

PENGARUH IMUNOMODULASI DARI EKSTRAK *CAULERPA LENTILLIFERA* PADA PROFIL HEMATOLOGI BALB/c

Renanda Baghaz Dzulhamdhani Surya Putra^{1*}, Ayu Winna Ramadhani¹, Asus
Maizar Suryanto Hertika²

¹Program Studi PSDKU Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas
Brawijaya

²Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Universitas Brawijaya

*Email : renandabaghaz@ub.ac.id

ABSTRACT

Caulerpa lentillifera is widely known to have pharmacological benefits based on a variety of research findings. The study aims to analyze the potential immunostimulant extract of ethanol *Caulerpa lentillifera* in blood profiles *in vivo*. The methods carried out included extraction of *Caulerpa lentillifera* ethanol, observation of the hematological profile of erythrocytes, leukocytes, and micronucleus, and phagocytosis activity in the Balb/c scavengers administered orally with a dose of 25, 50, 100, 150 mg/kg BW for one week. The results obtained that *Caulerpa lentillifera* ethanol extract showed a significant increase in the number of leukocytes at each treatment dose. The number of erythrocytes also increased but did not show any significance. The activity of phagocytosis also showed a significant increase with the highest percentage of the treatment dose of 100 mg/kg BW. The results of the micronuclei analysis showed no difference. Based on the results of this study showed an increase in the number of erythrocytes leukocytes as well as phagocytosis indicating the occurrence of an increased immune system. It can be concluded that *Caulerpa lentillifera* is also able to boost the immune system or as an immunostimulant through increased blood profile as well as phagocytosis activity *in vivo*.

Keywords: *Caulerpa lentillifera*, Erythrocyte, Leukocyte, Micronuclei, Phagocytosis

ABSTRAK

Caulerpa lentillifera diketahui memiliki manfaat farmakologis berdasarkan berbagai temuan penelitian. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis potensi ekstrak imunostimulan etanol *Caulerpa lentillifera* dalam profil darah *in vivo*. Metode yang dilakukan termasuk ekstraksi *Caulerpa lentillifera* etanol, pengamatan profil hematologi eritrosit, leukosit dan aktivitas mikronukleus dan phagocytosis pada balb/c yang diberikan secara oral dengan dosis 25, 50, 100, 150 mg/kg BW selama satu minggu. Hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak etanol *Caulerpa lentillifera* menunjukkan peningkatan signifikan dalam jumlah leukosit pada setiap dosis pengobatan. Jumlah eritrosit juga

meningkat tetapi tidak menunjukkan signifikansi apa pun. Aktivitas fagositosis juga menunjukkan peningkatan yang signifikan dengan persentase tertinggi dari dosis pengobatan 100 mg / kg BW. Hasil analisis mikronukleus tidak menunjukkan perbedaan. Berdasarkan hasil penelitian ini menunjukkan peningkatan jumlah leukosit eritrosit dan phagocytosis menunjukkan adanya peningkatan sistem kekebalan tubuh. Dapat disimpulkan bahwa *Caulerpa lentillifera* juga mampu meningkatkan sistem kekebalan tubuh atau sebagai imunostimulan melalui peningkatan profil darah serta aktivitas fagositosis in vivo.

Kata Kunci: *Caulerpa lentillifera*, Eritrosit, Leukosit, Mikronuklei, Fagositosis

PENDAHULUAN

Rumput laut *Caulerpa lentillifera green alga* mengandung senyawa bioaktif telah dievaluasi potensinya sebagai bahan fungsional bagi kesehatan manusia (Wynants *et al.*, 2020). Saat ini, penerapan rumput laut telah pesat untuk dilakukan riset dalam menemukan dan mengembangkan agen terapeutik baru (Piccininni *et al.*, 2020). *Caulerpa lentillifera* merupakan salah satu dari rumput laut *green alga* yang banyak tumbuh dan dibudidayakan di perairan Indonesia (Mao *et al.*, 2020). Telah dilaporkan bahwa *Caulerpa lentillifera* ini menunjukkan beberapa sifat farmakologis, seperti imunomodulator, antimikroba, antidiabetes, antijamur dan antikanker (Ji *et al.*, 2020; Holman *et al.*, 2020; Grasselli *et al.*, 2020; Goyal *et al.*, 2020). *Caulerpa lentillifera* juga memiliki aktivitas antioksidan yang kuat karena senyawa fenoliknya (Pive *et al.*, 2020). Beberapa senyawa bioaktif juga telah diisolasi dari rumput laut (*green alga*) ini, seperti clionasterol, 1,4 -glucan dan 1,3- β -glucan (Myers *et al.*, 2020). β -glucans menunjukkan potensi untuk mengobati beberapa penyakit dan diakui sebagai stimulator imunologis yang kuat pada manusia.

Sistem kekebalan terlibat dalam etiologi dan patologi banyak penyakit. Modulasi respon imun meningkatkan pengendalian penyakit. Sistem imun (kekebalan) berhubungan dengan leukosit. Leukosit merupakan bagian dari sistem imun yang memiliki peran penting dalam setiap agen penyebab penyakit. Fungsi utama leukosit adalah menghancurkan bahan infeksius dan toksik melalui proses fagositosis dan membentuk antibodi (Lubis *et al.*, 2016). Dalam literatur klasik, eritrosit telah lama digunakan sebagai pengangkut oksigen. Namun, semakin banyak bukti menunjukkan bahwa sel-sel ini juga memainkan peran penting dalam sistem kekebalan bawaan (Hotz *et al.*, 2017). dengan demikian mengatur dan memodulasi respons imun. Komponen internal eritrosit seperti hemoglobin dan heme juga merupakan wajah tangguh dari imunitas bawaan, mampu menghasilkan spesies oksigen reaktif antimikroba (ROS) untuk bertahan melawan serangan mikroba hemolitik, serta mempromosikan respons inflamasi patologis dan auto-imun (Anderson *et al.*, 2018). Salah satu sifat imunomodulator penting dari eritrosit manusia adalah kecenderungannya untuk mengikat berbagai macam kemokin.

Pada penelitian ini akan menguji kemampuan imunomodulasi *Caulerpa lentillifera* secara in vivo terhadap balb/c. Selanjutnya Induksi ekstrak ethanol *Caulerpa lentillifera* yang telah diberikan selama satu minggu dilakukan

pengamatan terhadap gambaran darah sebagai respon imun Sehingga diharapkan hasil dari penelitian ini dapat mengetahui pengaruh immunomodulasi dari *Caulerpa lentillifera* terhadap gambaran darah sebagai respon imun.

METODE PENELITIAN

Ekstraksi Rumput laut *Caulerpa lentillifera*

Penelitian ini dilakukan dari Juli 2022 hingga Desember 2022. Semua kegiatan penelitian dilakukan di laboratorium Biosciences Institute, Brawijaya University, Malang. Seaweed (*Caulerpa lentillifera*) diperoleh dari Jepara, Jawa Timur, Indonesia (seaweed cultivation). Selanjutnya, itu dikeringkan di oven udara panas pada 50 °C dan direndam menjadi bubuk dan difilter dengan ukuran filter > 80 mesh. Serbuk rumput laut disiramkan selama 4 hari dengan etanol, kemudian difilter dan larutan dihilangkan menggunakan evaporator rotasi.

Induksi Ekstrak *Caulerpa lentillifera*

Balb/c tikus berusia 6 bulan hingga 10 bulan ditempatkan di fasilitas yang bersih dan bebas patogen di fasilitas perawatan hewan laboratorium sentral ilmu hayati Universitas Brawijaya. Selanjutnya, diinduksi Etanol extract of *Caulerpa lentillifera* dengan konsentrasi masing-masing (25, 50, 100 dan 150 mg/kg BW) melalui oral.

Setelah pemaparan, secara singkat setelah induksi selama 1 minggu darah diambil melalui jantung dengan spuit telah dibilas dengan EDTA lalu darah dimasukkan pada eppendorf 1,5 ml yang telah dibilas dengan EDTA. Selanjutnya darah masing-masing perlakukan dianalisis Eritrosit, Leukosit, mikronuklei dan fagositosis.

Eritrosit

Menurut Nemzek et al (2001) perhitungan sel darah merah atau eritrosit dilakukan dengan cara mengambil sampel darah dari tabung eppendorf dengan menggunakan pipet thoma eritrosit berupa kapiler dengan batu kecil di dalamnya berwarna merah hingga garis menunjukkan 0,5 ml. Selanjutnya ditambah dengan larutan hayem hingga larutan mencapai 101 ml. Setelah itu larutan dihomogenkan dengan cara menggoyangkannya dengan bentuk angka delapan. Darah dibuang dua tetes untuk membuang gelembung udara, lalu ditetaskan pada kamar hitung yang ditutup dengan cover glass. Selanjutnya diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 10 x 10 dengan 5 lapang pandang di kotak kecil pada kamar hitung *hemocytometer* dan dilakukan perhitungan dengan

$$\text{Total erythrocyte} = n \times 10^4 \text{ cell/mm}^3$$

Leukosit

Menurut Nemzek et al (2001), prosedur pengamatan dan penghitungan jumlah sel darah putih dilakukan dengan dihisap dengan pipet thoma leukosit. penghitungan sel darah putih atau leukosit dilakukan dengan cara pengambilan sampel darah dan tabung eppendoif dengan menggunakan alat hisap eritrosit berupa kapiler dengan barn kecil di dalamnya berwarna merah hingga garis

menunjukkan 0,5 ml. Selanjutnya larutan hayem ditambahkan hingga larutan mencapai 101 ml. Setelah itu larutan yang ada dalam alat hisap berupa pipa kapiler dihomogenkan dengan cara menggoyangkannya dengan bentuk angka delapan. Darah dituang dua tetes untuk membuang gelembung udara. Darah diteteskan pada hemacytometer, dan ditutup dengan *cover glass*. Kemudian darah diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 40 dengan 4 lapang pandang di kotak besar pada kamar hitung hemocytometer dan dilakukan penghitungan dengan Total leukocyte $= n \times 50 \text{ cell/mm}^3$

Mikronuklei

Menurut Hussain *et al.* (2017), pada pengamatan mikronuklei (MN) dapat dilakukan dengan cara mengamati sel darah merah. Darah diambil dan dioleskan pada preparat dan didiamkan selama 5 menit dan dilakukan pewarnaan menggunakan giemsa 10% lalu didiamkan selama 30 menit. Preparat yang sudah siap selanjutnya diamati dibawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 1200x. Kemudian dihitung eritrosit dan mikronuklei (MN) yang diamati dan dilakukan skoring. Menurut Luzhna *et al.* (2013), rumus frekuensi mikronuklei adalah sebagai berikut:

$$MN = \frac{\text{Total micronuclei cell}}{\text{total cell}} \times 1000$$

Fagositosis

Untuk mengukur aktivitas fagositosis, pertama-tama sampel darah sebanyak 50 µl dimasukkan ke dalam tabung eppendorf steril dan ditambahkan 50 µl suspensi sel ragi roti. selanjutnya dihomogenkan dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 20 menit. Selanjutnya 5 µl sampel campuran darah dan ragi roti diamati dengan menggunakan kaca preparat dengan ukuran 1 - 1,2 mm dengan pewarnaan giemsa. Proses pewarnaan sediaan ulas dengan Giemsa dikerjakan sesuai dengan prosedur (Pritchard and Kruse, 1982): Aktifitas fagositosis dinyatakan dengan jumlah sel yang memfagosit/100 sel fagosit yang diamati dikali 100% (Wulansari, 2009).

Analisis Data

Data dianalisis menggunakan perangkat lunak SPSS (IBM statistics v.20) dan data analisis secara statistik menggunakan satu cara program ANOVA dan evaluasi media dilakukan menggunakan tes LSD (*least significance difference*) dengan 3 pengulangan.

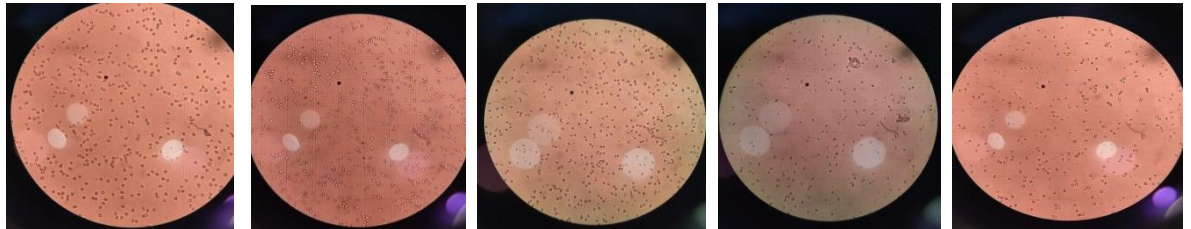
HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Hematologi

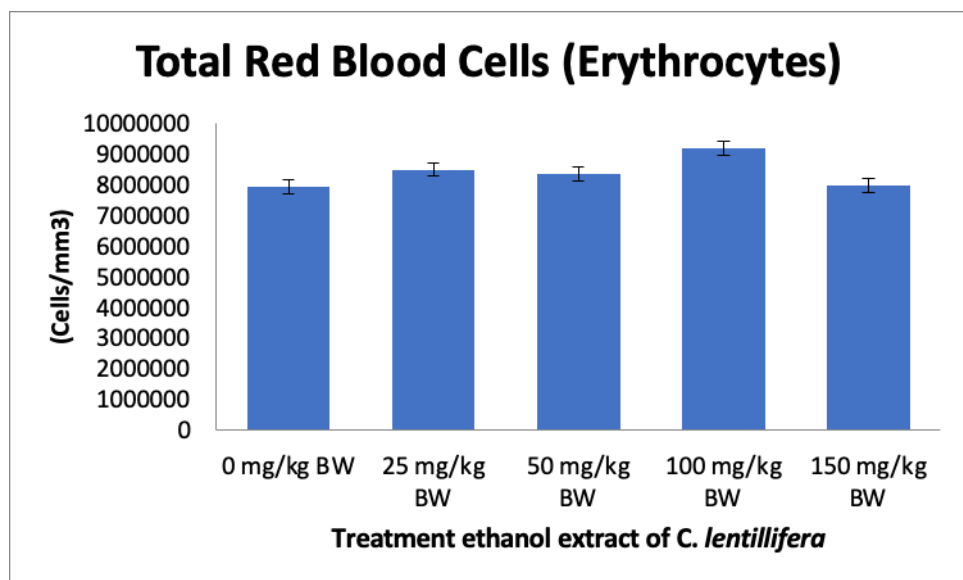
Eritrosit

Berdasarkan pengamatan yang telah dilakukan terhadap kondisi sel darah pada mencit balb/c masing-masing perlakuan dosis dari ekstrak etanol *Caulerpa lentillifera* diperoleh hasil rata-rata jumlah sel darah merah (sel/mm³) sebagai berikut (Gambar 1)

A.



B.



Gambar 1. Hasil pengaruh ekstraksi etanol *Caulerpa lentillifera* terhadap sel darah merah eritrosit. A morfologi sel darah merah eritrosit; B Total sel darah merah eritrosit.

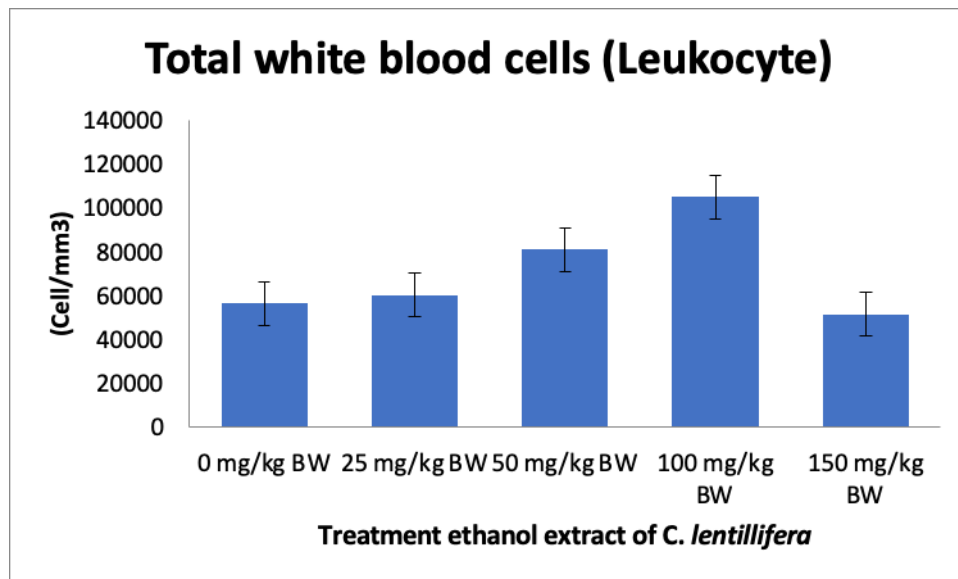
Total sel darah merah yang berhasil didapatkan yakni sebesar 7×10^6 – $9,19 \times 10^6$ sel/mm³. Secara keseluruhan terjadi ekstrak etanol dari *Caulerpa lentillifera* menstimulus peningkatan total sel darah merah eritrosit apabila dibandingkan dengan kontrol. Hasil tertinggi didapatkan pada perlakuan dosis 100 mg/kg BW dengan sebesar rata-rata 9190000 sel/mm³. Sebaliknya, rata-rata total sel darah merah terendah didapatkan pada dosis perlakuan kontrol. Sel darah merah memainkan peran penting dalam mendukung metabolisme jaringan. Sel darah merah yang efisien diperlukan untuk mempertahankan oksigenasi jaringan dan keseimbangan asam-basa (Gao, et al., 2019).

Sel darah merah mampu berinteraksi dan berkomunikasi dengan sel endotel, trombosit, dan makrofag. Selain itu, mereka terlibat dalam pemeliharaan trombusis dan hemostasis dan memainkan peran penting dalam respon imun (Pretini, et al., 2019). Meningkatnya sel darah merah juga bertanggung jawab

untuk transportasi oksigen dalam sel Th2 tubuh manusia yang terlibat dalam sel-sel imun macrophages. Apabila terjadi ketidakseimbangan Th1/Th2 berkaitan dengan terjadinya berbagai penyakit (Huang et al., 2020)

Leukosit

Berdasarkan pengamatan yang telah dilakukan terhadap kondisi total sel darah putih atau leukosit pada mencit balb/c masing-masing perlakuan dosis dari ekstrak etanol *Caulerpa lentillifera* diperoleh hasil rata-rata jumlah sel darah putih (sel/mm³) sebagai berikut (Gambar 2).

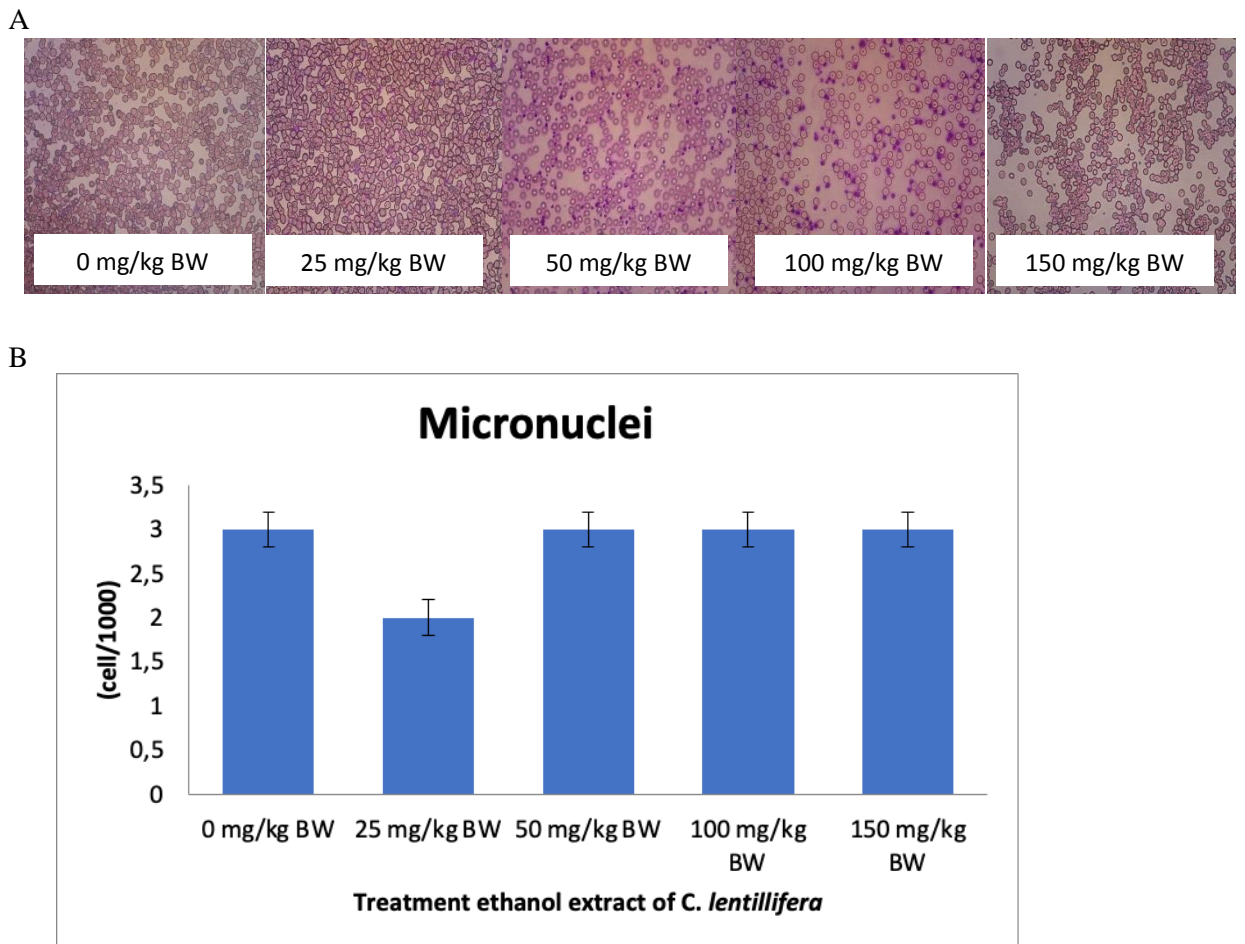


Gambar 2. Hasil pengaruh ekstraksi etanol *Caulerpa lentillifera* terhadap sel darah putih leukosit

Total sel darah putih yang berhasil didapatkan yakni sebesar 51563 – 105210 sel/mm³. Secara keseluruhan, ekstrak etanol dari *Caulerpa lentillifera* menstimulus peningkatan total sel darah putih pada dosis 25, 50, 100 mg/kg BW apabila dibandingkan dengan kontrol. Sel darah putih leukosit telah diamati meningkat signifikan tertinggi didapatkan pada perlakuan dosis 100 mg/kg BW dengan sebesar rata-rata 105210 sel/mm³. Hal yang menarik peningkatan jumlah sel darah putih ini tidak terjadi pada dosis 150 mg/kg BW. Pada dosis tersebut terjadi penurunan dengan rata-rata sebesar 51563 sel/mm³. Hal ini berkaitan dengan hasil analisis FTIR ekstrak *Caulerpa* yang termasuk kategori fenol yang memiliki aktivitas imunostimulan sehingga aktif dalam respon imun terhadap organisme mikroba dan zat asing (Koupenova et al., 2018; Gurven et al., 2020).

Mikronuklei

Berdasarkan pengamatan yang telah dilakukan terhadap kondisi mikronuklei pada mencit balb/c masing-masing perlakuan dosis dari ekstrak etanol *Caulerpa lentillifera* diperoleh hasil rata-rata jumlah mikronuklei (sel/mm³) sebagai berikut (Gambar 3)



Gambar 3. Hasil pengaruh ekstraksi etanol *Caulerpa lentillifera* terhadap mikronuklei. A morfologi mikronuklei; B Total mikronuklei.

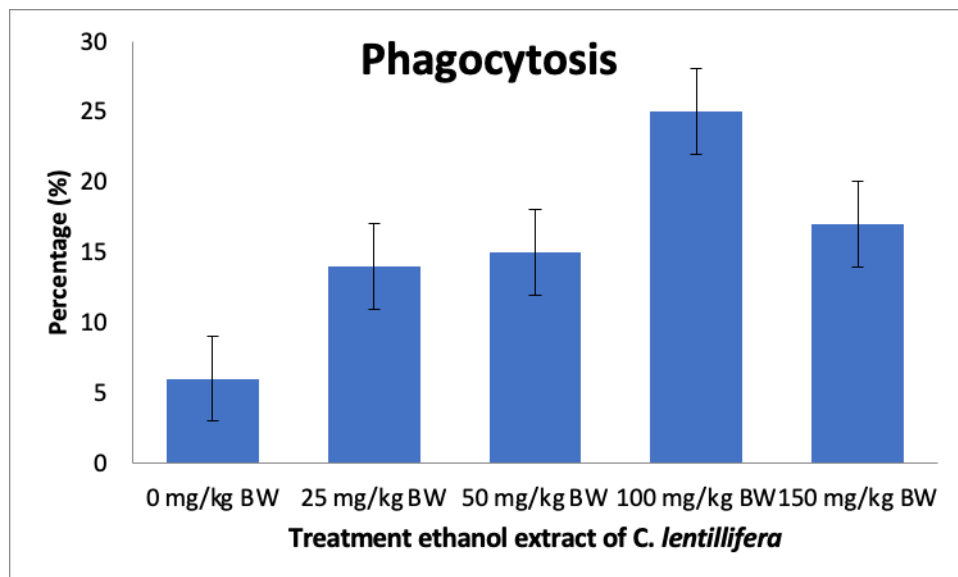
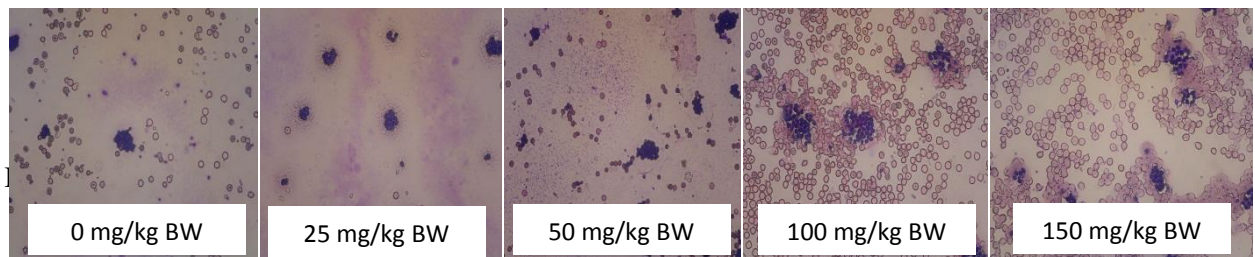
Pada analisis mikronuklei ini bertujuan untuk mengamati dan skrining pengaruh dari ekstrak etanol *Caulerpa lentillifera* ini dari potensi mampu menyebabkan gangguan toksikologi sitogenetik dalam darah. Pada hasil analisis secara keseluruhan menunjukkan tidak ada signifikansi perubahan baik peningkatan maupun penurunan jumlah mikronuklei. Total mikronuklei dari masing-masing dosis perlakuan didapatkan rata-rata bekisar 3-5 sel/mm³. Pada morfologi juga sangat sedikit sekali untuk didapatkan terjadinya mikronuklei. Hal tersebut pada studi ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol dari *Caulerpa lentillifera* tidak memiliki pengaruh toksik terhadap sitogenetik dari dosis 25-150 mg/kg BW.

Mikronuklei adalah segmen ekstra inti kromatin yang dapat timbul sebagai akibat dari putusnya untai ganda DNA atau disfungsi aparatus gelendong mitosis. Mikronuklei jarang terbentuk selama mitosis sel sehat, dan dapat berupa fragmen kromosom asentrik atau seluruh kromosom yang gagal digabungkan ke dalam nukleus pada penyelesaian mitosis (Fenech, et al., 2011). Mikonuklei dapat disebabkan oleh akibat akumulasi kerusakan DNA dan aberasi kromosom. Berbagai agen genotoksik dapat menginduksi pembentukan Mikronuklei yang menyebabkan kematian sel, ketidakstabilan genom, atau perkembangan kanker. mekanisme genetik dan epigenetik pembentukan Mikronuklei setelah berbagai efek *clastogenic* dan *aneugenic* pada pembelahan sel dan siklus sel (Luzhna et al., 2013).

Fagositosis

Setelah perlakuan darah yang telah didapatkan selanjutnya dilakukan analisis fagositosis. Hasil analisis fagositosis masing-masing perlakuan dapat dilihat dibawah ini (Gambar 4).

A



Gambar 4. Hasil pengaruh ekstraksi etanol *Caulerpa lentillifera* terhadap mikronuklei. A morfologi Fagositosis (biru adalah ragi); B Total prosentase aktivitas fagositosis.

Pada analisis aktivitas fagositosis tampak terdapat ragi (ditandai dengan warna biru) yang dimakan oleh sel darah (Gambar 4A). Pada gambar tersebut

menunjukkan bahwasanya peningkatan fagositosis (ditandai dengan ragi yang dimakan darah) terjadi dengan semakin tingginya dosis. Hal tersebut telah dikonfirmasi pada grafik aktivitas fagositosis (Gambar 4B). Pada grafik menunjukkan aktivitas fagositosis meningkat secara signifikan dengan jumlah fagositosis pada dosis ekstrak etanol *Caulerpa lentillifera* dosis 100 mg/kg BW jika dibandingkan dengan kontrol. Hal yang menarik pada dosis 150 mg/kg BW terjadi penurunan aktivitas fagositosis. Diduga dikarenakan adanya homeostasis pada sel.

Peningkatan aktivitas fagositosis oleh *Caulerpa lentillifera* juga telah dilaporkan oleh Fajriah et al. (2020) secara *in vitro* yakni terdapat aktivitas fagositosis sel macrophages RAW 264,7 yang diberikan perlakuan ekstrak *Caulerpa lentillifera* menggunakan uji fagositosis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa beberapa sel RAW 264,7 dengan perlakuan LPS, Beta-glukan dan ekstrak *Caulerpa lentillifera* diduga melakukan pembentukan sel raksasa sebagai hasil aktivitas fagositosis. Secara keseluruhan pada hasil penelitian tersebut dapat dilihat bahwa ekstrak air dari *Caulerpa lentillifera* mampu meningkatkan aktivitas fagositosis sebagai salah satu indikator imunostimulan.

Telah diketahui bahwa *Caulerpa lentillifera* memiliki beberapa obat sifat termasuk modulasi sel imun. Dalam studi ini, sel kultur RAW 264,7 dipilih untuk menilai efek imunomodulator dari ekstrak *Caulerpa lentillifera*. Fagositosis adalah fungsi dasar sel imun untuk menghilangkan bahan asing termasuk pathogen (Septama, et al., 2018).

PENUTUP

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwasanya didapatkan temuan yang menunjukkan rumput laut, *Caulerpa lentillifera* merupakan jenis rumput laut yang memiliki aktivitas immunomodulasi melalui peningkatan profil hematology dan fagositosis sebagai respon imun secara *in vivo*. Dengan dosis 100 mg/kg BW dapat dijadikan rekomendasi dalam efek peningkatan sistem imun.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, H. L., Brodsky, I. E., & Mangalmurti, N. S. 2018. The evolving erythrocyte: red blood cells as modulators of innate immunity. *The Journal of Immunology*, 201(5), 1343-1351.
- Darbonne WC, Rice GC, Mohler MA, Apple T, Hbert CA, Valente AJ, Baker JB. 1991. Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. *Journal of Clinical Investigation.*; 88:1362–1369. [PubMed: 1918386]
- Fajriah, S., Handayani, S., Sinurat, E., Megawati, M., Darmawan, A., Hariyanti, H., ... & Septama, A. W. 2020. *In vitro* Immunomodulatory Effect from Edible Green Seaweed of *Caulerpa lentillifera* Extracts on Nitric Oxide

- Production and Phagocytosis Activity of RAW 264.7 Murine Macrophage Cells. *Journal of Young Pharmacists*, 12(4), 334.
- Fenech M. 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*. 26:125–32.
- Gao, H. Qu, Z. Gao, D. Zeng, J. Wang, D. Baranenko, Y. Li and W. Lu, 2019. Protective effects of *Ulva pertusa* polysaccharide and polysaccharide-iron(III) complex on cyclophosphamide induced immunosuppression in mice, *Int. J. Biol. Macromol.* 133, 911–919.
- Goyal, P. 2020. Clinical characteristics of Covid-19 in New York City. *N. Engl. J. Med.* 382, 2372–2374.
- Grasselli, G. 2020. Baseline characteristics and outcomes of 1591 patients infected with SARS-CoV-2 admitted to ICUs of the Lombardy region, Italy. *JAMA* 323, 1574–1581.
- Gurven, T. S. Kraft, S. Alami, J. C. Adrian, E. C. Linares, D. Cummings, D. E. Rodriguez, P. L. Hooper, A. V. Jaeggi, R. Q. Gutierrez. 2020. Rapidly declining body temperature in a tropical human population, *Sci. Adv.*, 2020, 6(44), eabc6599.
- Holman, N. 2020. Risk factors for COVID-19-related mortality in people with type 1 and type 2 diabetes in England: a population-based cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 8, 823–833.
- Hotz MJ, Qing D, Shashaty MGS, Zhang P, Faust H, Sondheimer N, Rivella S, Worthen GS, Mangalmurti NS. 2017. RBCs Homeostatically Bind mtDNA Through TLR9 to Maintain Quiescence and Prevent Lung Injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1–52.
- Huang, M. Zhou, S. Cheng, Y. Hu, M. Gao, Y. Ma, Y. Limpanont, H. Zhou, P. Dekumyoy, Y. Cheng. 2020. Myricetin possesses anthelmintic activity and attenuates hepatic fibrosis via modulating TGFβ1 and Akt signaling and shifting Th1/Th2 balance in schistosoma japonicum infected mice, *Front. Immunol.*, 2020, 11, 593.
- Hussain B, Sultana T, Sultana S, Masoud MS, Ahmed Z, Mahboob S. 2018. Fish eco-genotoxicology: Comet and micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ biomarker of freshwater pollution. *Saudi Journal of Biological Sciences* 25:393–398
- Ji D, Zhang D, Xu J, 2020. Prediction for Progression Risk in Patients with COVID-19 Pneumonia: the CALL Score. *Clin Infect Dis.* 71:1393–9
- Koupenova, L. Clancy, H. A. Corkrey and J. E. Freedman. 2018. Circulating platelets as mediators of immunity, inflammation, and thrombosis, *Circ. Res.* 122(2), 337–351
- Lubis, N. G., Sugito, S., Zuhrawati, Z., Zuraidawati, Z., Asmilia, N., Hamny, H., & Balqis, U. 2016. Efek Peningkatan Suhu Terhadap Jumlah Leukosit Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Medika Veterinaria*, 10(1), 31.
- Luzhna, L., Kathiria, P., & Kovalchuk, O. 2013. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Frontiers in genetics*, 4, 131.
- Mao B, Liu Y, Chai Y. 2020. Assessing risk factors for SARS-CoV-2 infection in patients presenting with symptoms in Shanghai, China: a multicentre, observational cohort study. *Lancet Digit Health.* 2020;2:e323–30

- Myers, L. C., Parodi, S. M., Escobar, G. J. & Liu, V. X. 2020. Characteristics of hospitalized adults with COVID-19 in an integrated health care system in California. *JAMA* 323, 2195–2198.
- Nemzek JA, Siddiqui J, Remick DG. 2001. Development and optimization of cytokine ELISAs using commercial antibody pairs. *J Immunol Methods*, 255, 149-157.
- Neote K, Darbonne W, Ogez J, Horuk R, Schall TJ. 1993. Identification of a promiscuous inflammatory peptide receptor on the surface of red blood cells. *Journal of Biological Chemistry*. 268:12247–12249. [PubMed: 8389755]
- Piccininni M, Rohmann J, Foresti L. 2020. Use of all cause mortality to quantify the consequences of covid-19 in Nembro, Lombardy: descriptive study. *BMJ*. 2020;369:m1835.
- Piva, S. 2020. Clinical presentation and initial management critically ill patients with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection in Brescia, Italy. *J. Crit. Care* 58, 29–33.
- Pretini, M. H. Koenen, L. Kaestner, M. Fens, R. M. Schiffelers, M. Bartels and R. Van Wijk. 2019. Red blood cells: chasing interactions, *Front. Physiol.*10, 945.
- Septama AW, Jantan I, Panichayupakaranant P. Flavonoids of *Artocarpus heterophyllus* Lam. 2018. heartwood inhibit the innate immune responses of human phagocytes. *J Pharm Pharmacol*. 70(9):1242-52.
- Wulansari. 2009. Pengaruh Ekstrak Air dan Ethanol *Alpinia* spp terhadap aktifitas dan Kapasitas Fagositosis Sel Macrophage yang Diinduksi dari Bakteri *Stapilococcus Epidermis* Secara In Vitro. Pusat Penelitian Biologi LIPI. Bogor.
- Wynants L, Van Calster B, Bonten. 2020. Prediction models for diagnosis and prognosis of covid-19 infection: systematic review and critical appraisal. *BMJ*. 369:1328