilanjutkan uji *One-way ANOVA*.

Hasil uji *Post-Hoc LSD* diketahui bahwa terdapat perbedaan jumlah makrofag yang bermakna pada kelompok K- dengan K+, kelompok K- dengan P3 dan P4, kelompok K+ dengan P1 dan P2, kelompok K+ dengan P3 dan P4, kelompok P1 dengan P3 dan P4 serta kelompok P2 dengan P3 dan P4, hal ini dibuktikan dengan nilai signifikan setiap kelompok yaitu $p < 0,05$. Sedangkan kelompok K- dengan P1 dan P2, kelompok P1 dengan P2, kelompok P3 dengan P4 tidak terdapat perbedaan bermakna karena nilai signifikannya lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$).



PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan mengetahui pengaruh pemberian ekstrak methanol daun *Acanthus ilicifolius* secara topikal terhadap jumlah sel makrofag dalam penyembuhan *oral candidiasis* dengan model imunosupresi selama 14 hari pasca terapi. Hasil penelitian ini didapatkan bahwa kelompok yang tidak diterapi obat, menunjukan jumlah makrofag sangat sedikit dibandingkan dengan kelompok lainnya. Hal ini disebabkan karena kondisi imunosupresi pada tikus mengakibatkan jumlah makrofag yang menurun karena tertekan dari aktifitas obat kortikosteroid yang menekan sistem imun tubuh, yang mana berfungsi agar tidak terjadi respon imun yang berlebihan.¹⁸

Hasil pada kelompok yang diberikan terapi obat nystatin, menunjukkan adanya peningkatan jumlah makrofag yang signifikan dibandingkan tanpa pemberian obat.

Hal ini disebabkan karena nystatin memiliki daya antifungal dibandingkan tanpa pemberian obat. Obat ini berkerja dengan mengikat sterol dalam membran sel yang menyebabkan perubahan permeabilitas membran sel sehingga sel mengalami kematian dan di fagositosis oleh makrofag yang mengakibatkan jumlah jamur menjadi menurun.¹⁹ Obat ini merupakan obat yang umum pada penderita *oral candidiasis*.²⁰

Hasil pada kelompok yang diberikan terapi ekstrak methanol daun *Acanthus Illicifolius* 8% dan ekstrak methanol daun *Acanthus ilicifolius* 12% tidak terdapat peningkatan jumlah makrofag dibandingkan dengan kelompok tanpa pemberian obat ditunjukan dengan hasil yang tidak signifikan. Hal ini menunjukan ekstrak *Acanthus ilicifolius* 8% belum dapat meningkatkan jumlah makrofag, dikarenakan kandungan ekstrak antioksidan, antifungal dan antiinflamasi didalam ekstrak *Acanthus ilicifolius* sangat sedikit dibandingkan kelompok lainnya, oleh karena itu peningkatan jumlah makrofag pada kelompok ini sangatlah sedikit. Berbeda dengan ekstrak klorofom daun *Acanthus ilicifolius* 8% merupakan ekstrak terbaik dan memiliki efek dalam meningkatkan IL-17.²⁴ Hal ini dikarena ekstrak methanol konsentrasi ini memiliki kandungan yang diikat berbeda dengan kandungan pada ekstrak kloroform yang mana memiliki kandungan berupa tanin yang mana pada ekstrak methanol senyawa tanin tidak ada dan kemungkin lainnya karena terdapat perbedaan metode yang mana pada penelitian ini menggunakan metode yang berbeda dengan metode sebelumnya. Sehingga hasil yang di dapatkan menunjukan perbedaan

Hasil pada kelompok yang diberikan terapi ekstrak methanol daun *Acanthus Illicifolius* 16% dan 20% menunjukan ada peningkatan makrofag dibandingkan dengan kelompok tanpa pemberian obat ditunjukan dengan hasil yang signifikan. Hal ini dikarenakan kandungan metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak methanol daun *Acanthus ilicifolius* memiliki daya antifungal, antioksidan dan antiinflamasi.²¹ Penelitian tentang ekstrak *Klorofrom Acanthus ilicifolius* 8% memiliki efek antioksidan, antifungal dan antiinflamasi yang baik.²⁴

Pada kelompok yang diberikan obat nystatin dengan kelompok yang diberikan ekstrak *Acanthus ilicifolius* 8%,12%,16% dan 20%. Memiliki hasil yang signifikan, hal ini ditunjukan terdapat perbedaan jumlah makrofag yang berarti. pada kelompok yang diberikan obat nystatin jumlah makrofag lebih banyak dibandingkan dengan yang diberikan ekstrak *Acanthus ilicifolius*. Ditunjukan dengan jumlah makrofag pada konsentrasi 8% dan 12% jumlah makrofag jauh lebih sedikit dengan nystatin. Berbeda dengan konsentrasi 16% dan 20% jumlah makrofag mendekati jumlah makrofag saat diberikan nystatin. Pada pemberian ekstrak *Acanthus ilicifolius* terdapat senyawa flavonoid yang berkerja dengan cara menghambat kerja proliferasi sel tumor. Pada pemberian obat nystatin, obat ini berkerja secara ireversibel dengan sterol membran yang terdapat pada spesies *Candida*. Molekul poliene memperlihatkan afinitas yang tinggi pada sterol fungi, termasuk ergosterol, daripada sterol manusia dan sifat nystatin yang tidak larut dalam air dan tidak diabsorpsi

dalam pencernaan ini dapat bekerja selama maksimal.²² Selain itu kemungkinan dikarenakan adanya metode perhitungan dengan 3 lapang pandang dan dirasa kurang menunjukkan jumlah makrofag dengan standart deviasi yang rendah.

Pada kelompok yang diberi ekstrak *Acanthus ilicifolius* 8% dibandingkan dengan ekstrak *Acanthus ilicifolius* 12% didapatkan hasil yang tidak signifikan sehingga menunjukkan konstentrasi 8% dan 12% memiliki efek yang sama. Pada kelompok yang diberi ekstrak *Acanthus ilicifolius* 16% dibandingkan dengan ekstrak *Acanthus ilicifolius* 20% didapatkan hasil yang tidak signifikan sehingga menunjukkan konstentrasi 16% dan 20% memiliki efek yang sama. Pada kelompok yang diberi terapi ekstrak *Acanthus ilicifolius* 8% dan 12% terhadap kelompok yang diberi ekstrak *Acanthus ilicifolius* 16% dan 20% memiliki hasil yang signifikan. hal ini menunjukkan semakin naik konsentration, memberikan efektifitas dari ekstrak semakin besar. Hal ini dikarenakan adanya terdapat senyawa saponin yang berfungsi sebagai merusak membran sel sehingga terjadi kematian sel, senyawa alkaloid dan terpenoid berfungsi sebagai anti-inflamasi dan anti-fungal, senyawa flavonoid berfungsi sebagai antioksidan. Senyawa yang timbul dari ekstrak methanol mengakibatkan peningkatan jumlah makrofag.²³

Setelah dilakukan pengujian hasil didapatkan bahwa kelompok perlakuan yang diberikan obat nystatin, ekstrak *Acanthus ilicifolius* 16% dan 20% memiliki hasil yang signifikan terhadap kelompok yang tidak diberikan obat. Hal ini menunjukkan bahwa obat nystatin dan ekstrak *Acanthus ilicifolius* 16% dan

20% sangat efektif dalam proses penyembuhan *oral candidiasis* yang terimunosupresi. Berbeda dengan kelompok yang diberikan ekstrak *Acanthus ilicifolius* 8% dan 12% tidak memiliki efek terhadap penyembuhan *oral candidiasis* dengan model imunosupresi dilihat dengan tidak ada peningkatan jumlah makrofag yang signifikan.

SIMPULAN

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ada pengaruh jumlah makrofag pada hewan coba yang diberi ekstrak methanol *Acanthus ilicifolius* dan obat nystatin terhadap hewan coba. Sehingga secara umum ada pengaruh ekstrak methanol daun *Acanthus ilicifolius* dalam penyembuhan model *oral candidiasis* dengan kondisi imunosupresi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Saktina PU dan Satriyasa BK. Karakteristik Penderita AIDS dan Infeksi Oportunistik di Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah Denpasar Periode Juli 2013 sampai Juni 2014. *E-jurnal Medika*. 2017;6(3):6-1.
2. Nur'aeny N, Hidayat W, Dewi TS, Herawati E, Wahyuni IS. Pro 1 oral candidiasis di bagian ilmu penyakit mulut RSHS bandung periode 2010-2014. 2017;3(1):28-23.
3. Walangare T, Hidayat T dan Basuki S. The Profile of Candida Species in Oral Candidiasis Patient with HIV/AIDS Infection. *Periodical of Dermatology and Venereology*. 2012;6(1):35-29.
4. Dubus JC, Marguet C, Deschildre A, Mely L, Le Roux P, Brouard J, Huiart L, dan Reseau de Recherche Clinique en Pneumologie Pediatrique. Local side-effects of inhaled corticosteroid in asthmatic children: influence of drug, dose, age, and device. *Allergy*. 2001;56(10):948-944.

5. Marable DR, Bowers LM, Stout TL, Stewart CM, Berg KM, Sankar V, DeRossi SS, Thoppay JR, dan Brennan MT. Oral Candidiasis Following Steroid Therapy for Oral Lichen Planus. *Oral Diseases*. 2015;22(2):147-140.
6. Regezi JA, Sciubba JJ dan Jordan RCK. Verrucal-papillary lesions, *Oral Pathology: Clinical Pathological Corelations*. 2009. h.143-145.
7. Scully C. Oral and Maxillofacial Medicine 3ed. Churchill Livingstone: Elsevier; 2013. h.254-265.
8. Van Wyk C Dan Steenkamp V. Host factors affecting oral candidiasis. *Southern African Journal of Epidemiology and Infection*. 2011;26(1):28-21.
9. Baratawidjaja KG, Rengganis I. *Imunologi Dasar, Edisi 10*. Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2010.
10. Guyton AC, Hall JE. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran, Edisi 11*. Jakarta: EGC; 2008. h.546-553.
11. Roitt I M et al. *Essentials of immunology* 13th ed. London, UK: Wiley Blackwell;2017. h.15-29.
12. Sudiono J. et al. Sistem Kekebalan Tubuh. Jakarta. 2014. h.36. available at https://www.researchgate.net/publication/317721579_Sistem_Kekebalan_Tubuh.
13. Redha A. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya Dalam Sitem Biologis. *Jurnal Berlin*. 2010;9(2):202-196.
14. Irawanto R, Ariuanti EE dan R.H. Jeruju (*Acanthus ilicifolius*): Biji, perkecambahan dan potensinya., 1(September). 2015. h.1011-1018
15. Sofia S dan Teresa M. Isolation of bioactive compounds ompounds by GC GC-MS and biological iological potentials of acanthus ilicifolius, L. 2017;6(6):19-7.
16. Nurrahmawati RS. Konsentrasi Optimum Fotosensitizer Klorofil Daun *Acanthus ilicifolius* L. Dengan Penyinaran *Photodynamic Therapy* (PDT) Terhadap Penurunan Jumlah *Streptococcus mutans*. Skripsi. Surabaya: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah; 2018. h.19.
17. Chami N., Chami F., dan Bennis S. Antifungal Treatment With Carvacrol and Eugenol of Oral Candidiasis in Immunosuppressed Rats. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2004;8:226-217.
18. Aziz AL. Penggunaan Kortikosteroid di klinik. Surabaya: Lab. Divisi Gawat Darurat FK UNAIR; 2006.
19. Brescansin EG., Portilho M., dan Pessine FBT. Physical and Chemical Analysis of Commercial Nystatin. *Acta Scientiarum Health Sciences*. 2013;35(2): 221-215.
20. Richard LW, Timothy FM, Harold LC. Drug Information Book For Dentistry : Including Oral Medicine For Medically-Compromised Patiens & Specific Oral Contions 14th Edition. Baltimore : Lexi-Comp's; 2008. h.1186-1887.
21. Ukhrowi, Uyun. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Umbi Bidara Upas (Merremia Mammosa) Terhadap Fagositosis Makrofag Dan Produksi Nitrit Oksida (NO) Makrofag Studi Pada Mencit Balb/c yang Diinfeksi Salmonella typhimurium*. Masters Thesis. Semarang: Diponegoro University; 2011.
22. Kusumaputra BH dan Zulkarnain I. Penatalaksanaan Kandidiasis mukokutan pada bayi. *Berkala Ilmu Kesehatan Kulit dan kelamin*. 2014;26(2):7-1.
23. Ramadani R. Senyawa Kimia Bahan Alam Terpenoid. IAIN Kerinci. 2016. Available at : <https://ejournal.iainkerinci.ac.id/index.php/tarbawi/article/view/79/78>.
24. Andriani D, Pargawati AF. Enhance of IL-22 expression in Oral Candidiasis Immunosupressed Model with *Acanthus ilicifolius* Extract Therapy. *IOP Science*. 2019; 217 (1).
25. Ganesh S dan Vennila JJ. Screening for antimicrobial activity in *Acanthus ilicifolius*. *Archives of Applied Science Research*. 2010;2(5):315-311.
26. Singh D dan Aeri V. Phytochemical and pharmacological potential of *Acanthus ilicifolius*. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. 2013;5(1):17.
27. Sofia S dan Teresa M. Isolation of bioactive compounds ompounds by GC GC-MS and biological iological potentials of acanthus ilicifolius, L. 2017;6(6):19-7.