

Gambaran Sel Eosinofil, Monosit, dan Basofil Setelah Pemberian *Spirulina* pada Ayam yang Diinfeksi Virus Flu Burung

(OBSERVATION OF EOSINOPHILS, MONOCYTES, AND BASOPHILS AFTER TREATED WITH SPIRULINA IN CHICKENS THAT INFECTED WITH AVIAN INFLUENZA VIRUS)

Widya Paramita Lokapirnasari¹, Andreas Berny Yulianto²

¹Departemen Peternakan, Fakultas Kedokteran Hewan,
Universitas Airlangga, Kampus-C Unair, Jl. Mulyorejo, Surabaya.

Email: wp_lokapirnasari@yahoo.com

²Departemen Anatomi dan Patologi Veteriner,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Wijaya Kusuma, Surabaya

ABSTRAK

Virus flu burung yang tergolong *High Pathogenicity Avian Influenza* (HPAI) mempunyai virulensi yang tinggi dan sering menyebabkan kematian mendadak pada sejumlah besar unggas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui akibat pemberian *Spirulina* terhadap sel eosinofil, monosit, dan basofil pada ayam yang diinfeksi virus flu burung H5N1. Sebagai hewan coba digunakan ayam pedaging strain *Hubbard* berjumlah 21 ekor. Ayam dibagi menjadi tiga perlakuan penggunaan dosis *Spirulina* yang berbeda, yaitu dengan kadar 0% (sebagai kontrol), 10%, 20% dengan masing-masing terdiri dari tujuh ulangan. Perlakuan *Spirulina* diberikan melalui air minum pada hewan coba sejak usia 19-44 hari (selama 25 hari). Untuk perlakuan infeksi buatan, ayam diinfeksi dengan virus AI (H5N1) (A/Ck/Indonesia/BL/03) 10^4 EID₅₀ (A/Ck/Indonesia/BL/03) dengan memasukkan pada saluran pernafasan (tetes hidung) 0,1 mL pada hari ke 19 perlakuan *Spirulina*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) pada jumlah sel eosinofil, monosit, sedangkan pada jumlah sel basofil tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) dengan pemberian *Spirulina* pada dosis 0%, 10%, dan 20%. Simpulan dari hasil penelitian ini bahwa penggunaan *Spirulina* dapat mempengaruhi jumlah sel eosinofil dan monosit yang turut berperan dalam pembentukan sistem kekebalan alami (*innate*) pada ayam yang terinfeksi virus flu burung H5N1.

Kata-kata kunci: ayam, *Spirulina*, virus AI H5N1, monosit, eosinofil, basofil

ABSTRACT

High Pathogenicity Avian Influenza (HPAI) viruses have high virulence and can frequently cause sudden death on birds. The aims of this research was to know the role of *Spirulina* to a number of monocytes and lymphocytes in the blood of chickens which infected with the H5N1 virus. This research consisted of three levels of treatment in which each level given *Spirulina* 0%, 10%, 20% in the fresh water algae as drinking water. Each treatment consisted of seven replicates, and the treatment was done since the chickens at age 19 until 44 days (for 25 days). Artificial infection of the chickens with the virus was challenged by using AI (H5N1) 10^4 EID₅₀ (A/Ck/Indonesia/BL/03) with route to the respiratory tract (nose drops) 0,1 mL starting on day 19. The results showed that there were a significant difference ($p < 0.05$) on treatment that given *Spirulina* at doses of 0%, 10% and 20% for the number of monocytes, eosinophils, whereas no significant difference ($p > 0.05$) was observed in basophils.

Keywords : chicken, *Spirulina*, H5N1 virus, monocytes, eosinophils, basophils

PENDAHULUAN

Flu burung atau *avian influenza* (AI) merupakan penyakit virusi yang menyerang sistem pernafasan, pencernaan dan atau syaraf. Flu burung menginfeksi berbagai macam spesies unggas, baik unggas domestik maupun liar. Virus AI H5N1 menimbulkan penyakit sistemik dengan tropisme sel endotel pada ayam (Aiki-Raji *et al.*, 2008). Aktivasi sel endotel pada manusia, kucing, dan ayam yang terinfeksi virus H5N1 dapat mendorong terjadinya koagulasi darah, hal ini menjelaskan adanya hemoragi dan koagulopati (Ocana-Macchi *et al.*, 2009).

Sel endotel yang banyak menjadi tempat replikasi virus *high pathogenic avian influenza* (HPAI) merupakan regulator sentral dari *cytokine storm*. Infiltrasi sel-sel imun dan produksi sitokin merupakan peristiwa-peristiwa terpisah yang sama-sama diatur oleh sel endotel pada manusia (Teijaro *et al.*, 2011). Penelitian pada manusia (*human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) diketahui bahwa pola *signaling* dapat diaktifkan oleh virus H5N1 dan menimbulkan ketidakseimbangan berupa program gen proinflamasi yang berlebihan dan antivirus yang tidak sempurna (Viemann *et al.*, 2011).

Penggunaan *Spirulina* dalam penelitian ini didasarkan pada potensi kandungan nutrisi serta bahan aktif yang terkandung di dalamnya. Menurut Pelizer *et al.*, (2003) *Spirulina* merupakan *blue green algae*, yaitu mikro alga hijau biru yang kaya protein (60-70%), asam-asam amino, dan asam-asam nukleat. *Spirulina* juga mengandung beta karoten, fenol, asam gammalinolenat, dan asam-asam lemak *essensial* lainnya (Belay *et al.*, 1993; Von Der Weid *et al.*, 2000; Colla *et al.*, 2008). Menurut Becker (2007) dan Araújo *et al.*, (2003), biomassa mikro alga memiliki kadar asam nukleat tinggi sekitar 4-6%. Selain itu *Spirulina* memiliki kandungan vitamin B₁ dan B₂ yang tinggi, *trace* elemen seperti besi, iodium, selenium, seng, tembaga, mangaan, dan kromium (Otles dan Pire, 2001; Mazo *et al.*, 2004).

Pada awalnya produksi komersial *Spirulina* difokuskan terutama karena kandungan gizinya, tapi kini perhatian ditujukan kepada kemampuannya sebagai antioksidan, immunomodulasi, potensi antikanker, antivirus dan pengaturan kolesterol (Chamorro *et al.*, 1996; Ismail *et al.*, 2009). *Spirulina* dapat memodulasi profil limfosit-T *helper* (Th) pada penderita alergi rhinitis dengan menekan diferensiasi sel-sel Th2 melalui penghambatan

produksi IL-4. Kemampuan immunomodulasi *Spirulina* oleh beberapa peneliti diperkirakan dimediasi oleh sistem imun alami (*innate*) (Mao *et al.*, 2005; Lobner *et al.*, 2008).

Beberapa hasil penelitian *in vivo* dan *in vitro* menunjukkan bahwa *Spirulina* efektif untuk mengobati alergi tertentu, kanker, hepatotoksisitas, penyakit virus, dan penyakit-penyakit kardiovaskuler, hiperglikemia, hiperlipidemia, immunodefisiensi, dan proses inflamatori. Aktivitas potensial tersebut juga disebabkan adanya kandungan asam lemak omega-3, omega-6, β -karoten, alpha-tocopherol, *phycocyanin*, phenol, Ca-Spirulan (Ca-SP) (Chamorro *et al.*, 1996; Chamorro *et al.*, 2002) serta mengandung *phycocyanin* yang berperan untuk menginduksi sel T pada beberapa gangguan inflamasi (McCarty, 2011). Berdasarkan kandungan nutrisi dan bahan aktif seperti tersebut, maka *Spirulina* digunakan dalam penelitian ini sebagai *feed additive* immunomodulator yang berperan untuk meningkatkan imunitas pada ayam yang diinfeksi virus H5N1 yang akan diamati pengaruhnya terhadap gambaran sel leukosit (monosit, eosinofil, dan basofil).

Komponen penting lain dari *Spirulina*, polisakarida tersulfatasi (*Spirulan kalsium*, Ca-SP) yang dapat menghambat replikasi berbagai virus beramplop, termasuk virus herpes simpleks, virus influenza, virus campak, virus gondok, dan *human immunodeficiency virus* (HIV), secara selektif menghambat penetrasi virus ke dalam sel inang (Gershwin dan Belay, 2008).

Sodium spirulan (Na-SP) merupakan polisakarida tersulfatasi yang diisolasi dari ekstraksi air panas *Spirulina plantesis*. Senyawa Na-SP selain menunjukkan efek antivirus juga menunjukkan aktivitas antitrombin yang kuat dengan pengaktifan *heparin cofactor II* yang merupakan *inhibitor* fisiologi dari trombin. (Yamamoto *et al.*, 2003).

Eosinofil merupakan granulosit polimorfonuklear-eosinofilik berukuran hampir sama dengan heterofil. Jumlah eosinofil dalam aliran darah berkisar antara 2-8% dari jumlah leukosit. Sel ini berkembang dalam sumsum tulang sebelum bermigrasi ke dalam aliran darah serta memiliki jangka hidup 3-5 hari. Jika dibandingkan dengan heterofil, inti eosinofil lebih sedikit (Samuelson, 2007). Eosinofil memiliki diameter sekitar 7 μ m. Bila dibandingkan dengan heterofil, sitoplasma eosinofil berwarna lebih bersih, biru pucat

sedangkan granulnya berbentuk lebih terang dan cenderung berada di pinggir.

Monosit merupakan leukosit yang memiliki ukuran terbesar, berdiameter 15-20 μm dan jumlahnya 3–9% dari seluruh sel darah putih (Dharmawan, 2002). Sitoplasma sel ini dibagi menjadi dua bagian, yaitu berwarna cerah dan berwarna lebih gelap. Sitoplasmanya terlihat berwarna biru keabu-abuan dengan tepi inti yang tidak beraturan, inti kromatin monosit cenderung lebih menyatu, serta pada sitoplasma tampak adanya vakuola (Bacha dan Linda, 2000) dan seperti berbusa (Samuelson, 2007). Monosit berperan sebagai prekursor untuk makrofag, dan sel ini akan mencerna dan membaca antigen.

Basofil memegang peranan penting dalam respons kekebalan tubuh, yang diawali sejak kontak dengan substansi penyebab alergi dengan menghasilkan bahan mediator kimiawi seperti histamin yang selanjutnya menarik sel-sel imun yang lainnya (Moreira, 2013),

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek penggunaan *Spirulina* terhadap jumlah monosit, eosinofil serta basofil pada ayam yang diinfeksi virus H5N1. Manfaat yang diharapkan dalam penelitian ini adalah mengetahui pemanfaatan *Spirulina* serta pengembangan sumber-sumber alami untuk pengendalian penyakit flu burung, khususnya penggunaan kelompok *microalgae* (*Spirulina*) sebagai imunomodulator.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini terdiri dari tiga perlakuan dan masing-masing terdiri dari tujuh ulangan. Ketiga perlakuan tersebut adalah pemberian *Spirulina* dosis 0%, 10%, dan 20%. Pemberian *Spirulina* dilakukan melalui air minum, serta diberikan pada hewan coba sejak usia 19 hari sampai umur 44 hari (selama 25 hari). Infeksi buatan dilakukan dengan cara ayam diinfeksi dengan virus AI (H5N1) sebanyak 10^4 EID₅₀ (A/Ck/Indonesia/BL/03, koleksi Adi Prijo Rahardjo, FKH Unair), dengan memasukkan pada saluran pernafasan (tetes hidung) 0,1 mL pada hari ke 19 perlakuan *Spirulina*. Pemberian *Spirulina* terus dilakukan sampai hari ke 25. Selama enam hari setelah perlakuan infeksi virus H5N1, dilakukan pengamatan adanya gejala klinis dan kematian pada kelompok ayam yang diteliti. Pengambilan darah ayam, dilakukan melalui vena brachialis sebanyak 0,5-1,0 mL.

Sampel darah ditampung dalam tabung reaksi yang diberi EDTA (1 mg/tabung). Tabung dikocok secara perlahan-lahan agar darah tidak membeku, dan segera diperiksa di laboratorium.

Hitung jenis leukosit dilakukan dengan membuat hapusan darah terlebih dahulu menggunakan pewarnaan Wright. Setelah didapatkan hapusan darah yang baik, hapusan tersebut kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 100 kali. Pada setiap lapangan pandang, dihitung jumlahnya, jenis leukosit dengan menggunakan alat penghitung sel darah (*Blood Cell Counter*) sampai didapatkan jumlah 100 sel. Nilai yang diperoleh merupakan jumlah masing-masing sel tersebut per 100 sel leukosit. Nilai tersebut kemudian dikonversikan menjadi nilai absolut dengan menggunakan perhitungan: persen sel x jumlah total leukosit (mm^3).

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan sidik ragam dan jika terdapat perbedaan rata-rata antara perlakuan dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Eosinofil

Berdasarkan hasil uji sidik ragam dapat diketahui bahwa penambahan *Spirulina* menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) antara perlakuan terhadap jumlah eosinofil. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa perlakuan yang menghasilkan jumlah eosinofil terendah didapatkan pada perlakuan pemberian *Spirulina* 20% (4,86%) yang berbeda dengan perlakuan lainnya. Peningkatan jumlah eosinofil didapatkan pada perlakuan kontrol tanpa pemberian *Spirulina* (6,29%) dan perlakuan pemberian *Spirulina* 10% (6,57%). Penggunaan *Spirulina* 10% pada ayam yang diinfeksi virus H5N1 dalam penelitian ini, belum mampu meningkatkan kadar eosinofil dibandingkan kontrol tanpa penggunaan *Spirulina*. Selanjutnya pada penggunaan *Spirulina* 20%, menunjukkan adanya penurunan jumlah sel eosinofil (Tabel 1). Penggunaan *Spirulina* dalam penelitian ini menunjukkan jumlah sel eosinofil yang berbeda dari hasil penelitian Bedanova *et al.*, (2006) yang menunjukkan bahwa kisaran eosinofil pada ayam sebesar 0,07% dan sedikit terjadi peningkatan pada saat ayam menderita stres mencapai jumlah 0,09%. Penggunaan *Spirulina* dalam penelitian ini menunjukkan jumlah sel

eosinofil yang lebih tinggi daripada penelitian Bedanova *et al.*, (2006) tersebut dapat disebabkan karena adanya infeksi virus H5N1 pada ayam perlakuan, namun kadar eosinofil yang dihasilkan dengan pemberian *Spirulina* dalam penelitian ini (Tabel 1) masih dalam kisaran normal, yaitu sebesar 1,5-6,0% dengan rata-rata 4% (Jain, 1986).

Eosinofil memiliki dua fungsi istimewa, yaitu pertama mampu menyerang dan menghancurkan larva cacing (parasit), sedangkan fungsi kedua adalah enzim yang dihasilkan eosinofil mampu menetralkan faktor radang yang dilepaskan oleh sel *mast* dan basofil pada proses hipersensitivitas tipe 1. Eosinofil berperan aktif untuk mengatur proses alergi akut dan perbarahan, mengatur infestasi parasit, serta memfagositosis bakteri, antigen-antibodi kompleks, mikoplasma, dan ragi. Sel eosinofil juga mengandung histaminase yang mengaktifkan histamin dan melepaskan serotonin dari sel tertentu, juga melepaskan seng yang menghalangi agregasi trombosit dan migrasi makrofag (Dharmawan, 2002).

Fungsi utama eosinofil adalah menetralkan adanya bahan-bahan toksik, sehingga keberadaannya dalam jumlah besar di tempat-tempat tertentu berhubungan dengan adanya reaksi antigen-antibodi serta pada tempat tertentu tersebut melakukan penetrasi terhadap bahan asing di dalam tubuh (Moreira, 2013).

Eosinofil diproduksi pada saat infeksi parasit dan pada saat terjadinya reaksi alergi. Pada saat reaksi alergi sel *mast* dan basofil melepaskan faktor kemotaktik eosinofil sehingga eosinofil bermigrasi ke arah jaringan yang meradang dan menurut Dharmawan (2002) peningkatan eosinofil disebabkan oleh beberapa kondisi seperti hipersensitivitas misalnya karena parasit dan alergi, stadium kesembuhan infeksi akut, tumor dan insufisiensi produk

korteks adrenal. Sebaliknya, peningkatan eosinofil juga dapat disebabkan karena penyakit inflamasi, gangguan sel *mast*, *hypoadrenokorticism* (Jackson, 2007).

Monosit

Berdasarkan hasil uji sidik ragam dapat diketahui bahwa penambahan *Spirulina* menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap jumlah sel monosit. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa perlakuan yang menghasilkan jumlah monosit tertinggi didapatkan pada perlakuan kontrol P_0 (tanpa *Spirulina*) yang berbeda dengan perlakuan lainnya. Penurunan jumlah monosit terdapat pada perlakuan P_1 (*Spirulina* 10%) dan P_2 (*Spirulina* 20%) yang menunjukkan jumlah monosit tidak berbeda nyata diantara kedua perlakuan tersebut. Namun, berbeda dengan kontrol tanpa penggunaan *Spirulina* (P_0). Hasil penelitian penggunaan *Spirulina* 10% dan 20% pada ayam yang diinfeksi virus H5N1 terhadap jumlah sel monosit menunjukkan adanya penurunan (Tabel 1). Jumlah sel monosit yang diperoleh pada perlakuan penggunaan *Spirulina* pada ayam yang diinfeksi virus H5N1 ini, menunjukkan hasil yang relatif hampir sama dengan kisaran jumlah sel monosit untuk ayam pada umumnya, yaitu sebesar 0,09 dan terjadi peningkatan menjadi 0,15% pada ayam yang mengalami stress pada penelitian Bedanova *et al.*, (2006).

Monosit berperan sebagai prekursor untuk makrofag, dan sel ini akan mencerna dan membaca antigen (Samuelson, 2007). Apabila sel monosit teraktivasi, maka akan mengekspresikan sitokin proinflamasi utama yaitu *chicken TNF-like ligand 1A* (ChTL1A), yang dapat memicu kejadian *cytokine storm* yang menyebabkan kematian pada unggas. Sitokin ini dihasilkan oleh makrofag yang

Tabel 1. Rataan persentase monosit, eosinofil, basofil darah ayam dengan pemberian *Spirulina*

Perlakuan	Rataan dan Simpangan Baku		
	Eosinofil (%)	Monosit (%)	Basofil (%)
Spirulina 0% (P_0)	6,28 ^b ± 1,11	1,28 ^b ± 0,00	2,14 ^a ± 0,89
Spirulina 10% (P_1)	6,57 ^b ± 0,97	0,28 ^a ± 0,49	2,28 ^a ± 0,48
Spirulina 20% (P_2)	4,86 ^a ± 1,57	0,00 ^a ± 0,49	1,86 ^a ± 0,89

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

akhirnya akan mengaktivasi limfosit T dan menekan jumlah sel yang terinfeksi virus, sehingga dari gambaran monosit yang menurun pada perlakuan P₁ dan P₂ ada hubungannya dengan penurunan ChTL1A (sitokin pro inflamasi) dan peningkatan jumlah virus yang ada di dalam sel endothel dan makrofag. Selain itu penurunan jumlah monosit terdapat pada perlakuan P₁ (*Spirulina* 10%) dan P₂ (*Spirulina* 20%) diduga karena peranan *Spirulina* sebagai antiinflamasi sehingga menekan pengeluaran monosit ke dalam sirkulasi. Pada perlakuan penggunaan *Spirulina* 20%, jumlah sel monosit tidak dapat terdeteksi, hal ini dapat disebabkan karena monosit darah tidak pernah mencapai dewasa penuh sampai bermigrasi ke luar pembuluh darah dan masuk ke jaringan dan kemudian sel ini menjadi makrofag tetap (*fixed macrophage*) dalam jaringan seperti sinusoid hati, sumsum tulang, alveoli paru-paru, dan jaringan limfoid. Monosit lebih sering berada dekat pembuluh darah (Dharmawan, 2002).

Basofil

Berdasarkan hasil uji sidik ragam dapat diketahui bahwa penambahan *Spirulina* tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) terhadap jumlah sel basofil. Hasil penelitian ini (Tabel 1) menunjukkan bahwa penggunaan *Spirulina* 20% (jumlah sel basofil 1,86%) memberikan hasil kadar basofil yang tidak berbeda dengan perlakuan *Spirulina* 10% (jumlah sel basofil 2,28%) maupun pada perlakuan tanpa pemberian *Spirulina* (jumlah sel basofil 2,14%). Walaupun secara statistika tidak menunjukkan adanya perbedaan antar perlakuan, namun terdapat kecenderungan bahwa pada penggunaan *Spirulina* 10% menunjukkan adanya peningkatan jumlah sel basofil dibandingkan kontrol pada ayam yang diinfeksi virus flu burung H5N1 yang turut berperan dalam respons kekebalan tubuh. Sesuai dengan pendapat Moreira (2013), basofil memegang peranan penting dalam respons kekebalan tubuh, yang diawali sejak kontak dengan substansi penyebab alergi dengan menghasilkan bahan mediator kimiawi seperti histamin yang selanjutnya menarik sel-sel imun lainnya. Selain itu menurut Dharmawan (2002), sel basofil mengandung heparin, histamin, asam hialuronat, kondroitin sulfat, serotonin, dan beberapa faktor kemotaktik. Basofil berperan sebagai mediator untuk aktivitas perbarahan dan alergi, memiliki reseptor immunoglobulin-E (IgE) dan immunoglobulin-G (IgG) yang

menyebabkan degranulasi dan membangkitkan reaksi hipersensitif dengan sekresi yang bersifat vasoaktif.

Basofil merupakan granulosit yang bersifat polimorfonuklear basofilik yang bentuk dan ukurannya hampir sama dengan heterofil. Granulosit ini cenderung menjadi sel yang bulat dengan sebuah inti bulat di tengah. Intinya berwarna biru dan sering ditutupi oleh granul sitoplasmik. Basofil lebih mudah dibedakan dari dua tipe sebelumnya (Samuelson, 2007) karena intinya biasanya tidak ada lobulasi. Basofil adalah leukosit yang jumlahnya paling rendah sekitar 0,5-1,5% dari seluruh leukosit yang beredar dalam aliran darah (Dharmawan, 2002).

Penggunaan *Spirulina* dalam penelitian ini menunjukkan jumlah sel basofil yang berbeda dari hasil penelitian Bedanova *et al.*, (2006) yang menunjukkan bahwa jumlah sel basofil untuk ayam sebesar 0,06% dan meningkat pada saat ayam menderita stres mencapai jumlah 0,14%. Penggunaan *Spirulina* dalam penelitian ini menunjukkan jumlah sel basofil yang lebih tinggi daripada penelitian Bedanova *et al.*, (2006) tersebut dapat disebabkan karena adanya infeksi virus H5N1 pada ayam perlakuan.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penggunaan *Spirulina* dapat memengaruhi jumlah sel eosinofil dan monosit yang turut berperan dalam meningkatkan pembentukan sistem kekebalan *innate* (alami) pada ayam yang terinfeksi virus flu burung H5N1.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Pimpinan Fakultas Kedokteran Hewan, Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, serta Rektor Universitas Airlangga yang telah mendanai penelitian ini, berdasarkan sumber dana DIPA BOPTN, sesuai SK Rektor 3809/UN3/KR/2013, tgl 1 Maret 2013 dan 7673/UN3/KR/2013, tgl 2 Mei 2013. Terima kasih pula kami sampaikan kepada Bapak drh Adi Prijo Rahardjo, MSi, karena berkat izinnya, isolat virus A/Ck/Indonesia/BL/03 dapat digunakan dalam penelitian ini, serta kepada semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu atas segala bantuannya dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Aiki-Raji CO, Aguilar PV, Kwon Y, Goetz S, Suarez DL, Jethra AI, Nash O, Adeyefa CAO, Adu FD, Swayne D, Basler CF. 2008. Phylogenetics and Pathogenesis of Early Avian Influenza Viruses (H5N1), Nigeria. *Emerging Infectious Diseases* 14 (11): 1753-1755.
- Anthony JCM, Merriman TN, Heimbach JT. 2006. 90-Day oral (gavage) study in rats with galactooligosaccharides syrup. *Food Chem Toxicol* 44: 819-826.
- Araújo KGL, Facchinetti AD, Santos CP. 2003. Influence of intake of biomass of Spirulina (*Arthrospira* sp.) on body weight and food intake in rats. *Cienc Technol Alim* 23(1): 6-9.
- Becker EW. 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotech Advan* 25: 207-210.
- Bedanova, I, Voslarova E, Vecerek V, Pistekova V, Chiloupek P. 2007. Haematological Profile of Broiler Chickens under Acute Stress Due to Shackling. *Acta Vet. Brno* 76: 129-135; doi:10.2754/avb200776010129.
- Belay AOY, Miyakawa K, Shimamatsu H. 1993. Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. *J Applied Phycol* 5: 235-241.
- Chamorro G, Salazar M, Favila L, Bourges H. 1996. Pharmacology and toxicology of Spirulina alga. *Journal Rev Invest Clin* 48(5): 389-99.
- Chamorro G, Salazar M, Araújo KG, dos Santos CP, Ceballos G, Castillo LF. 2002. Update on the pharmacology of Spirulina (*Arthrospira*), an unconventional food. *Journal Arch Latinoam Nutr* 52(3): 232-240.
- Colla ML, Muccilo-Baisch AL, Costa JAV. 2008. Spirulina platensis effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerols in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet. *Braz Arch Biol Technol* 51(2): 405-411.
- Dharmawan NS. 2002. *Pengantar Patologi Klinik Veteriner (Hematologi Klinik)*. Cetakan II. Denpasar. Pelawa Sari.
- Gershwin ME, Belay A. 2008. *Spirulina in Human Nutrition and Health*. Florida, United States of America. CRC Press.
- Ismail MF, Ali DA, Fernando A, Abdraboh ME, Gaur RL, Ibrahim WM, Raj MH, Ouhtit A. 2009. Chemoprevention of rat liver toxicity and carcinogenesis by Spirulina. *Int J Biol Sci* 5(4): 377-387.
- Jain NC. 1986. *Schalm's Veteriner Hematology*. 4th Ed. Philadelphia. Lea & Febiger.
- Løbner M, Walsted A, Larsen R, Bendtzen K, Nielsen CH. 2008. Enhancement of human adaptive immune responses by administration of a high-molecular-weight polysaccharide extract from the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Journal Med Food* 11(2): 313-22. doi: 10.1089/jmf.2007.564.
- Mao TK, Van de Water J, Gershwin ME. 2005. Effects of a Spirulina-based dietary supplement on cytokine production from allergic rhinitis patients. *Journal Med Food* 8(1): 27-30.
- McCarty MF. 2011. Clinical potential of phycocyanobilin for induction of T regulatory cells in the management of inflammatory disorders. *Med Hypotheses* 77(6): 1031-1033. doi: 10.1016/j.mehy.2011.08.041.
- Moreira LM, Behling B del S, Rodrigues R da S, Costa JAV, Soares LA de Souza. 2013. Spirulina as a protein source in the nutritional recovery of Wistar rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 56: 3.
- Mazo VK, Gmoshinski- IV, Zilova IS. 2004. Microalgae Spirulina in human nutrition. *Vopr Pitan* 73(1): 45-53.
- Ocana-Macchi M, Bel M, Guzylack-Piriou L, Ruggli N, Liniger M, McCullough KC, Sakoda Y, Isoda N, Matrosovich M, Summerfield A. 2009. Hemagglutinin-Dependent Tropism of H5N1 Avian Influenza Virus for Human Endothelial Cells. *J Virol* 83(24): 12947-12955.
- Otle° S, Pire R. 2001. Fatty acid composition of Chlorella and Spirulina microalgae species. *JAOAC Int* 84(6): 1708-1714.

- Pelizer LH, Danesi EDG, Rangel CO. 2003. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. *J Food Eng* 56: 371-375.
- Samuelson DA. 2007. *Text Book of Veterinary Histology*. Tokyo WB Saunders Co. Pp 147-151.
- Teijaro JR, Walsh KB, Cahalan S, Fremgen DM, Roberts E, Scott F, Martinborough E, Peach R, Oldstone MBA, Rosen H. 2011. Endothelial Cells Are Central Orchestrators of Cytokine Amplification during Influenza Infection. *Cell* 146: 980-991.
- Viemann D, Schmolke M, Lueken A, Boergeling Y, Friesenhagen J, Wittkowski H, Ludwig S, Roth J. 2011. H5N1 Virus Activates Signaling Pathways in Human Endothelial Cells Resulting in Specific Imbalanced Inflammatory Response. *The Journal of Immunology* 186: 164-173.
- Yamamoto C, Nakamura A, Shimada S, Kaji T, Lee J, Hayashi T. 2003. Differential Effects of Sodium Spirulan on the Secretion of Fibrinolytic Proteins from Vascular Endothelial Cells: Enhancement of Plasminogen Activator Activity. *Journal of Health Science* 49(5): 405-409.