

Uji Antiinflamasi Kombinasi Astaxanthin dan Vitamin C terhadap Jumlah Neutrofil dan Limfosit pada Tikus Putih Galur Wistar yang diinduksi Karagenin

Maria Enjelina¹, M. In'am Ilmiawan², Pandu Indra Bangsawan³

¹Program Studi Pendidikan Dokter, FK UNTAN

¹Departemen Biologi dan Patobiologi, Program Studi Pendidikan Dokter, FK UNTAN

¹Departemen Farmakologi, Program Studi Pendidikan Dokter, FK UNTAN

Abstrak

Latar Belakang: Inflamasi adalah respon protektif setempat yang ditimbulkan oleh cedera atau kerusakan jaringan. Astaxanthin merupakan pigmen merah karotenoid yang berpotensi sebagai antioksidan dan memiliki efek antiinflamasi. Vitamin C merupakan vitamin larut air yang memiliki efek antioksidan dan diketahui dapat berfungsi sebagai antiinflamasi. Penelitian ini bertujuan mengetahui efek antiinflamasi kombinasi astaxanthin dan vitamin terhadap jumlah neutrofil dan limfosit tikus putih galur wistar yang diinduksi karagenin. **Metode:** Desain penelitian ini merupakan *true eksperimental* dengan *complete randomized design*. Penelitian ini menggunakan 30 tikus dan dibagi menjadi 5 kelompok dengan metode *simple random sampling*. Kelompok Kontrol negatif diberikan CMC 0,5 mg/kgBB; kontrol positif diberikan celecoxib 18 mg/kgBB; perlakuan 1 diberikan kombinasi astaxanthin 0,72 mg/kgBB dan vitamin C 45 mg/kgBB; perlakuan 2 diberikan kombinasi astaxanthin 1,44 mg/kgBB dan vitamin C 45 mg/kgBB; perlakuan 3 diberikan kombinasi astaxanthin 2,88 mg/kgBB dan vitamin C 45 mg/kgBB. Analisa data menggunakan SPSS versi 16.0. dengan *One Way ANOVA* dilanjutkan *Post Hoc Test LSD*. **Hasil:** Kombinasi astaxanthin dan vitamin C pada perlakuan 1, 2, dan 3 menurunkan jumlah neutrofil yang berbeda bermakna ($p < 0,05$) secara statistik jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. **Kesimpulan:** Kombinasi astaxanthin dan vitamin C dapat berperan sebagai agen antiinflamasi.

Kata Kunci: Inflamasi, astaxanthin, vitamin C, neutrofil, limfosit

Background: Inflammation is a protective response to local injury or tissue damage. Astaxanthin is a red pigment of carotenoids that has potential as an antioxidant and anti-inflammatory effect. Vitamin C is a water soluble vitamins that have antioxidant effect and was known that have an anti-inflammatory effect. The combination of astaxanthin and vitamin C are expected can increased of anti-inflammatory effect. The aims of this study to determine the effect of anti-inflammatory of astaxanthin combine with vitamin C on the number of neutrophils and lymphocyte in wistar rat induced by carrageenan. **Method:** This is a true experimental study with complete randomized design. This study used 30 rats and divided into 5 groups with simple random sampling method. Negative control group is given 0,5 mg/kgBB CMC; positive control is given 18 mg/kgBB celecoxib; treatment-1 is given 0,72 mg/kgBB astaxanthin and 0,45 mg/kgBB vitamin C; treatment-2 is given 1,44 mg/kgBB astaxanthin and 0,45 mg/kgBB vitamin C; treatment-3 is given 2,88 mg/kgBB astaxanthin and 0,45 mg/kgBB vitamin C. Data analysis using SPSS version 16.0 with One Way ANOVA Test followed by Post Hoc Test LSD. **Result:** The combination of astaxanthin and vitamin C on treatment-1, 2, and 3 decreased neutrophils count that have significantly different ($p < 0,05$) with negative control. **Conclusion:** The combination of astaxanthin and vitamin C role as anti-inflammatory agent.

Keywords: Inflammation, astaxanthin, vitamin C, neutrophils, lymphocytes

PENDAHULUAN

Inflamasi adalah respon protektif setempat yang ditimbulkan oleh cedera atau kerusakan jaringan yang berfungsi menghancurkan, mengurangi atau mengurung (*sequester*) baik agen yang menimbulkan cedera maupun jaringan yang cedera tersebut.¹

Proses inflamasi dapat terjadi melalui aktivasi pembentukan asam arakhidonat (AA) dengan menggunakan enzim fosfolipase A₂. Asam arakhidonat akan mengaktivasi pembentukan enzim *Cyclooxygenase* 1 dan enzim *Cyclooxygenase* 2 (COX-1 dan COX-2) yang berperan penting untuk meningkatkan proses inflamasi. Inflamasi juga menstimulasi mediator inflamasi lainnya, salah satunya adalah sitokin *Tumor Necrosis Factor α* (TNF-α) yang dapat mengaktifkan faktor

transkripsi genetik yaitu *nuclear factor κβ* (Nf-κβ). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Naghsvar *et al.*, pada tahun 2009 diketahui bahwa ekspresi COX-2 dapat dilihat dengan cara melihat kadar neutrofil, limfosit, eosinofil serta makrofag.^{2,3,4}

Astaxhantin merupakan pigmen merah karotenoid yang berpotensi sebagai antioksidan, antikanker, antidiabetik dan memiliki efek antiinflamasi pada lambung, hati, saraf, jantung, mata, dan kulit. Penelitian pada tikus menunjukkan bahwa astaxanthin memiliki efek antiinflamasi dengan menghambat aktivasi *nuclear factor κβ* (Nf-κβ).^{5,6,7}

Vitamin C merupakan vitamin yang larut dalam air. Vitamin C memiliki efek antioksidan baik terhadap oksigen reaktif maupun

nitrogen. Selain berfungsi sebagai antioksidan, vitamin C juga berfungsi sebagai antiinflamasi dengan menghambat jalur aktivasi *nuclear factor κ B* (Nf- κ B) yang merupakan pengatur utama gen inflamasi.⁸

Berdasarkan penelitian-penelitian yang telah dilakukan mengenai efek astaxanthin dan vitamin C sebagai antiinflamasi, mendorong peneliti untuk mengetahui efek antiinflamasi kombinasi astaxanthin dan vitamin C dalam dosis bervariasi.

METODOLOGI

Bahan

1. Instrumen yang digunakan adalah:

Instrumen yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang tikus, timbangan hewan, timbangan analitik, spuit disposable 1 ml dan 5 ml, sarung tangan kulit, sonde lambung, gelas

ukur, mortir dan penggerus, spuit injeksi, stopwatch, kaca objek, kaca penutup, mikroskop cahaya dan kamera.

2. Bahan yang digunakan adalah:

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah astaxanthin tablet dengan mutu farmasetik dengan *Certificate of analysis* dari PT Futamed, vitamin C tablet, celecoxib tablet, aquadest, pakan pellet hewan, alkohol absolut, karagenin, NaCl, CMC, metil alkohol, larutan giemsa, buffer dengan pH 6,4.

Hewan Uji

Tikus yang digunakan dalam penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar. Sampel tikus yang digunakan sebanyak 30 ekor dengan umur 8-12 minggu dengan berat badan 180-200

gram. Sampel di aklimatisasi dengan lingkungan laboratorium selama 7 hari dan dibagi secara acak menjadi 5 kelompok. Pemberian makanan adalah pakan standar dan minum *ad libitum*.

Prosedur Penelitian

Perlakuan yang diberikan pada penelitian ini adalah pemberian astaxanthin dengan dosis bertingkat yaitu: 0,72 mg/kgBB, 1,44 mg/kgBB, 2,88 mg/kgBB yang masing-masing dikombinasikan dengan vitamin C dalam dosis tetap yaitu 45 mg/kgBB. Pemberian obat (kombinasi astaxanthin dan vitamin C) dilakukan secara peroral dengan menggunakan sonde lambung. Obat hanya diberikan 1 kali selama penelitian. Karagenin disuntikkan pada subplantar hewan coba setelah 1 jam pemberian obat peroral. Setelah itu,

dilakukan pengambilan darah melalui bagian ujung ekor tikus pada jam ke-0, 4, 8 dan 12 setelah injeksi karagenin. Sampel darah yang diambil langsung dibuat sediaan apusan darah tepi dan diwarnai dengan pewarnaan giemsa. Sediaan apus darah tepi yang telah dibuat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x untuk melihat hitung jenis neutrofil dan limfosit per 100 sel. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan *One Way ANOVA* dilanjutkan dengan *Post Hoc Test LSD*.

Dapat diketahui Sel neutrofil normal memiliki sitoplasma dengan granula dan inti berlobus sedangkan sel limfosit normal memiliki ciri-ciri sel kecil dengan satu inti besar, asentrik dan tepi sitoplasma berwarna biru muda. Peningkatan kadar neutrofil maupun

limfosit pada apusan darah tepi merupakan penanda terjadinya suatu inflamasi jika kadar tersebut berada diatas ambang batas normal (nilai normal neutrofil 12-37% dan normal limfosit 64-84%).²⁵

Hasil perhitungan rerata jumlah neutrofil dan limfosit pada masing-masing kelompok Pada jam ke-0 diketahui rerata jumlah neutrofil semua perlakuan masih berada di dalam nilai normal. Kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 yang diberikan kombinasi astaxanthin dan vitamin C menunjukkan perbedaan yang bermakna secara statistik jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Selain itu, rerata jumlah limfosit pada perlakuan 1, 2, dan 3 juga menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan kontrol negatif dan kontrol positif. Hasil pada jam ke-4 diperoleh

rerata jumlah neutrofil maupun limfosit semua perlakuan yang diberikan agen antiinflamasi memiliki perbedaan bermakna ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini dikarenakan kelompok yang diberikan agen antiinflamasi dapat menekan proses inflamasi dan mempertahankan rerata jumlah neutrofil dalam nilai normal. Perbedaan rerata jumlah neutrofil maupun limfosit yang bermakna secara statistik ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif masih tampak pada jam ke-8. Hal ini menunjukkan agen antiinflamasi dapat menekan proses inflamasi yang terjadi pada jam ke-8.

Pada jam ke-12 pada kelompok kontrol negatif yang hanya diberikan CMC 0,5 mg menunjukkan rerata jumlah neutrofil telah berada di

dalam nilai normal. Berdasarkan hasil analisis data statistik masih terdapat perbedaan rerata jumlah neutrofil yang bermakna ($p < 0,05$) pada kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol negatif yang hanya mendapatkan perlakuan dengan CMC 0,5 gr terjadi proses inflamasi akut. Proses ini terlihat dengan adanya peningkatan rerata jumlah neutrofil relatif pada hitung jenis sel (*neutrofil shift to the left*) yang tampak pada jam ke-4 setelah induksi karagenin. Hal ini dikarenakan karagenin yang diinjeksikan pada subplantar kaki tikus dapat menginduksi inflamasi dalam dua fase. Fase pertama terjadi

0-2 jam setelah injeksi karagenin. Karagenin akan memicu beberapa mediator inflamasi seperti histamin, serotonin, dan kinin. Mediator-mediator yang dihasilkan pada fase pertama ini akan memperantarai perubahan seluler yang ditandai adanya migrasi leukosit terutama neutrofil pada aliran dan juga mengakibatkan adanya perubahan vaskular yang ditandai dengan adanya edema pada kaki tikus. Fase kedua terjadi 3 jam setelah injeksi karagenin. Karagenin akan menginduksi isoenzyme siklooksigenase, (COX-2) dan prostaglandin yang dihasilkan dari metabolisme asam arakhidonat dengan menggunakan enzim fosfolipase A2 pada membran sel neutrofil.^{9,10}

Prostaglandin yang dihasilkan oleh produk dalam jalur enzim

siklooksigenase ini akan menginduksi sitokin dan kemokin seperti IFN- γ dan IL-17 yang memediasi agregasi dari neutrofil dan monosit. Monosit yang berperan dalam fase akut ini juga dapat menghasilkan berbagai mediator inflamasi seperti TNF dan IL-1 β yang dapat berperan dalam menginduksi agregasi dan aktivasi neutrofil, produksi asam arakidonat dan NO. Proses ini yang menyebabkan rerata hitung jenis sel neutrofil pada apusan darah tepi akan meningkat (*neutrofil shift to the left*) hingga bisa lebih dari 50% dan menyebabkan rerata kadar hitung jenis sel limfosit akan menurun.^{9,10,11}

TNF dan IL-1 juga dapat berhubungan timbal balik dengan NF-k β yang merupakan mediator pro-inflamasi. Fase kedua dari inflamasi yang diinduksi oleh

karagenin inilah yang paling sensitif untuk menguji efek dari obat antiinflamasi. Mekanisme inflamasi yang disebabkan oleh karagenin ini akan mencapai kadar puncaknya dalam waktu 4 jam dan akan berangsur-angsur menurun setelah 6 jam hingga 24 jam sehingga tidak menginduksi kearah inflamasi kronis. Proses ini dapat dilihat berdasarkan hasil pengamatan pada kontrol negatif terjadi penurunan rerata kadar neutrofil pada hitung jenis yang berangsur menurun pada jam ke-8 hingga jam ke-12 setelah injeksi karagenin.^{9,10,12,13}

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan pada kelompok kontrol positif yang telah diberikan intervensi dengan menggunakan celecoxib dalam dosis 18 mg/kgBB, terjadi penurunan rerata kadar hitung jenis neutrofil yang berbeda

bermakna dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan celecoxib merupakan agen antiinflamasi. Celecoxib dapat menekan inflamasi yang bekerja dengan mekanisme menghambat biosintesis prostaglandin dengan mekanisme utama melalui penghambatan selektif COX-2.^{14,26}

Kelompok perlakuan yang telah diberikan intervensi dengan kombinasi astaxanthin dalam dosis bertingkat (0,72 mg/kgBB, 1,44 mg/kgBB, dan 2,88 mg/kgBB) dan vitamin C dalam dosis 45 mg/kgBB, menunjukkan adanya efek antiinflamasi yang ditandai dengan penurunan rerata kadar hitung jenis neutrofil yang berbeda bermakna dengan kontrol negatif pada jam ke-4. Hal ini diperkirakan karena Astaxanthin sebagai antioksidan yang mampu mencegah aktivasi NF- κ B,

selanjutnya gen-gen pro inflamasi menjadi tidak aktif sehingga dapat berperan sebagai agen antiinflamasi.^{15,18}

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh penelitian yang telah dilakukan oleh Kurashige *et al* (1990), menunjukkan bahwa astaxanthin menghambat inflamasi secara signifikan pada kaki tikus yang diinduksi dengan karagenin.

Penelitian lain yang dilakukan oleh Ohgami *et al* (2003), tentang potensi astaxanthin dalam inflamasi menunjukkan astaxanthin dapat menurunkan produksi NO yang diinduksi oleh aktivitas sintase NO, prostaglandin E₂ dan *Tumor Necrosis Factor α* (TNF- α) secara in vitro pada sel makrofag tikus. Penelitian lain yang menunjukkan efek astaxanthin sebagai antiinflamasi adalah penelitian yang telah

dilakukan oleh Lee *et al* (2003) yang menyatakan bahwa astaxanthin dapat menghambat ekspresi dan pembentukan mediator sitokin pro-inflamasi. Astaxanthin menekan kadar serum NO dan prostaglandin E₂ yang berperan dalam meningkatkan proses inflamasi.

Astaxanthin juga menekan sitokin seperti TNF- α dan IL-1 pada serum tikus yang berperan dalam aktivasi dan agregasi dari neutrofil. Astaxanthin menghambat aktivasi Nf- κ B pada sel lipopolisakarida yang juga dapat berperan dalam aktivasi dan agregasi neutrofil melalui aktivasi sitokin proinflamasi.^{16,17,18,19}

Vitamin C diperkirakan meningkatkan efek antiinflamasi astaxanthin dikarenakan fungsinya sebagai antioksidan yang juga dapat berperan sebagai agen antiinflamasi dan bekerja secara sinergis dengan

astaxanthin. Vitamin C dalam tubuh terdapat dalam 2 bentuk aktif yaitu asam askorbat dan *dehidroaskorbic acid* (DHA). Vitamin C dalam bentuk asam askorbat berperan sebagai *scavenger* radikal bebas, sedangkan dalam bentuk DHA akan menghambat secara langsung aktivasi NF- κ B faktor transkripsi inflamasi.^{14,20}

Kombinasi dari astaxanthin dan vitamin C yang dapat meningkatkan efek antiinflamasi dapat dilihat dari mekanisme struktur astaxanthin yang merupakan golongan karotenoid yang mengandung 13 rantai ganda dan memiliki ujung polar. Hal ini memungkinkan astaxanthin untuk bereaksi dengan fosfolipid atau air, sehingga berikatan dan membawa radikal bebas yang terdapat dipermukaan atau di dalam lipid bilayer. Struktur astaxanthin ini

memudahkan astaxanthin untuk berhubungan dengan vitamin C dalam lingkungan air. Vitamin C dapat menangkap radikal bebas dalam lingkungan berair dan menyimpan kapasitas transfer elektron astaxanthin sehingga dapat kembali sebagai *scavenger* radikal bebas. Hal ini diperkirakan dapat meningkatkan efek antiinflamasi melalui kesinergisan kerja dari kombinasi ini.^{19,21,22}

Efek vitamin C ini yang diperkirakan dapat meningkatkan kerja astaxanthin sebagai antiinflamasi dapat dilihat dari kombinasi pada perlakuan 1. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Bangsawan (2012) diketahui bahwa astaxanthin dalam dosis 0,72 mg/kgBB pada tikus bukan merupakan dosis yang efektif sebagai antiinflamasi. Namun

berdasarkan hasil penelitian ini dosis tersebut dapat berfungsi sebagai agen antiinflamasi apabila dikombinasikan dengan vitamin C. Efek kombinasi vitamin C akan semakin meningkat sebagai antiinflamasi apabila dikombinasikan dengan astaxanthin dalam dosis bertingkat yaitu dalam dosis 1,44 mg/kgBB dan 2,88 mg/kgBB.⁵

Berdasarkan hasil penelitian juga diketahui pada kelompok perlakuan yang diberikan intervensi dengan kombinasi astaxanthin dan vitamin C diketahui dapat menurunkan rerata hitung jenis sel neutrofil pada apusan darah tepi. Namun berdasarkan hasil data statistik juga diketahui kelompok yang diberikan intervensi dengan kombinasi astaxanthin dan vitamin C memiliki perbedaan rerata hitung jenis sel limfosit yang bermakna jika dibandingkan dengan

kelompok kontrol negatif. Hal ini dikarenakan kelompok yang diberikan intervensi dengan menggunakan kombinasi astaxanthin dan vitamin C diketahui dapat meningkatkan rerata hitung jenis sel limfosit dan mengembalikan rerata kadar hitung jenis sel limfosit ke nilai normal. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Dolma *et al* (2014) yang menyatakan bahwa astaxanthin dapat meningkatkan kadar hitung jenis sel limfosit relatif tanpa adanya perubahan patologis yang mengindikasikan adanya efek potensial dari astaxanthin sebagai imunomodulator.²³

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Park *et al* (2010) diketahui astaxanthin dalam dosis 0,72 mg/kgBB dapat meningkatkan IFN- γ dan IL-6

sehingga dapat meningkatkan kadar sel limfosit dalam plasma untuk melawan agen patogen dan virus. Dosis 0,72 mg/kgBB juga diketahui tidak akan meningkatkan TNF dan IL-1 dalam plasma sehingga tidak akan mengakibatkan terjadinya peningkatan kadar neutrofil dalam darah.²⁴

KESIMPULAN

1. Pemberian injeksi karagenin 1% sebanyak 0,1 ml dapat menginduksi terjadinya inflamasi akut yang ditandai dengan adanya peningkatan rerata jumlah hitung jenis sel neutrofil dan penurunan rerata jumlah hitung jenis limfosit relatif pada apusan darah tepi.
2. Kombinasi astaxanthin dan vitamin C memiliki efek antiinflamasi yang ditandai dengan adanya penurunan rerata

jumlah hitung jenis sel neutrofil sampai nilai normal pada jam ke 4 dan jam ke 8.

3. Kombinasi astaxanthin dalam dosis 2,88 mg/kgBB dan vitamin C dalam dosis 45 mg/kgBB memberikan efek antiinflamasi yang paling baik jika dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Dorland, W.A. N. Kamus Kedokteran Dorland Edisi 31. Jakarta: EGC, 2010.
2. Kumar, M.D. *et al.*, Buku Ajar Patologi Edisi 7 Volume 1. Jakarta: EGC, 2007.
3. Michael, K. Nuclear Factor- κ B in Cancer Development and Progression. *Nature*. Vol 441. Doi 10.1038/nature04870, 2006.
4. Naghsvarh F, *et al.*, Correlation Of Cyclooxygenase 2 Expression and Inflammatory Cells Infiltration in Colorectal Cancer. 2009. *Journal Biology Sciences*; 12; 98-100
5. Bangsawan, P. I., Efek Antiinflamasi Astaxanthin Terhadap Volume Edema dan Ekspresi COX 2 dengan Penggunaan Parameter Limfosit dan Netrofil Pada Tikus Putih Dewasa Galur Wistar. Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya Tesis (*inpres*), 2012.
6. Yuan, J. P. Dkk., Potential Health-Promoting Effect Of Astaxanthin: A High-Value Carotenoid Mostly From Microalgae. *Journal Molecular Nutrients Food Res*, 55, 150-165, 2011.
7. Kim, J. H. *et al.*, Protective Effect of Astaxanthin on Naproxen-Induced Gastric Antral Ulceration in Rats. *Eur Journal Pharmacology* 514(1): 53, 2005.
8. Son, Eun-Wha *et al.*, Vitamin C Blocks TNF- α induced NF- κ B Activation and ICAM-1 Expression in Human Neuroblastoma Cells. *Arch Pharm Res* Vol 27, No 10, 1073-1079, 2004.
9. Posadas, Inmaculada *et al.*, Carrageenan-Induced Mouse Paw Oedema is Biphasic, Age Weight Dependent And Displays Differential Nitric Oxide Cyclooxygenase-2 Expression. *British Journal of Pharmacology* (2004) 142, 331-338, 2004.
10. Hassanein, Nahed M.A. *et al.*, Roles of Interleukin-1 β (IL-1 β) and Nitric Oxide (NO) in the Anti-Inflammatory Dynamics of Acetylsalicylic Acid Against Carrageenan Induced Paw Oedema in Mice. *Global Journal of Pharmacology* 2 (1):11-19:2008
11. Kumar, M.D. *et al.*, Buku Ajar Patologi Edisi 7 Volume 1. Jakarta: EGC, 2007.
12. Gill, Navneet *et al.*, Anti-Inflammatory and Anti-Hyperalgesic effect of All-Trans Retinoic Acid in Carrageenan-Induced Paw Edema in Wistar Rats: Involvement of Proxysome Proliferator-Activated Receptor- β / δ Receptors. *Indian J. Pharmacol.* 2013 May-Jun; 45(3): 278-282
13. Necas, J., and L. Bartosikova. Carrageenan: a review. *Journal Veterinari Medicina*, 58 (4): 187-205, 2013.
14. Carr, A.C. *et al.*, Potential Antiatherogenic Mechanism of Ascorbate (vitamin C) and α -tokoferol (vitamin E). *Journal Circulation Respiration*, 87, 349-54, 2000.
15. Ciapara, H. *et al.*, Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit Rev Journal Food Science Nutrients*. 46(2):185-96, 2006.
16. Kurashige, M. *et al.*, Inhibition of oxidative injury of biological membranes by Astaxanthin. *Physiol Chem Phys Med NMR* 22(1):27-38, 1990.
17. Ohgami, K. *et al.*, "Effects of Astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo". *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44(6): 2694-2701, 2003.
18. Suzuki, Y. *et al.*, Suppressive effects of Astaxanthin against rat endotoxin-

- induced uveitis by inhibiting the NF-kappaB signaling pathway. *Exp Eye Res*, 2005.
19. Yang, Yue. *et al.*, Astaxanthin Structure, Metabolism, and Health Benefits; Review Article. *Journal Of Human Nutrition and Food Science*. Scimed Central, 2013.
 20. Carcamo, J. M. *et al.*, Vitamin C is a Kinase inhibitor: Dehydroascorbic Acid Inhibits I κ B α Kinase β . *Journal Molecular and Cellular Biology*, 24, 6645-52, 2004.
 21. Ambati, Ranga Rao *et al.*, Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications-A Review. *Marine Drugs* 2014, 12, 128-152;doi:10.3390/md12010128, 2014.
 22. Lee, S. J. *et al.*, "Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I kappa B kinase-dependent NF-kappa B activation." *Journal Molecules and Cells* 16(1): 97-105, 2003.
 23. Dolma, Tshering *et al.*, Acute Phase Response and Neutrophils: Lymphocyte Ratio in Response to Astaxanthin in Staphylococcal Mice Mastitis Model. *Journal of Veterinary Medicine* Volume 2014. Article ID 147652, 5 pages
 24. Park, Jean Soon *et al.*, Astaxanthin Decreased Oxidative Stress and Inflammation and Enhanced Immune Response in Humans. *Nutrition & Metabolism* 2010. 7:18
 25. Kenneth, K. *et al.*, William Hematology 8th Edition. Ebook p.38-39, 2010.
 26. Goodman and Gillman. *The Pharmacological Basis of Therapeutics; Analgesic-Antipyretic Agent; Brunton, Ph.D*, 2008.