

## RESEARCH ARTICLE

# Efektivitas Ekstrak *Spirulina platensis* sebagai Antiinflamasi terhadap Jumlah Neutrofil dan Makrofag pada Luka yang Diinfeksi *Staphylococcus aureus* pada Tikus Wistar

Olvaria Misfa<sup>1</sup>, Riski Dwi Utami<sup>2</sup>, Bimby Irenesia<sup>2</sup>, Deinike Wanita Marwan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Abdurrab, Pekanbaru

<sup>2</sup>Departemen Fisiologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Abdurrab, Pekanbaru

<sup>3</sup>Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Abdurrab, Pekanbaru

Korespondensi: Olvaria Misfa, Email: olvaria.misfa@univrab.ac.id

## Abstract

**Background:** The active compound of *Spirulina sp.* has anti-inflammatory and antibacterial property. The use of these contents plays a role in the inflammatory process in infected wounds.

**Objective:** To analyse the effectiveness of *Spirulina platensis* extract on the number of neutrophils and macrophages in the incision wound of Wistar rats infected by *S. aureus*.

**Methods:** This study used a randomized posttest-only control group design. Twenty-four male Wistar rats had their skin incised and infected with *S. aureus* were divided into 4 groups. The first group was given with the extract of *S. platensis* at a dose of 500 mg/kgBW/day, the second group was given a dose of 750 mg/kgBW/day, the negative control group was given saline solution, and the positive control group was given amoxicillin 150 mg/kg body weight orally. The number of neutrophils and macrophages was counted on histopathological examination of the wound tissue on day 14 which included 5 visual fields. Data analysis was carried out by one way ANOVA test and followed by LSD Post Hoc Test.

**Results:** The mean numbers of neutrophils on the 14th day in the group of a dose of 500 mg/kgBW/day, 750 mg/kgBW/day, positive control, and negative control were 17.83; 12.17; 5.17; and 8.83 with  $p < 0.001$ , respectively. The numbers of macrophages on the 14th day in the group of a dose of 500 mg/kgBW/day, 750 mg/kgBW/day, positive control, and negative control were 7.17; 10.83; 16.83; 15.83 with  $p < 0.002$ , respectively. The Post Hoc test exhibited that the neutrophil count in the group of 500 mg/kgBW/day was significantly higher than the other groups. Meanwhile, the Post Hoc test for the number of macrophages found a significant difference, only in the group of a dose of 500 mg/kgBW/day against the positive and negative control groups.

**Conclusion:** There was a significant decrease in the number of macrophages in the group of Wistar rats that were incised and infected with *Staphylococcus aureus* and given *Spirulina platensis* extract at a dose of 500mg/kgBW/day.

**Keywords:** wound, macrophages, neutrophils, *Spirulina platensis*

## Abstrak

**Latar belakang:** Kandungan senyawa aktif dari *Spirulina sp.* memiliki aktivitas antiinflamasi dan antibakteri. Penggunaan senyawa tersebut berperan dalam proses inflamasi pada luka yang terinfeksi.

**Tujuan:** Menganalisis efektivitas pemberian ekstrak *Spirulina platensis* terhadap jumlah neutrofil dan makrofag pada luka insisi tikus wistar yang diinfeksi *S. aureus*.

**Metode:** Penelitian ini menggunakan *randomized posttest only control group design*. Dua puluh empat ekor tikus wistar jantan diinsisi kulitnya dan diinfeksi *S.aureus* dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok yang diberi ekstrak *S.platensis* dosis 500 mg/kgBB/hari, dosis 750 mg/kgBB/hari, kelompok kontrol negatif diberi larutan saline serta kelompok kontrol positif dengan pemberian amoksisilin 150 mg/kgBB peroral. Jumlah neutrofil dan makrofag dihitung pada pemeriksaan histopatologis dari jaringan luka pada hari ke-14 yang mencakup 5 lapang pandang. Analisis data dilakukan dengan uji *one way ANOVA* dan dilanjutkan dengan *Post Hoc Test LSD*.

**Hasil:** Rerata jumlah neutrofil hari ke-14 pada kelompok dosis 500 mg/kgBB/hari, 750 mg/kgBB/hari, kontrol positif dan kontrol negatif adalah 17,83; 12,17; 5,17; dan 8,83 dengan  $p < 0,001$ . Jumlah makrofag hari ke-14 pada kelompok dosis 500 mg/kgBB/hari, 750 mg/kgBB/hari, kontrol positif dan kontrol negatif adalah 7,17; 10,83; 16,83; 15,83 dengan  $p < 0,002$ . Uji *Post Hoc* menemukan jumlah neutrofil pada kelompok dosis 500 mg/kgBB/hari secara signifikan lebih tinggi dibandingkan kelompok lainnya. Sementara, uji *Post Hoc* untuk jumlah makrofag menemukan perbedaan signifikan hanya pada kelompok dosis 500 mg/kgBB/hari terhadap kelompok kontrol positif dan kontrol negatif.

**Kesimpulan:** Pemberian ekstrak *Spirulina platensis* dosis 500mg/kgBB/hari secara signifikan meningkatkan jumlah neutrofil dan menurunkan jumlah makrofag pada luka insisi tikus wistar yang diinfeksi *Staphylococcus aureus*.

**Kata Kunci:** luka, makrofag, neutrofil, *Spirulina platensis*

## Pendahuluan

Luka merupakan kerusakan kontinuitas kulit, mukosa, dan tulang atau organ tubuh lain diakibatkan oleh kontak fisik maupun termal. Gangguan fungsi kulit sebagai organ pelindung dari patogen lingkungan dapat terganggu dengan timbulnya luka. Mikroorganisme patogen yang sering menimbulkan infeksi pada kulit akibat terjadinya luka adalah *Staphylococcus aureus*, dengan sebanyak 28,3% merupakan strain yang resisten terhadap methicillin.<sup>1-3</sup>

Penyembuhan luka melibatkan interaksi dari interaksi molekul sitokin, reaksi imunologis, dan reaksi seluler untuk memulihkan integritas struktural jaringan. Proses tersebut dibagi menjadi fase hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan *remodelling*. Infeksi *Staphylococcus aureus* menyebabkan peningkatan sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-1 dan IL-6 dan memperpanjang fase inflamasi. Penggunaan senyawa antimikrobia dapat membantu mengeliminasi agen patogen dan mempercepat penyembuhan.<sup>1</sup>

Penggunaan bahan herbal telah diketahui memiliki kandungan antibakteri. Beberapa ekstrak tumbuhan yang memiliki aktivitas antibakteri antara lain: rimpang jahe (*Zingiber officinale*), rimpang kunyit (*Curcuma domestica*), daun jambu biji (*Psidium guajava*), dan daun mint (*Mentha piperita L.*)<sup>4</sup> Penggunaan mikroalga juga telah diketahui memiliki kebermanfaatannya dalam melawan bakteri patogen maupun untuk membantu penyembuhan luka.<sup>6</sup> *Spirulina platensis* merupakan mikro alga hijau biru, yang memiliki kandungan antimikroba seperti triterpenoid, asam lemak, *phycocyanin*,  $\beta$ -*carotene*, *neophytadiene*, *heptadecane*, *1-hexadecene*, *docosane*, dan *1-octadecene*. Ekstrak *Spirulina platensis* pada konsentrasi 20.000 dan 30.000 ppm memberikan zona hambat yang baik pada bakteri gram positif, termasuk *Staphylococcus aureus*. Ekstrak metanol memiliki hambatan paling baik dibandingkan jenis ekstrak lainnya.<sup>5,6</sup> Aktivitas *Spirulina*

*platensis* terhadap sitokin proinflamasi telah menunjukkan kebermanfaatan dalam penurunan TNF- $\alpha$  pada luka.<sup>7</sup>

Rekrutmen neutrofil dan proses fagositosis oleh makrofag memegang peranan penting dalam eliminasi *Staphylococcus aureus*.<sup>8</sup> Penggunaan ekstrak *Spirulina platensis* pada tikus dapat mempengaruhi profil hematologi, termasuk persentase jumlah neutrofil dan monosit.<sup>9,10</sup> Eliminasi patogen dan penurunan sitokin proinflamasi oleh ekstrak *Spirulina platensis* diharapkan dapat mempengaruhi migrasi dari sel neutrofil dan sel makrofag pada proses penyembuhan luka.

## Metode

### Ekstrak *Spirulina platensis*

Ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini adalah *S. platensis powder* nomor registrasi FDA AS 15594742028 dan nomor CERES 50OGA1200043 (9241). *S. platensis powder* dimaserasi dalam larutan etanol 95% dengan konsentrasi 1:10 (satu bagian dari bubuk *S.platensis* dimaserasi dalam 10 bagian larutan etanol 95%). Proses maserasi dilakukan selama lima hari dalam wadah gelas. Kemudian diaduk setiap hari untuk memastikan keseragaman proses maserasi. Setelah lima hari, larutan disaring dengan kertas saring *Grade 1 Whatman* dan dievaporasi menggunakan mesin *rotary evaporator* pada suhu titik didih etanol sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak *S.platensis* ini digunakan sebagai bahan dalam tes selanjutnya yang dijelaskan lebih lanjut di bawah ini.

### Hewan Coba

Dua puluh empat ekor tikus *Wistar* jantan umur 2-3 bulan dengan berat badan 100-200 gram diaklimatisasi selama 7 hari. Hewan coba dibagi secara acak menjadi 4 kelompok dan diinsisi sepanjang 2 cm dengan kedalaman 0,25 cm serta diinfeksi bakteri *S. aureus*. Kelompok perlakuan I diberikan ekstrak *Spirulina platensis* per oral dosis 500 mg/kgBB, kelompok perlakuan II 750 mg/kgBB selama 14 hari yang diberikan 1 kali per

hari, kelompok kontrol negatif diberikan larutan salin 0,9%, dan kelompok kontrol positif diberikan amoksisilin 150 mg/kgBB peroral yang diberikan 1x/hari selama 14 hari.

**Prosedur Insisi**

Tikus dianestesi dengan ketamin 0,1 cc, kemudian bagian punggung tikus dicukur seluas 3 cm x 2,5 cm dan dibuat sayatan menggunakan scalpel sepanjang 2 cm dan kedalaman 0,25 cm Scalpel dipegang menggunakan handle pada tangan kanan dengan membentuk sudut 30-40° dengan kulit. Insisi dilakukan dengan menarik scalpel kearah kaudal. Luka diinfeksi dengan bakteri *S. aureus*, kemudian dibiarkan selama 36-48 jam sampai terjadinya infeksi luka yang ditandai dengan adanya pus (nanah).

**Jumlah Neutrofil**

Rerata jumlah neutrofil yang dihitung dari 5 lapang pandang melalui pemeriksaan biopsi jaringan hingga lapisan dermis kulit pada hari ke-14 menggunakan pengecatan haematoxylin eosin (HE) yang diamati menggunakan mikroskop cahaya binokuler dengan perbesaran 400x.

**Jumlah Makrofag**

Rerata jumlah makrofag yang dihitung dari 5 lapang pandang melalui pemeriksaan biopsi jaringan pada hari ke-14 menggunakan pengecatan haematoxylin eosin (HE) yang diamati menggunakan mikroskop cahaya binokuler dengan perbesaran 400x.

**Analisis Statistik**

Uji yang digunakan pada penelitian ini adalah uji *One Way Anova* untuk melihat adanya perbedaan jumlah makrofag dan neutrofil keempat kelompok perlakuan. Besarnya perbedaan pada masing – masing kelompok dilakukan analisis lebih lanjut menggunakan *Post Hoc Test LSD*. Nilai signifikansi pada penelitian ini adalah apabila variabel yang dianalisis memiliki nilai p <0,05. Semua analisis statistik yang dilakukan menggunakan program komputer SPSS 25.00.

**Hasil**

Seluruh sampel yang digunakan memiliki rata-rata berat badan yang hampir sama antar kelompok hingga hari ke-14. Tikus hidup sampai akhir penelitian serta diterminasi pada akhir penelitian.

Jumlah makrofag pada hari ke-14 paling sedikit didapatkan pada kelompok perlakuan pemberian ekstrak *S. platensis* dosis 500 mg/kgBB/hari. Perbedaan signifikan ditunjukkan oleh kelompok perlakuan pemberian ekstrak *S. platensis* 500 mg/kgBB/hari dibandingkan terhadap kelompok kontrol negatif dan kontrol positif. Sementara kelompok perlakuan pemberian ekstrak *S. platensis* dosis 750 mg/kgBB/hari tidak menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kelompok kontrol negatif maupun kontrol positif (Tabel 1).

**Tabel 1. Jumlah Makrofag Hari ke-14**

Kelompok	Mean	SD	Nilai p
Kontrol negatif	15,83	6,735	< 0,002
Kontrol positif	16,83	4,070	
Ekstrak <i>S.platensis</i> dosis 500 mg/kgBB	7,17	2,787	
Ekstrak <i>S.platensis</i> dosis 750 mg/kgBB	10,83	1,472	

Uji perbedaan terhadap jumlah neutrofil menunjukkan kelompok perlakuan ekstrak *S. platensis* dosis 500 mg/kgBB memiliki perbedaan yang signifikan baik terhadap kelompok perlakuan

ekstrak *S. platensis* dosis 750 mg/kgBB, kontrol negatif, dan kontrol positif. Kelompok perlakuan ekstrak *S. platensis* dosis 750 mg/kgBB menunjukkan perbedaan hanya menunjukkan perbedaan signifikan terhadap kelompok perlakuan kontrol positif (Tabel 2).

**Tabel 2. Jumlah Neutrofil Hari ke-14**

Kelompok	Mean	SD	Nilai p
Kontrol negatif	8,83	1,941	< 0,001
Kontrol positif	5,17	2,401	
Ekstrak <i>S.platensis</i> dosis 500 mg/kgBB	17,83	3,869	
Ekstrak <i>S.platensis</i> dosis 750 mg/kgBB	12,17	1,941	

**Pembahasan**

Proses penyembuhan luka merupakan proses yang kompleks yang terdiri dari tahap inflamasi, proliferasi, dan remodelling. Kontaminasi oleh bakteri pada luka dapat mengakibatkan terjadi pemanjangan fase inflamasi. Salah satu bakteri yang sering mengkontaminasi luka adalah *Staphylococcus aureus*.

Pemberian ekstrak *Spirulina platensis* pada luka insisi tikus yang terinfeksi *S. aureus* menunjukkan penurunan jumlah makrofag dan kenaikan neutrofil. Jumlah makrofag paling sedikit dan neutrofil paling tinggi ditemukan pada kelompok perlakuan pemberian ekstrak *S. platensis* dengan dosis 500 mg/kgBB/hari pada hari ke-14.

Studi oleh Bashir et al. menggunakan ekstrak *S. platensis* pada tikus sehat dan diabetes sebagai suplemen makanan, menemukan terjadi perubahan parameter hematologi pada sampel. Terdapat kecenderungan penurunan kadar neutrofil dan peningkatan kadar makrofag pada darah. Namun, efek pada hematologi tersebut baru tampak setelah hari ke-30. Lebih lanjut, studi tersebut menggunakan *S. platensis* dengan dosis 15,89 gram yang diberikan sebanyak 2 kali perhari.<sup>10</sup> Hasil yang sama juga ditunjukkan oleh Nasirian et al. Penggunaan ekstrak *S. platensis* pada dosis 30 mg/kgBB dan 15 mg/kgBB untuk tikus sehat dan diabet menemukan terjadinya penurunan neutrofil dan peningkatan jumlah makrofag.<sup>9</sup> Kedua studi hematologi tersebut, menggunakan dosis tersebut berbeda dibandingkan dengan dosis pada studi ini serta pengambilan data pada studi kami dilakukan lebih awal, yaitu pada hari ke-14.

Studi uji aktivitas antibakterial ekstrak etanol 70% dari *S. platensis* yang didapatkan dari Jepara tidak menunjukkan aktivitas bakteri terhadap *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 10.000 ppm.<sup>11</sup> Sementara, studi oleh Elshouny et.al menunjukkan penggunaan ekstrak *S. platensis* yang memberikan efek antibakterial adalah dengan pelarut metanol.<sup>12</sup> Studi oleh Bellachen et. al juga menggunakan campuran pelarut yang mengandung metanol untuk melakukan ekstraksi *S. platensis* yang kemudian ditemukan memiliki kemampuan antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.<sup>6</sup> Pengamatan oleh Hidayati et.al menemukan ekstrak etil asetat memiliki aktivitas antibakteri yang lebih baik dibandingkan ekstrak etanol terhadap bakteri gram positif.<sup>5</sup> Penggunaan jenis pelarut dalam metode ekstraksi *S. platensis* dimungkinkan memiliki pengaruh terhadap hasil pada studi.

Kandungan senyawa aktif dari *S. platensis* dipengaruhi oleh lingkungan hidup dan lama budidaya. Studi oleh Widawati menemukan bahwa perbedaan kadar salin dapat mempengaruhi

kandungan klorofil, fikosianin, fikoeritrin dan allofikosianin pada *S. platensis*.<sup>13</sup> Cemaran air budidaya dengan limbah dapat menurunkan kandungan fikosianin pada *S. platensis*.<sup>14</sup> Terdapatnya kalsium nitrat pada media pertumbuhan *S. platensis* dapat meningkatkan kadar klorofil, karotenoid, dan protein.<sup>15</sup> Pengaruh paparan cahaya merah serta intensitas cahaya ditemukan memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan *S. platensis*.<sup>16</sup> Kandungan fikosianin pada hari budidaya ke-12 secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dari hari ke-6, ke-14, dan ke-17.<sup>17</sup> Penentuan asal bahan baku *S. platensis* dimungkinkan dapat mempengaruhi kadar zat aktif pada ekstrak.

Kehadiran neutrofil dan makrofag lebih dari 7 hari menandakan pemanjangan fase inflamasi dan meningkatkan kecenderungan terjadinya luka kronis.<sup>7</sup> Kehadiran sel tersebut dalam upaya eliminasi *Staphylococcus aureus* oleh makrofag dan neutrofil terjadi dengan dimulainya proses rekrutmen yang dimediasi dengan sitokin proinflamasi seperti IL-1, IL-6, dan faktor kemokin CXCL. Peran serta kekebalan seluler dari sel Th-17 berfungsi untuk memproduksi neutrofil melalui IL-17.<sup>18</sup> Studi Elbially et. al menggunakan ekstrak *S. platensis* pada model luka tikus menemukan penurunan ekspresi CXCL yang dimediasi oleh bFGF.<sup>18</sup> Studi oleh Pham et. al juga menemukan penurunan ekspresi sitokin pro-inflamasi IL-1 pada pemberian ekstrak *S. platensis*.<sup>19</sup> Hambatan produksi IL-17 juga ditemukan melalui hambatan jalur TLR-4 pada pemberian ekstrak *S. platensis*.<sup>20</sup> Studi ini tidak melakukan pengamatan terhadap sitokin pro-inflamasi. Analisis terhadap penanda inflamasi mungkin diperlukan untuk mengonfirmasi adanya perpanjangan fase inflamasi pada proses penyembuhan luka.

Hasil studi kami menemukan perbedaan efek *S. platensis* terhadap kadar neutrofil dan makrofag dengan studi yang telah ada sebelumnya. Studi oleh Riski menggunakan model luka insisi pada tikus menemukan bahwa pemberian ekstrak *S. platensis* pada dosis 750 mg/kgBB/hari dapat meningkatkan jumlah makrofag dan menurunkan jumlah neutrofil. Efek tersebut disertai dengan penurunan serial hingga hari ke-14 pada sitokin proinflamasi TNF- $\alpha$ . Penurunan produksi sitokin proinflamasi diduga akibat kandungan fikosianin dari *S. platensis*.<sup>7</sup> Adanya infeksi pada luka dapat mempengaruhi proses penyembuhan dengan peningkatan reaksi inflamasi. Studi lebih lanjut diperlukan untuk mengonfirmasi efek *S. platensis* terhadap penyembuhan luka yang mengalami infeksi.

Studi oleh Gover et. al menemukan kadar dari fikosianin yang dapat secara signifikan menurunkan kadar TNF- $\alpha$  pada tikus adalah 500mg/KgBB. Sementara, kadar fikosianin hingga 1.000 mg/kgBB belum menunjukkan efek pada kadar IL-1.<sup>21</sup> Penurunan jumlah makrofag secara signifikan pada studi ini tampak pada pemberian ekstrak *S. platensis* dosis 500 mg/kgBB. Studi menggunakan dosis lebih besar dan menggunakan parameter dosis fikosianin atau pengujian kandungan fikosianin dari ekstrak yang digunakan diperlukan untuk mengamati kebermanfaatan ekstrak *S. platensis*.

Studi kami menemukan efek pemberian ekstrak *S. platensis* yang berbeda dari penelitian sebelumnya. Standarisasi bahan baku, metode ekstraksi, analisis kandungan pada ekstrak, dan dosis yang lebih tinggi dari *S. platensis* diperlukan untuk mendapatkan

kandungan bahan aktif dan keluaran yang optimal. Konfirmasi tampilan klinis, histopatologis, dan imunohistokimia maupun laboratorium diperlukan untuk mengetahui fase penyembuhan luka.

### Kesimpulan

Pemberian ekstrak *Spirulina platensis* pada tikus dengan luka insisi yang diinfeksi *S. aureus* dengan dosis 500 mg/kgBB/hari maupun dosis 750 mg/kgBB/hari dapat meningkatkan jumlah neutrofil dan menurunkan jumlah makrofag dibandingkan dengan kelompok yang diberikan larutan saline 0,9% dan kelompok yang diberikan amoksisilin 150 mg/kgBB peroral. Efek penurunan makrofag dan peningkatan neutrofil terbesar terjadi pada penggunaan ekstrak *Spirulina platensis* dengan dosis 500 mg/kgBB/hari.

### Daftar Pustaka

1. Miller LS, Cho JS. Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(8):505–18.
2. Raziyeva K, Kim Y, Zharkinbekov Z, Kassymbek K, Jimi S, Saparov A. Immunology of acute and chronic wound healing. *Biomolecules*. 2021;11(5):1–25.
3. Tsige Y, Tadesse S, G/Eyesus T, Tefera MM, Amsalu A, Menberu MA, et al. Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Associated Risk Factors among Patients with Wound Infection at Referral Hospital, Northeast Ethiopia. *J Pathog*. 2020;2020:1–7.
4. Dewi DATM. Uji Daya Hambat Tanaman Herbal Berpotensi sebagai Antimikroba Alami. *J Bioshell*. 2021;10(2):66–9.
5. Hidayati N, Agustini NWS, Apriastini M, Diaudin DPA. Bioactive Compounds from Microalgae *Spirulina platensis* as Antibacterial Candidates Against Pathogen Bacteria. *J Kim Sains dan Apl*. 2022;25(2):41–8.
6. Ould Bellahcen T, Cherki M, Sánchez JAC, Cherif A, EL Amrani A. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Spirulina platensis* from Morocco. *J Essent Oil-Bearing Plants*. 2019;22(5):1265–76.
7. Utami RD, Kristina TN, Yuniati R. *Spirulina platensis* Extract Reduces Serum TNF- $\alpha$ , Neutrophils, and Increases Macrophage Count in Skin Incisional Mice Model. *Indones J Environ Manag Sustain*. 2020;4(2).
8. Pidwill GR, Gibson JF, Cole J, Renshaw SA, Foster SJ. The Role of Macrophages in *Staphylococcus aureus* Infection. *Front Immunol*. 2021;11(January):1–30.
9. Nasirian F, Mesbahzadeh B, Maleki SA, Mogharnasi M, Kor NM. The effects of oral supplementation of spirulina platensis microalgae on hematological parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Transl Res*. 2017;9(12):5238–44.
10. Bashir S, Sharif MK, Javed MS, Amjad A, Khan AA, Shah FUH, et al. Safety assessment of spirulina platensis through sprague dawley rats modeling. *Food Sci Technol*. 2020;40(2):376–81.
11. Pannindrya P, Safithri M, Tarman K. Antibacterial Activity of Ethanol Extract of *Spirulina platensis*. *Curr Biochem*. 2021;7(2):47–51.
12. Elshouny WAEF, El-Sheekh MM, Sabae SZ, Khalil MA, Badr HM. Antimicrobial activity of *Spirulina platensis* against aquatic bacterial isolates. *J Microbiol Biotechnol Food Sci*. 2017;6(5):1203–8.
13. Widawati D, Santosa GW, Yudiati E. Pengaruh Pertumbuhan *Spirulina platensis* terhadap Kandungan Pigmen beda Salinitas. *J Mar Res*. 2022;11(1):61–70.
14. Siska R. Kandungan Klorofil, Fikosianin, dan Flavonoid Ekstrak *Spirulina platensis* yang Dikultur di Media Teknis dan Media Limbah Air Kolam Budidaya Lele. Universitas Sriwijaya; 2020.
15. Fakhri M, Antika PW, Ekawati AW, Arifin NB. Pertumbuhan, Kandungan Pigmen, dan Protein *Spirulina platensis* yang Dikultur pada  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  dengan Dosis yang Berbeda. *J Aquac Fish Heal*. 2020;9(1):38–47.

16. Firdaus M, Fauzan A. Produksi dan Kandungan Nutrisi Spirulina Fusiformis yang Dikultur dengan Pencahayaan Monokromatis Light Emitting Diodes (LEDs). *J Ris Akuakultur*. 2015;10(2):211.
17. Setyaningsih I, Tarman K, Satyantini WH, Barus DA. Pengaruh Waktu Panen dan Nutrisi Media Terhadap Biopigmen. *Jphpi*. 2014;16(3):191–8.
18. Elbialy ZI, Assar DH, Abdelnaby A, Asa SA, Abdelhiee EY, Ibrahim SS, et al. Healing potential of *Spirulina platensis* for skin wounds by modulating bFGF, VEGF, TGF- $\beta$ 1 and  $\alpha$ -SMA genes expression targeting angiogenesis and scar tissue formation in the rat model. *Biomed Pharmacother*. 2021;137(January):111349.
19. Pham TX, Park YK, Lee JY. Anti-inflammatory effects of spirulina platensis extract via the modulation of histone deacetylases. *Nutrients*. 2016;8(6):1–12.
20. Okuyama H, Tominaga A, Fukuoka S, Taguchi T, Kusumoto Y, Ono S. Spirulina lipopolysaccharides inhibit tumor growth in a Toll-like receptor 4-dependent manner by altering the cytokine milieu from interleukin-17/interleukin-23 to interferon- $\gamma$ . *Oncol Rep*. 2017;37(2):684–94.
21. Grover P, Bhatnagar A, Kumari N, Narayan Bhatt A, Kumar Nishad D, Purkayastha J. C-Phycocyanin-a novel protein from *Spirulina platensis*- In vivo toxicity, antioxidant and immunomodulatory studies. *Saudi J Biol Sci*. 2021;28(3):1853–9.