

Respons Immunoglobulin-G dan Immunoglobulin-M Mencit yang Diberi Ekstrak Methanol Alga Biru Hijau dan Diinfeksi Dengan Takizoit

(THE RESPONSES OF IMMUNOGLOBULIN-G AND IMMUNOGLOBULIN-M ON MICE ADMINISTERED WITH METHANOL EXTRACT OF BLUE GREEN ALGAE AND CHALLENGED WITH TACHIZOIT)

Sorta Basar Ida Simanjuntak^{1)*}, Sukarti Moeljopawiro²⁾,
Wayan Tunas Artama³⁾, Subagus Wahyuono⁴⁾

¹Laboratorium Fisiologi Hewan, Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto. Jl. dr. Suparno No. 63, Tekp. (0281)638794, Fax. (0281)631700,

*Koresponden e-mail: busorta@yahoo.com.

²Laboratorium Biokimia, Fakultas Biologi

³Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Hewan

⁴Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

ABSTRAK

Toksoplasmosis adalah penyakit yang disebabkan oleh infeksi parasit *Toxoplasma gondii*. Penyakit ini sangat berbahaya bagi hewan dan manusia Toksoplasmosis sampai sekarang masih sulit ditanggulangi. Salah satu cara penanggulangan toksoplasmosis adalah dengan meningkatkan kekebalan tubuh misalnya menggunakan imunostimulator *Spirulina platensis*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi *S. platensis* sebagai imunostimulan dan untuk mengetahui fraksi yang paling potensial sebagai anti-toxoplasma dilihat dari respon antibodi Immunoglobulin-G dan Immunoglobulin-M yang diukur menggunakan metode ELISA. Preparasi senyawa aktif ekstrak metanol *S. platensis* diisolasi secara Kromatografi Lapis Tipis Preparatif dan diperoleh tiga fraksi, yaitu fraksi atas (I), fraksi tengah (II) dan fraksi bawah (III). Sebanyak 48 ekor mencit dibagi menjadi 4 kelompok masing-masing 12 ekor. Kelompok P1, P2, P3 diberi fraksi I, II III secara oral selama 14 hari berturut-turut dengan dosis 3 mg/ml/ekor mencit. Kelompok P0 digunakan sebagai kontrol. Pada hari ke-15 semua mencit diinfeksi dengan takizoit kepadatan 10^7 sel/ml darah diambil hari ke-15 (sebelum diinfeksi) dan hari ke-1, ke-2 dan ke-3 setelah diinfeksi dengan takizoit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat peningkatan respon IgG setelah pemberian fraksi II (hari ke-0 = 2,504) dan hari ke-3 (2,608) setelah diinfeksi dengan takizoit serta meningkatnya respon IgM pada hari ke-1 setelah diinfeksi dengan takizoit (2,898). Kesimpulan penelitian ini adalah *S. platensis* bersifat imunostimulan dan fraksi II ekstrak metanolpotensial sebagai anti-toxoplasma.

Kata kunci: imunostimulator, kekebalan tubuh, *Spirulina platensis*, takizoit, toksoplasmosis.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is an infectious disease caused by *Toxoplasma gondii*. This disease could severely affect humans and animals. Up to now there has been no simple treatment to fight toxoplasmosis. A prospective alternative treatment to overcome this problem is by increasing immunity of the body using an immunostimulant such as *Spirulina platensis*. The aims of this research were to observe the potency of *S. platensis* as an immunostimulant and to find the most potential fraction of *S. Platensis* that can increase the responses of IgG and IgM antibodies againts toxoplasma. The responses of these antibodies were measured using ELISA method. The isolation of compounds from *S. platensis* using Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC) found three fractions which were a top fraction (I), a middle fraction (II), and a lower fraction (III). Forty-eight mice used in this research were divided into four different groups with 12 mice in each group and treated differently. The top, middle, and lower fractions of *S. platensis* were administered orally to three groups of mice respectively at dose of 3mg/ml for each mouse while the mice in the fourth group were kept as untreated controls. The treatment was conducted for 14 days consecutively and on the next day, all mice, including the controls, were challenged with tachizoit. The effect of *S.platensis* fractions on the responses of IgG and IgM antibodies were then measured at various time intervals, i.e. day 0 (before infection) and day 1, 2, and 3 after infection. The results showed that IgG response increased in the day 0 (2.504 OD) and the day 3 after infection (2.608 OD) while IgM response increased in day 1 after infection (2.898 OD). In conclusion, *S. platensis* was an immunostimulant and the middle fraction (II) of *S. Platensis* was the most potential fraction to increase immunity againts toxoplasma .

Key words : immunity, immunostimulant, *Spirulina platensis*, tachizoit, toxoplasmosis

PENDAHULUAN

Parasit sel tunggal *Toxoplasma gondii* adalah penyebab penyakit toksoplasmosis. Infeksi utama *T. gondii* selama kehamilan dapat ditransmisikan ke fetus dan dapat menyebabkan keguguran, cacat pada janin atau menurunkan penglihatan. Infeksi *T. gondii* bersifat asimtomatik, namun dapat menyebabkan penyakit sistemik, bahkan dapat menyebabkan kematian (Kim *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2008; Pezerico *et al.*, 2009). Pada bayi, penyembuhan penyakit tersebut harus dilakukan segera setelah lahir (Buffalano *et al.*, 2005). Penyembuhan toksoplasmosis secara total tidak dapat dilakukan karena yang masuk ke dalam tubuh adalah fase *bradizoit*. Pada manusia dengan imunitas tinggi, fase *bradizoit* ini akan berada di otot dalam keadaan dorman. Namun, pada saat imunitas turun maka fase *bradizoit* ini akan menjadi aktif (Dubey dan Beattie, 1988 dalam Laliberte dan Carruthers, 2008).

Penanggulangan toksoplasmosis selama ini dilakukan dengan antibiotik, misalnya spiramisin (Lefevre-Pettazzoni *et al.*, 2007). Penggunaan antibiotik untuk jangka waktu lama dapat mengakibatkan kerusakan ginjal. Oleh karena itu, penanggulangan toksoplasmosis perlu dilakukan dengan meningkatkan kekebalan tubuh yang salah satu caranya adalah dengan menggunakan imunostimulator *Spirulina platensis*.

Alga *S. platensis* mengandung berbagai jenis senyawa yang sangat penting bagi tubuh. *S. platensis* mempunyai dinding sel yang lembut sehingga mudah dicerna (Henrikson, 2000). *S. platensis* adalah suplemen makanan yang dapat mempertinggi imunitas, menurunkan toksisitas dari logam-logam berat, dan memproteksi dari radiasi (Belay dan Ota, 1993). *S. platensis* juga mengandung karbohidrat seperti rhamnosa, fruktosa, ribosa, mannosa, dan mineral seperti tembaga, magnesium, seng, potasium, dan zat besi (Ray *et al.*, 2007). Karbohidrat yang terkandung dalam *S. platensis* dengan cepat merangsang sel imun dalam tubuh (Oliveira *et al.*, 2008).

Berdasarkan permasalahan tersebut di atas, maka perlu penelitian untuk mengetahui fraksi dari ekstrak metanol *S. platensis* yang berpotensi sebagai anti toxoplasma, dengan melihat respons antibodi IgG dan IgM.

METODE PENELITIAN.

Ekstraksi *S. platensis*.

Sebanyak 20 g *S. platensis* ditempatkan pada corong pisah 500 ml dan ditambahkan 300 ml akuabidestilata serta diaduk sampai homogen. Larutan kemudian ditambah 150 ml larutan etil asetat dan dibolak-balik sampai homogen kemudian didiamkan satu malam. Setelah semalam, larutan akan terpisah menjadi dua lapisan, yaitu lapisan atas berwarna hijau adalah ekstrak etil asetat sedangkan lapisan bawah yang berwarna biru adalah ekstrak air. Kedua ekstrak ditempatkan pada cawan kaca yang berbeda, kemudian dikeringkan menggunakan kipas angin. Setelah kering ekstrak etil asetat ditambah larutan metanol. Supernatan dipindahkan ke cawan lain dan dikeringkan menggunakan kipas angin untuk memperoleh ekstrak metanol. Ampas ditambah larutan metanol sampai ampas berwarna putih sedangkan supernatan dikeringkan (Colegate dan Molyneux, 2008).

Isolasi Bahan Aktif.

Isolasi senyawa aktif dilakukan dengan metode *bioassay guided isolation*. Setiap langkah pemisahan dimonitor dengan KLT untuk mengetahui komponen kelompok senyawa secara kualitatif dan uji dengan konsentrasi uji yang sesuai (Mae *et al.*, 2001 dalam Wahyuno, 2006).

Orientasi larutan pengembang.

Penentuan larutan pengembang yang tepat dilakukan dengan metode *Thin Layer Chromatography* (TLC). Metode TLC dilakukan dengan fase diam *silica gel* 60 PF254 dan fase gerak dengan berbagai campuran pelarut. Deteksi dilakukan di bawah lampu ultra violet (UV) dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm serta menggunakan pereaksi semprot serum sulfat ($Ce(SO_4)_2$) dan diuapi dengan amonia.

Orientasi Pelacakan Senyawa Bioaktif.

Silika gel sebanyak 40 g dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, ditambahkan 85 ml akuades dan dikocok sampai homogen. Setelah homogen dicetak pada pelat kaca ukuran 20 x 20 cm dan dibiarkan sampai kering. Silika gel yang ada pada pelat kaca diaktifkan pada oven dengan suhu 100 °C selama 15 menit. Ekstrak metanol ditotolkan pada gel di pelat kaca menggunakan pipet kapiler dengan jarak dari tepi bawah 2 cm.

Gel dengan pelat kaca dimasukkan dalam *chamber* yang telah diisi dengan larutan pengembang hasil orientasi yang terbaik (n-heksan : metanol = 1,7 : 0,3), dibiarkan mengembang sampai larutan 1 cm dari tepi atas pelat. Gel dikeringkan, UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, disemprot dengan serium sulfat ($Ce(SO_4)_2$) kemudian dipanaskan pada oven dengan suhu 100 °C (Sarker *et al.*, 2006). Gambaran bercak yang timbul digunakan untuk menentukan fraksi dan memperbanyak jumlah tiap fraksi yang akan diujikan pada mencit secara *in vivo*.

Uji *in vivo* pada Mencit.

Perlakuan yang dicobakan adalah 3 macam fraksi, yaitu: fraksi atas (I), fraksi tengah (II), dan fraksi bawah (III) serta kontrol (air ditambah *co solvent* 0,75% *tween* 40) dengan dosis 3 mg/ekor mencit diberikan 2 kali sehari. Cara pembuatan larutan uji sebagai berikut: fraksi (sesuai perlakuan) ditimbang sesuai kebutuhan. Fraksi digerus sampai halus, ditambahkan *co-solvent* 0,75% *tween* 40. Larutan uji selalu dibuat baru. Fraksi diberikan selama 14 hari dan pada hari ke-15 semua mencit diinfeksi dengan takizoit dengan kepadatan 10^7 sel/ml.

Preparasi Serum.

Darah diambil melalui vena orbital menggunakan pipet kapiler. Pengambilan darah dilakukan hari ke-0 (sebelum diinfeksi dengan takizoit) serta hari ke-1, hari ke-2 dan hari ke-3 setelah diinfeksi dengan takizoit.

Darah ditampung pada *microtube* 1,5 ml steril. Darah disimpan di kulkas selama 10 menit, kemudian darah dipusing dengan kecepatan 12000 rpm selama 2 menit. Serum diambil dan ditempatkan pada *microtube* baru. Serum disimpan di dalam *freezer* -20 °C sampai digunakan.

Checker Board.

Penentuan pengenceran serum perlakuan dengan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) sebagai berikut: *Plate* di *coating* antigen *excretion and secretion antigen* (ESA) 10 µg/ml sebanyak 100 µl/sumur, diinkubasi pada penangas air dengan suhu 37°C selama 18 jam. *Plate* dicuci tiga kali dengan *washing solution* sebanyak 200 µl/sumur, *blocking* dengan 1% *Bovine Serum Albumin* (BSA) dalam *Phosphat Buffer Saline* (PBS) I masing-masing 200 µl/sumur, diinkubasi dalam penangas air selama 1-2 jam, cuci tiga kali dengan *washing*

solution sebanyak 200 µl/sumur. Serum perlakuan disiapkan dengan pengenceran 25 sampai 3200 kali ditambah buffer inkubasi dalam *microtube*. *Mikroplate* diisi dengan serum perlakuan 100 µl/sumur, diinkubasi dalam penangas air selama 1 jam, kemudian dicuci tiga kali dengan *washing solution* 200 µl/sumur. Disiapkan konjugat *anti-mouse* IgG alkaline phosphatase 1 : 3000 ditambah 1% BSA dalam 15 ml buffer inkubasi. Isi mikroplate dengan konjugat 150 µl/sumur, inkubasi dalam penangas air selama 1 jam. Cuci 3 kali dengan *washing solution* 200 µl/sumur. *Mikroplate* diisi dengan substrat 4-nitro-phenil-phosphate (NPP) 1 mg/ml dalam 15 ml buffer substrat masing-masing 150 µl/sumur, diinkubasi dalam penangas air selama 15 menit. Selanjutnya dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 405 nm (Ausubel *et al.*, 1995).

Pengukuran Optical Density (OD) IgG dan IgM.

Pengukuran OD IgG dan IgM menggunakan metode ELISA. Cara kerja adalah sebagai berikut: *coating* antigen ESA 10 µg/ml sebanyak 100 µl/sumur, diinkubasi pada penangas air dengan suhu 37°C semalam, dicuci tiga kali dengan *washing solution* sebanyak 200 µl/sumur *blocking* dengan 1% BSA dalam buffer PBS I masing-masing 200 µl/sumur, diinkubasi dalam penangas air selama 1 – 2 jam, dicuci tiga kali dengan *washing solution* sebanyak 200 µl/sumur. Serum perlakuan disiapkan dengan pengenceran 50 kali (hasil terbaik dari *checker board*) ditambah buffer inkubasi dalam *microtube*. *Mikroplate* diisi dengan serum perlakuan 100 µl/sumur, inkubasi dalam penangas air selama 1 jam, dicuci tiga kali dengan *washing solution* 200 µl/sumur. Disiapkan konjugat *anti-mouse* IgG dan IgM alkaline phosphatase 1 : 3000 ditambah 1% BSA dalam 15 ml buffer inkubasi pada wadah yang berbeda. Sebanyak 48 sumur diisi 150 µl/sumur dengan konjugat IgG, dan 48 sumur diisi dengan konjugat IgM sebanyak 150 µl/sumur. Kemudian diinkubasi dalam penangas air selama 1 jam, dicuci tiga kali dengan *washing solution* 200 µl/sumur. *Mikroplate* diisi dengan substrat NPP 1 mg/ml dalam 15 ml buffer substrat masing-masing 150 µl/sumur, diinkubasi dalam penangas air selama 15 menit. Absorbansi dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 405 nm (Ausubel *et al.*, 1995).

Analisis Data.

Nilai rata-rata simpangan baku digunakan untuk mendeterminasi signifikansi perbedaan antar kelompok. Data hasil penelitian dianalisis menggunakan *one way analysis of variance* (ANOVA).

HASIL DAN PEMBAHASAN

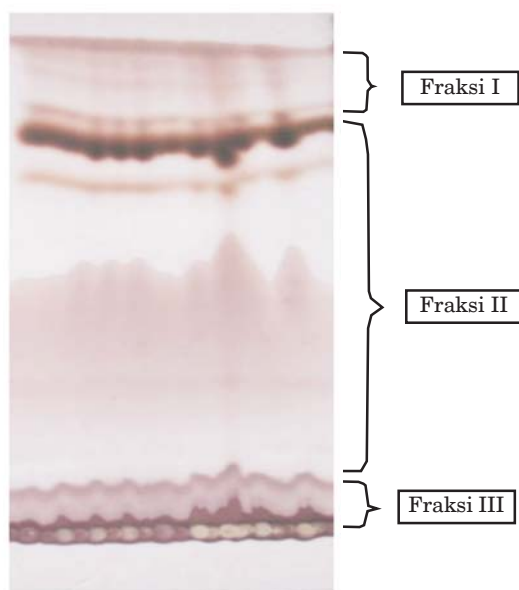
Isolasi Senyawa Aktif.

Isolasi senyawa aktif diperoleh tiga fraksi yang didasarkan pada pita yang terbentuk pada pelat preparatif, yaitu: fraksi atas (I), fraksi tengah (II) dan fraksi bawah (III) (Gambar 1.).

Respon IgG Serum

Respon IgG kontrol, tertinggi dicapai pada hari ke-1 (1.566) diikuti hari ke-0 (1.404), hari ke-2 (1,218) dan terendah pada hari ke-3 (1.181). Respon IgG fraksi I tertinggi dicapai pada hari ke-0 (1.489) diikuti dengan hari ke-2 (1.485), hari ke-1 (1.376) dan terendah pada hari ke-3 (1.239). Respon IgG fraksi II hari ke-0 (2.504), kemudian turun pada hari ke-1 (1.807) dan terendah pada hari ke-2 (1.204) serta tertinggi dicapai pada hari ke-3 (2.608). Respon IgG fraksi III tertinggi dicapai pada hari ke-3 (1.345) diikuti hari ke-0 (1.326), hari ke-2 (1.304) dan terendah pada hari ke-1 (1.183).

Respon IgG mencit kontrol, perlakuan fraksi I dan perlakuan fraksi III sebelum diinfeksi (hari ke-0) dan setelah diinfeksi (hari



Gambar 1. Gambaran Kromatografi Lapis Tipis Preparatif fraksi metanol.

ke-1, hari ke-2 dan hari ke-3) tidak jauh berbeda. Namun, mencit yang diberi perlakuan fraksi II, respons IgG hari ke-0 tinggi, hari ke-1 dan ke-2 turun serta naik lagi pada hari ke-3 setelah diinfeksi dengan takizoit (Gambar 2.).

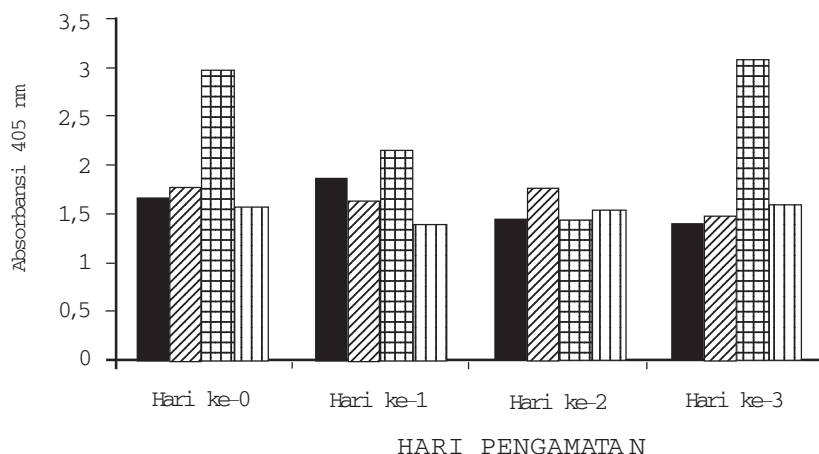
Respon IgM Serum.

Respon IgM kontrol, tertinggi dicapai pada hari ke-1 (1.013) kemudian turun pada hari ke-2 (0.987), hari ke-3 (0.925) dan terendah pada hari ke-0 (0.862). Respon IgM fraksi I tertinggi dicapai pada hari ke-0 (1.308) diikuti dengan hari ke-1 (1.07), hari ke-2 (0.909) dan terendah pada hari ke-3 (0.877). Respon IgM fraksi II pada hari ke-0 (1.717), tertinggi dicapai pada hari ke-1 (2.898), kemudian turun pada hari ke-2 (0.885) dan naik lagi pada hari ke-3 (2.08). Respon IgM fraksi III tertinggi dicapai pada hari ke-3 (1.11) diikuti hari ke-0 (0.971), hari ke-2 (0.872) dan terendah pada hari ke-1 (0.796).

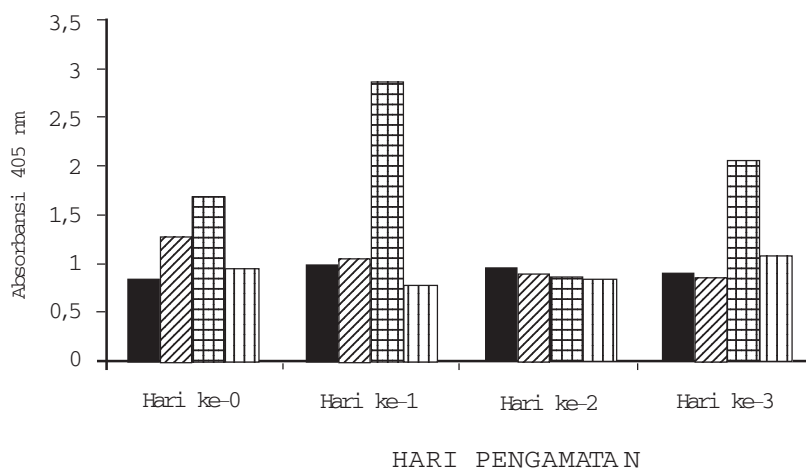
Respon IgM mencit kontrol, perlakuan fraksi I dan perlakuan fraksi III sebelum diinfeksi (hari ke-0) dan setelah infeksi (hari ke-1, hari ke-2 dan hari ke-3) tidak jauh berbeda. Namun, mencit yang diberi perlakuan fraksi II, respons IgM hari ke-0 tinggi, tertinggi dicapai pada hari ke-1 kemudian turun pada hari ke-2 serta naik lagi pada hari ke-3 (Gambar 3.).

Respon IgG setelah pemberian fraksi II pada mencit yang sehat selama 14 hari (hari ke-0) lebih tinggi dibandingkan kontrol, fraksi I dan fraksi III serta meningkat lagi pada hari ke-3 setelah diinfeksi dengan takizoit. Respon IgM mencit setelah pemberian fraksi II dan setelah diinfeksi (hari ke-1) tertinggi dibandingkan dengan kontrol, fraksi I dan fraksi III. Hal ini menunjukkan bahwa *S. platensis* adalah imunostimulan dan dapat bertahan sampai akhir pemeliharaan. Grzanna *et al.*, (2006) melaporkan bahwa *S. platensis* mempunyai efek imunostimulator dan Ray *et al.*, (2007) melaporkan *S. platensis* mempunyai efek anti oksidan, imunomodulator, dan anti kanker.

S. platensis dapat meningkatkan sistem imun humoral (antibodi dan sitokin) dan sistem imun seluler (sel T, makrofag, dan sel natural killer). Sel-sel tersebut bersirkulasi di dalam darah, sangat banyak dan khas dalam organ tubuh (Kozlenko dan Henson, 1998). Pemberian *Spirulina* pada mencit menunjukkan peningkatan produksi antibodi (Hayashi *et al.*, 1994 dalam Belay, 2002, Lobner *et al.*, 2008) (Gambar 2. dan Gambar 3.).



Gambar 2. Respons IgG serum perlakuan 3 fraksi dari KLTP ekstrak metanol *S. platensis*
 ■ Kontrol ▨ Fraksi I ▩ Fraksi II □ Fraksi III



Gambar 3. Respon IgM serum perlakuan 3 fraksi kelompok senyawa bioaktif *S. platensis*.
 ■ Kontrol ▨ Fraksi I ▩ Fraksi II □ Fraksi III

S. platensis dapat meningkatkan fungsi sistem imun, dapat meningkatkan ketahanan terhadap serangan penyakit, walaupun dengan dosis rendah (Duncan dan Klesius, 1996; Sakai, 1998). Hewan dan manusia yang mengkonsumsi *S. platensis* dapat mengatur sistem imun tubuhnya dan *S. platensis* dapat merangsang sistem imun (Lee *et al.*, 2004, Karkos *et al.*, 2008).

Hayashi *et al.*, (1994) dalam Jensen *et al.*, (2001) melaporkan bahwa mencit yang diberi suplemen alga memperlihatkan peningkatan

jumlah sel-sel yang memproduksi antibodi IgM.

S. platensis berpengaruh pada sistem imun melalui peningkatan aktivitas fagositik makrofag dan peningkatan produksi antibodi antigen-spesifik (Jensen *et al.*, 2000). Selanjutnya Simsek (2007) melaporkan bahwa alga biru hijau, *S. platensis* dapat mempercepat produksi antibodi dan menstimulasi sel imun (makrofag, sel-T dan sel *natural killer*). Beberapa peneliti menemukan bahwa *S. platensis* mengandung antioksidan (Yang *et al.*, 2009).

SIMPULAN.

Pemberian ekstrak metanol *S. platensis* dapat meningkatkan respons antibodi IgG dan IgM serta berpotensi sebagai imunostimulator.

Pemberian fraksi II (fraksi tengah) dari ekstrak metanol *S. platensis* dapat meningkatkan respons IgG serta meningkatnya respons IgM. Fraksi II ekstrak metanol berpotensi sebagai antitoxoplasma.

SARAN.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang senyawa bio aktif yang terdapat dalam fraksi II dari ekstrak metanol *Spirulina platensis*. S

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang potensi tiap senyawa aktif sebagai pengendali toksoplasmosis.

UCAPAN TERIMA KASIH.

Penelitian ini dibiayai oleh Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Hibah Bersaing XVII/2 Nomor: Kept. 170/H23/DT.01.00/2010 Tanggal 20 Mei 2010. Atas bantuan biaya yang kami terima, kami mengucapkan terima kasih.

DAFTAR PUSTAKA.

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. 1995. *Short Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inc. USA.
- Belay A, Ota Y. 1993. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *Journal of Applied Phycology*, 5: 235-241.
- Belay A. 2002. The potential application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *The Journal of the American Nutraceutical Association* 5 (2): 27- 48.
- Buffalano W, Beghetto E, Pezzo MD, Spadoni A. 2005. Use of recombinant antigens for early postnatal diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (12) : 5916-5924.
- Colegate SM, Molyneux RJ. 2008. *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination*. Second Ed. Taylor & Francis Group, New York, 605p.
- Duncan PL, Klesius PH. 1996. Effect of Feeding *Spirulina* on Specific and Nonspecific Immune Responses of *Channel catfish*. *Journal of Aquatic Animal Health* 8: 308-313.
- Grzanna R, Polotsky A, Phan PV, Pugh N, Pasco D, Frondoza CG. 2006. Immolinalin, a High-Molecular-Weight Polysaccharide Fraction of *Spirulina*, Enhances Chemokine Expression in Human Monocytic THP-1 Cells. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 12 (5): 429-435.
- Henrikson R. 2000. *Spirulina* : Health discoveries from the source of life. <http://www.earthrise.com/a/spirul-3.htm>. (1 November 2000).
- Jensen GS, Ginsberg DI, Drapeau C. 2001. *Blue-Green Algae* as an Immuno-Enhancer and Biomodulator. *JANA* 3 (4): 24-30.
- Jensen GS, Ginsberg DI, Huerta P, Citton M, Drapeau C. 2000. Consumption of *Aphanizomenon floa-aquae* Has Rapid Effects on the Circulation and Function of Immune Cells in Humans. *JANA* 2 (3): 50-58.
- Jones JL, Moran DK, Won K, Wilson M, Schantz PM. 2008. *Toxoplasma gondii* and *Toxocara spp.* Co-infection. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* 78 (1): 35-39.
- Karkos PD, Leong SC, Karkos CD, Sivaji N, Assimakopoulos DA. 2008. *Spirulina in Clinical Practice: Evidence-Based Human Application*. Hindawi Publishing Corporation. 4p.
- Kim L, Butcher BA, Lee CW, Uematsu S, Akira S, Denkers EY. 2006. *Toxoplasma gondii* Genotype Determines MyD88-Dependent Signaling in Infected Macrophages. *The Journal of Immunology* 177: 2584-2593.
- Kozlenko R, Henson RH. 1998. Latest scientific research on *Spirulina*: Effect in the AIDS Virus, Cancer and the Immune System (Online). <http://www.Health.Library.com>. Diakses September 2005.
- Laliberte J, Carruthers VB. 2008. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65: 1900-1915.
- Lee AN, Werth VP. 2004. Activation of Autoimmunity Following Use of Immunostimulatory Herbal Supplements. *Arch Dermatol* 140: 723-727.

- Lefevre-Pettazzoni M, Bissery A, Wallon M, Cozon G, Peyron F, Rabilloud M. 2007. Impact of Spyramycin Treatment and Gestational Age on Maturation of *Toxoplasma gondii* Immunoglobulin G Avidity in Pregnant Women. *Clinical and Vaccine Immunology* 14 (3): 239-243.
- Lobner 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 of Medical Food* 11 (2): 313-322.
- Oliveira EG, Rosa GS, Moraes MA, Pinto LAA. 2008. Phycocyanin Content of *Spirulina platensis* Dried in Spouted Bed and Thin Layer. *Journal of Food Process Engineering*, 31 (1): 34-50.
- Pezerico SB, Langoni H, Da Silva AV, Da Silva RC. 2009. Evaluation of *Toxoplasma gondii* placental transmission in BALB/c mice model. *Experimental Parasitology* 123: 168-172.
- Ray S, Roy K, Sengupta C. 2007. Evaluation of protective effects of water extract of *Spirulina platensis* (blue green algae) on cisplatin-induced lipid peroxidation. *Indian Journal of Pharmaceutical Science*, 69 (3): 378-383.
- Sakai M. 1998. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172 (1999): 63-92.
- Sarker, S.D., Z. Latif and A.I. Gray. 2006. *Natural Products Isolation*. Second Edition. Humana Press, Totowa, New Jersey, 515p.
- Simanjuntak SBI, Darnas D, Achmad MW, Hambali S. 2002. Efektivitas *Spirulina* sebagai Imunostimulan pada Ikan Patin Jambal (*Pangasius djambal* Bleeker). *Jurnal Biologi Indonesia III* (3): 209-218.
- Simanjuntak SBI, Darnas D, Achmad MW, Hambali S. 2003. Histopatologis Organ Limpa dan Ginjal Ikan Patin Jambal (*Pangasius djambal* Bleeker) akibat Pemberian *Spirulina* dalam Pakan secara Diskontinyu. *Biosfera* 20 (2): 62-66.
- Simanjuntak SBI, Edy Y, Farida NR. 2004. Pengaruh Penyuplemen *Spirulina* dalam Pakan terhadap Hematologis Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti* C.V.). *Jurnal Pembangunan Pedesaan* 6 (2): 84-88.
- Simsek N, Karadeniz A, Karaca T. 2007. Effects of the *Spirulina platensis* and *Panax ginseng* oral supplementation on peripheral blood cells in rats. *Revue Medical Veteriner* 158 (10): 483-488.
- Wahyuono S. 2006. Evaluasi bioaktivitas tanaman obat koleksi Kalimantan Tengah. *Majalah Obat Tradisional* 11 (3): 24-30.
- Yang L, Wang Y, Zhou Q, Chen P, Wang Y, Wang Y, Liu T, Xie L. 2009. Inhibitory effects of polysaccharide extract from *Spirulina platensis* on corneal neovascularization. *Molecular Vision* 15: 1951-1961.