

Received : June 23<sup>th</sup>, 2022

Accepted : July 25<sup>th</sup>, 2022

Web Published ; July 30<sup>th</sup>, 2022

## Toxicity Test of Windu Shrimp (*Penaeus monodon*) Skin Chitosan With Brine Shrimp Lethality Test Method

Dina Sucita Saragih<sup>1</sup>, Ridwanto<sup>1\*</sup>, Anny Sartika Daulay<sup>1</sup>, Haris Munandar Nasution<sup>1</sup>, Dikki Miswanda<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, Universitas Muslim Nusantara Al Washliyah., Jalan Garu II Medan Amplas 20147, North Sumatera, Indonesia

\*Email : ridwanto@umnaw.ac.id

### ABSTRACT

Chitosan is a modification of chitin compounds that are widely found in the outer skin of crustacean animals such as shrimp and crabs. This research includes isolation of chitin and chitosan: deproteination, demineralization, depigmentation and deacetylation namely transformation of chitin into chitosan, characterization of chitosan, FTIR, and chitosan toxicity test with five concentrations of test solution, namely 100 g/ml, 250 g/ml, 500 g/ml, 750 g/ml and 1000 g/ml using the BSLT method by looking at the number of deaths of *Artemia salina* L larvae ( $LC_{50}$ ). The results of tiger prawn shell chitosan (*Penaeus monodon*) obtained the % degree of deacetylation of 60%. The results of the toxicity test showed that chitosan was not toxic to *Artemia salina* Leach, indicated by the  $LC_{50}$  value  $> 1000\mu\text{g/ml}$ . chitosan windu 4994.16 g/ml, chitosan is not toxic.

**Keywords:** Isolation, chitin, chitosan, toxicity test, Brine Shrimp Lethality Test.

### I. Pendahuluan

Udang banyak dimanfaatkan dalam industri ekspor terutama dalam bentuk beku, usaha lokal, maupun konsumsi rumahan. Konsumsi dan produksi yang tinggi menghasilkan limbah yang banyak. Limbah ini yang akan menimbulkan dampak terhadap pencemaran lingkungan yang merusak lingkungan<sup>1</sup>. Limbah kulit udang memiliki kandungan senyawa kitin, terdapat tiga komponen utama dari limbah kulit udang yaitu protein sebanyak 25-44%, kalsium karbonat 45-50%, dan kitin 15-20%. Jumlah kitin yang melimpah memungkinkan dimanfaatkan secara luas dalam berbagai bidang<sup>2</sup>. Kitosan merupakan senyawa polimer turunan dari hasil deasetilasi kitin, dan banyak dimanfaatkan di berbagai bidang industri. Kitosan banyak terkandung didalam cangkang

hewan laut seperti kepiting, udang, kerang, dan lainnya<sup>3</sup>.

Uji Toksisitas dilakukan untuk mengetahui adanya efek toksik dan menilai batas keamanan dalam penggunaan suatu senyawa. Uji toksisitas merupakan uji untuk mengetahui kemampuan racun yang dapat menimbulkan kerusakan ketika masuk kedalam tubuh dan organ yang rentan terhadapnya<sup>4</sup>. Uji toksisitas yang dilakukan dengan menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) ditujukan untuk menentukan potensi suatu senyawa bersifat racun dengan mengetahui tingkat toksisitasnya.

Uji toksisitas dengan metode BSLT dapat dilakukan dengan cepat, murah dan mudah, sehingga sering digunakan untuk mengetahui tingkat toksisitas suatu senyawa<sup>5</sup>. Parameter dari metode BSLT yaitu nilai mortalitas yang

ditentukan dengan menggunakan analisa probit untuk menentukan nilai toksisitas menggunakan *Lethal Concentration (LC<sub>50</sub>)*<sup>6</sup>. Tujuan penelitian untuk mengetahui tingkat toksisitas kitosan kulit udang windu (*Penaeus monodon*) menggunakan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) terhadap larva udang *Artemia salina*.

## **II. Metodologi Penelitian**

### **2.1. Bahan kimia, peralatan dan instrumentasi**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini : limbah kulit udang dari Belawan, Kabupaten Deli Serdang, Telur *A. Salina* Leach, NaOH, HCl, NaOCl, NaCl , dan Asam Asetat. Alat-alat yang digunakan meliputi : Beaker glass, gelas ukur, corong, ayakan, magnetik stirrer, Hot Plate, Oven, Gelas ukur, Batang pengaduk, pH Meter, Tanur, Deksikator, Cawan Porselin, tang krus, Cawan krus, Neraca analitik, Spektrofotometri FT-IR.

### **2.2. Prosedur penelitian**

#### **2.2.1 Pengolahan Sampel**

Limbah kulit udang windu dicuci dengan air sampai bersih dari zat pengotor. Kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari sampai kering. Setelah kering, sampel dihaluskan dan diayak hingga mendapatkan serbuk halus.

#### **2.2.2 Proses Deproteinasi**

Sampel yang sudah dihaluskan dimasukkan ke dalam beaker glass lalu ditambahi dengan larutan NaOH 3,5 % dengan perbandingan 1:10 (b/v) antara sampel dan pelarut. Kemudian dipanaskan dengan suhu 60-70°C selama 4 jam sambil dilakukan pengadukan dengan kecepatan 50 rpm menggunakan magnetic stirrer. Residu yang diperoleh selanjutnya dicuci dengan aquades hingga pH netral kemudian dikeringkan dengan menggunakan oven pada temperatur 80oC selama 24 jam<sup>7</sup>.

#### **2.2.3 Proses Demineralisasi**

Hasil dari proses deproteinasi dimasukkan kedalam beaker lalu ditambah larutan HCL 1,5 M dengan perbandingan 1:15 (b/v) antara pelarut dengan sampel, kemudian dipanaskan pada suhu 60-70°C selama 4 jam sambil dilakukan pengadukan dengan kecepatan 50 rpm menggunakan magnetic stirrer. Residu yang diperoleh dicuci dengan aquades hingga pH netral

lalu dikeringkan dengan menggunakan oven pada temperatur 80°C selama 24 jam<sup>7</sup>.

#### **2.2.4 Proses Depigmentasi**

Hasil dari proses demineralisasi, dimasukan kedalam beaker lalu ditambah larutan NaOCl 0,315% dengan perbandingan 1:10 (b/v) antara sampel dan pelarut, selanjutnya dipanaskan pada suhu 40°C selama 1 jam, kemudian residu yang diperoleh dicuci dengan aquades hingga pH netral lalu dikeringkan dalam oven dengan suhu 80°C, kemudian didinginkan dalam deksikator, setelah itu hasil ditimbang<sup>8</sup>.

#### **2.2.5 Proses Deasetilasi**

Pembuatan kitosan diperoleh melalui proses deasetilasi kitin. Hasil yang diperoleh dari proses depigmentasi dimasukkan kedalam gelas kimia kemudian ditambah larutan NaOH 60% dengan perbandingan antara pelarut dengan sampel yaitu 1:20 (b/v) kemudian dipanaskan dengan suhu 80-100°C selama 1 jam, residu yang didapat dinetralkan dengan aquades, lalu dikeringkan dalam oven dengan suhu 80°C selama 24 jam, kemudian didinginkan dalam deksikator, setelah itu hasil ditimbang<sup>8</sup>.

### **2.3. Karakterisasi Kitosan**

#### **2.3.1 Kadar Air**

Kitosan ditimbang sebangk 0,5 g lalu dimasukkan kedalam cawan porselin yang telah diketahui beratnya. Sampel dipanaskan di oven pada suhu 100-105°C selama 2 jam. Kemudian didinginkan dalam deksikator selama ± 30 menit dan ditimbang hingga diperoleh berat konstan<sup>9</sup>.

#### **2.3.2 Kadar Abu**

Sampel ditimbang sebanyak 0,5 g lalu dimasukkan kedalam cawan krus yang telah diketahui beratnya, kemudian sampel diabukan dalam tanur dengan suhu 600°C sampai diperoleh abu berwarna putih, setelah itu cawan tersebut didinginkan dalam deksikator dan ditimbang<sup>9</sup>.

#### **2.3.4 Kelarutan Kitosan**

Kelarutan kitosan merupakan suatu parameter yang dapat dijadikan sebagai acuan standar mutu dari kitosan. Semakin tinggi kelarutan kitosan maka mutu kitosan semakin baik. Kitosan dilarutkan dalam asam asetat dengan konsentrasi 2% dengan perbandingan 1:100 (g/ml)<sup>7</sup>.

## 2.4 Uji Toksisitas Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

### 2.4.1 Pembuatan Air Laut Buatan

Air laut buatan dibuat dengan cara melarutkan 38 g garam dalam 1 L air. Kemudian disaring dengan kertas Whatman<sup>10</sup>.

### 2.4.2 Penetasan Telur Artemia Salina Leach

Telur udang ditetaskan dalam bejana gelap dan terang. Zona gelap diletak telur dan aerator, sedangkan zona yang lainnya diletakkan lampu sebagai sumber pencahayaan dalam penetasan telur udang<sup>6</sup>. Bejana diberi sekat berlubang yang menjadi jalan untuk larva yang telah menetas untuk bergerak secara alamiah ke arah yang terang. Wadah diisi satu liter air laut buatan. Kemudian pada bagian gelap dimasukkan satu sendok (sendok teh) telur yang sebelumnya telah dicuci dengan cara direndam dengan aquadest selama 1 jam. Pada wadah bagian gelap ditutup dengan aluminium foil. Pada wadah bagian terang diberi penerangan cahaya lampu neon 40 Watt agar suhu penetasan 25-30°C tetap terjaga. Telur udang dibiarkan terendam selama 48 jam sampai telur menetas. Telur akan menetas dalam waktu 18-48 jam dan akan bergerak secara alamiah menuju daerah yang terang sehingga larva udang terpisah dari bagian telur atau kulit telur. Larva yang telah aktif bergerak siap digunakan sebagai hewan uji dalam penelitian<sup>11</sup>.

### 2.4.3 Pembuatan Larutan Uji

Pengujian dilakukan dengan menggunakan larutan uji yang dibuat menjadi 5 konsentrasi 0 µg/ml (kontrol negatif), 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml dan 1000 µg/ml dalam air laut buatan, masing-masing dengan tiga kali pengulangan.

### 2.4.4 Uji Toksisitas

Pada uji toksisitas dengan metode BSLT digunakan larva *Artemia salina* Leach yang berumur 48 jam. Disiapkan vial untuk tiap konsentrasi dan replikasi sebanyak 3 kali dengan ukuran 10 ml. Setiap vial diisi larutan sampel sebanyak 10 ml, selanjutnya dimasukkan 10 ekor larva *A. salina* Leach kedalam masing-masing vial yang berisi senyawa uji. Kontrol negatif (blanko) diberi perlakuan sama seperti larutan uji tanpa penambahan sampel<sup>12</sup>. Jumlah larva yang mati

dalam tiap vial selama 24 jam dihitung dengan cara manual. Pengamatan dilakukan selama 24 jam, tingkat toksisitas diperoleh dengan menghitung jumlah larva yang mati, yaitu bila larva udang tidak menunjukkan pergerakan selama beberapa detik observasi<sup>11</sup>.

## Analisis Data

Uji toksisitas sampel ditentukan dengan melihat besarnya nilai dari LC<sub>50</sub> yang dapat mematikan *Artemia salina* Leach sampai 50% dan dilakukan perhitungan dengan analisa probit (*probability unit*), efek toksisitas dapat dianalisis dari persen kematian<sup>5</sup>.

## III. Hasil dan Diskusi

### 3.1. Isolasi Kitosan Dari Kulit Udang Windu

Isolasi kitin dari limbah udang bertujuan memisahkan kitin dari protein dan kalsium karbonat. Pada tahap deproteinasi, protein yang terkandung dalam limbah kulit udang akan larut dalam basa sehingga protein yang terikat secara kovalen pada gugus fungsi kitin akan terpisah. Tahap deproteinasi dilakukan dengan mereaksikan kitin dengan basa kuat NaOH dalam dalam beaker yang dipanaskan pada suhu 70°C selama 4 jam. Pada reaksi deproteinasi terbentuk sedikit gelembung dipermukaan larutan dan larutan menjadi agak mengental dan berwarna kemerahan<sup>8</sup>.

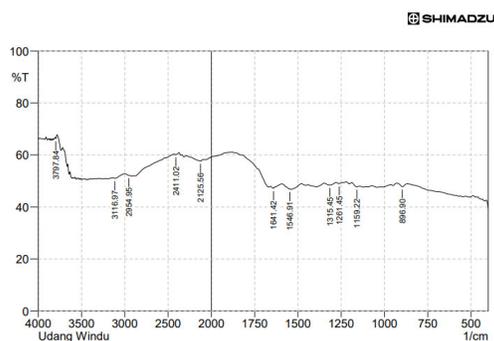
Proses selanjutnya yaitu tahap demineralisasi, pada tahap ini hasil dari proses deproteinasi ditambahkan dengan larutan HCl 1,5 N, terjadi reaksi yang cukup signifikan, yaitu terbentuk banyak buih dan gelembung-gelembung dengan volume yang cukup besar, dan hal ini berlangsung selama kurang lebih 5-10 menit. Hal ini disebabkan oleh terbentuknya gas-gas CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O di permukaan. Terbentuknya CO<sub>2</sub> dalam produksi merupakan sebuah indikator berlangsungnya reaksi asam klorida dengan garam mineral yang terdapat dalam limbah kulit udang. Proses demineralisasi bertujuan untuk menghilangkan garam-garam organik atau kandungan mineral yang ada pada kulit udang. Kandungan mineral utamanya adalah CaCO<sub>3</sub><sup>7</sup>.

Tahap berikutnya yaitu dilanjutkan dengan proses depigmentasi. Sampel ditambahkan dengan larutan natrium hipoklorit dengan konsentrasi 0,315%. Tujuan dari proses ini adalah untuk menghilangkan warna pada kitin<sup>13</sup>. Penghilangan pigmen bertujuan untuk memberikan penampakan yang menarik pada kitosan yang dihasilkan.

Senyawa kitosan diperoleh dengan melakukan proses reaksi deasetilasi pada kitin. Pada proses deasetilasi dilakukan dengan penambahan NaOH 60% dan dipanaskan pada suhu 80-100°C. Tujuan dari proses ini adalah untuk memecah gugus asetil (-CH<sub>3</sub>CO) pada kitin menjadi gugus amina (NH<sub>2</sub>) dengan penambahan basa kuat NaOH. Penambahan NaOH menyumbangkan gugus hidroksil yang tersedia untuk terjadinya proses hidrolisis, sehingga memperbesar kemungkinan terjadinya eliminasi pada gugus karbonil yang disebabkan terjadinya adisi oleh hidroksil, sehingga terbentuklah gugus amina hidrogen<sup>13</sup>.

### 3.2. Pengujian Kemurnian Kitosan Isolasi Meenggunakan FTIR

Uji kemurnian kitosan hasil isolasi menggunakan spektrofotometri Inframerah menunjukkan adanya serapan pada bilangan gelombang 3400-2400 cm<sup>-1</sup> (rentang O-H) yaitu 3116,97cm<sup>-1</sup> dan 2954,95 cm<sup>-1</sup>. Adanya serapan pada bilangan 1640-1550 cm<sup>-1</sup> (rentang N-H) yaitu pada bilangan gelombang 1641,42 cm<sup>-1</sup> dan 1546,91 cm<sup>-1</sup>. Selanjutnya adanya serapan pada bilangan gelombang 1350-1000 cm<sup>-1</sup> (rentang C-N) yaitu 1315,45 cm<sup>-1</sup>, 1261,45 cm<sup>-1</sup> dan 1159,22 cm<sup>-1</sup>. Kemudian terdapat serapan pada bilangan gelombang 1000-650 cm<sup>-1</sup> (rentang C-H) yaitu pada serapan gelombang 806,90 cm<sup>-1</sup>.



**Gambar 1.** Hasil Analisa FTIR Kitosan Windu (*Penaeus monodon*)

Kualitas kitosan dapat diketahui juga dari besarnya persen derajat deasetilasi. Pada penelitian ini diperoleh persen derajat deasetilasi sebesar 60%, pada kitosan kulit udang windu. Rendahnya DD kitosan hasil penelitian disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya faktor pengadukan,

suhu serta jenis habitat atau pemeliharaan udang yang digunakan.

### 3.3. Karakterisasi Kitosan

Kitosan yang diperoleh dikarakterisasi untuk mengetahui mutu kitosan yang dihasilkan. Karakterisasi yang dilakukan meliputi pemeriksaan organoleptis (tekstur, warna, dan bau), uji kadar air, uji kadar abu, kelarutan dalam asam asetat 2%. Hasil karakterisasi kitosan yang diperoleh dari penelitian dibandingkan dengan mutu SNI No. 7949 Tahun 2013.

**Tabel 1.** Karakterisasi Kitosan

Parameter	SNI (No. 7949, Tahun 2013)	Kitosan Kulit Udang Windu
Pemeriksaan Organoleptis (Tekstur, Warna, Bau)	Coklat muda sampai putih	Serbuk, putih kekuningan, tidak berbau
Kadar Air	≤ 12 %	5,596%
Kadar Abu	≤ 5%	0,3%
Kelarutan kitosan dalam asam asetat 2%	-	Larut
Derajat Deasetilasi	≥ 75 %	60%,

### 3.4. Hasil Uji Toksisitas Kitosan Dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Uji toksisitas ini dilakukan dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dengan menggunakan hewan uji *Artemia salina* Leach karena cara pengerjaannya yang cukup mudah, murah dan tidak memerlukan waktu yang lama untuk memperoleh hasilnya.

*Artemia salina* L. yang dapat digunakan untuk uji toksisitas adalah yang berbentuk *naupli* atau larva. Larva yang digunakan berumur 48 jam karena larva pada usia ini berada dalam keadaan peka. Pada usia 48 jam, organ-organ pada *Artemia salina* L. sudah terbentuk dengan lengkap. Dengan terbentuknya mulut, *Artemia salina* L. dapat meminum air laut buatan yang sudah diberi sampel uji dengan berbagai konsentrasi, sehingga kematian benar adanya disebabkan karena perlakuan dari

kitosan kulit udang yang ditambahkan dalam berbagai konsentrasi<sup>14</sup>.

Kitosan yang telah dilarutkan menjadi larutan induk baku dibuat menjadi 5 konsentrasi, yaitu konsentrasi 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml dan 1000 µg/ml. Di samping itu, dibuat juga kontrol negatif yang hanya berisi air garam dan larva udang *Artemia salina* L.. Penambahan kontrol negatif bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan kitosan terhadap tingkat kematian larva uji. Pada uji BSLT ini dilakukan masing-masing replikasi sebanyak 3 kali untuk meminimalisir kesalahan data. Pengamatan pada larva dilakukan 24 jam setelah perlakuan konsentrasi. Perhitungan kematian larva dilakukan dengan cara mengamati larva selama beberapa detik. Kematian pada larva dihitung pada saat tidak ada lagi pergerakan larva dalam waktu beberapa detik<sup>12</sup>.

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh kematian larva berbeda disetiap konsentrasi. Berdasarkan data pada tabel 2 jumlah larva yang digunakan tiap perlakuan adalah 10 ekor larva dengan 3 kali pengulangan, sehingga total 30 ekor untuk satu konsentrasi. Dari data diketahui konsentrasi terendah yaitu 100 µg/ml dan konsentrasi yang tertinggi yaitu 1000 µg/ml dengan persentase mortalitas sebesar 3,3% – 26,7%. Sedangkan pada blanko tidak memberikan efek mortalitas terhadap larva. Konsentrasi yang bervariasi pada setiap vial uji memiliki jumlah kematian *Artemia salina* yang beragam jumlahnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa setiap konsentrasi memiliki pengaruh yang berbeda pada kematian larva *Artemia salina*, semakin tinggi konsentrasi yang dibuat maka tinggi pula kematian larva<sup>12</sup>.

**Tabel 2.** Hasil Pengujian uji toksisitas kitosan kulit udang windu (*Penaeus monodon*)

memasukkan nilai (probit 50% kematian hewan

No	Konsentrasi (µg/ml)	Perlakuan 1		Perlakuan 2		Perlakuan 3		Jlh larva yang mati	Rata-rata %mortalitas
		Larva mati	% Mortalitas	Larva mati	% Mortalitas	Larva mati	% Mortalitas		
1	Blanko	0	0	0	0	0	0	0	0,0 %
2	100	0	0	1	10	0	0	1	3,3 %
3	250	1	10	1	10	1	10	3	10,0 %
4	500	2	20	1	10	2	20	5	16,7 %
5	750	1	10	2	20	2	20	5	16,7 %
6	1000	2	20	2	20	3	30	7	23,3 %

Setelah mengetahui % Mortalitas larva *A. salina*, kemudian dicari nilai probit melalui tabel probit dan diregresikan secara linier.

$$Y = a + bX$$

Keterangan:

Y = Nilai probit

a = Konsentrasi regresi

b = Slope/kemiringan regresi

X = Logaritma<sub>10</sub> konsentrasi uji

Data yang diperoleh dari tabel 2, kemudian dianalisis dengan menggunakan tabel analisa probit untuk mendapatkan nilai *Lethal concentration 50* (LC<sub>50</sub>). LC<sub>50</sub> merupakan besarnya konsentrasi yang

dapat membunuh hewan percobaan sebanyak 50% dari keseluruhannya. Nilai LC<sub>50</sub> dapat dihitung dengan persamaan regresi garis lurus dengan

uji) sebagai y sehingga dihasilkan x sebagai nilai log konsentrasi.

**Tabel 3.** Perhitungan nilai LC<sub>50</sub>

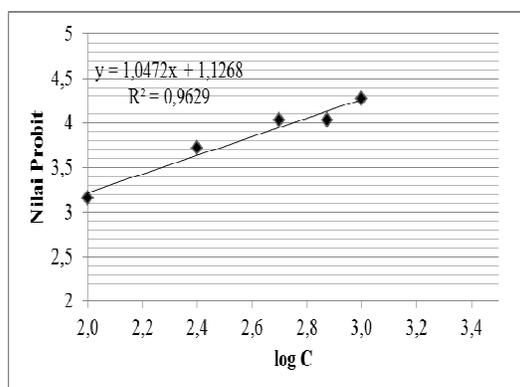
(C (µg/ml))	n (jumlah larva)	R (larva yang mati)	P (%Mortalitas)	X (log C)	Y (Nilai Probit)	XY	X <sup>2</sup>
100	30	1	3,3 %	2,0000	3,1616	6,3232	4,0000
250	30	3	10,0 %	2,3979	3,7184	8,9165	5,7501
500	30	4	13,3 %	2,6990	4,0339	10,8874	7,2844
750	30	5	16,7 %	2,8751	4,0339	11,5977	8,2660
1000	30	7	23,3 %	3,0000	4,2710	12,8130	9,0000
				ΣX = 12,9720	ΣY = 19,2188	ΣXY = 50,5378	ΣX <sup>2</sup> = 34,3005

Antilog nilai x yang nantinya menjadi parameter nilai LC<sub>50</sub> yang ditunjukkan untuk mengetahui adanya aktivitas biologis pada suatu senyawa terhadap hewan uji ialah dengan menghitung jumlah larva yang mati karena pengaruh pemberian senyawa dengan konsentrasi yang telah ditentukan<sup>6</sup>. Analisa probit pada kitosan kulit windu diperoleh grafik persamaan garis lurus  $y = 1,0472 x + 1,1268$ .

Gambar 3 menunjukkan log konsentrasi terhadap nilai probit yang didapat dari persentase kematian larva. Setelah itu dimasukkan nilai  $y$  yakni nilai probit 50% hewan uji dan didapatkan nilai  $x = 3,369846$  maka nilai  $LC_{50}$  antilog yaitu 4994,16  $\mu\text{g/ml}$ .

Suatu senyawa dikatakan bersifat toksik apabila nilai  $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$ . dan apabila suatu senyawa memiliki nilai  $LC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$ , maka senyawa tersebut tidak berpotensi toksik<sup>15</sup>.

Nilai  $LC_{50}$  yang tinggi dan bersifat tidak toksik ini dikarenakan rendahnya mortalitas larva *A. salina* pada tiap konsentrasi, yaitu pada konsentrasi ini mortalitas tidak mencapai sebesar 50 % dari jumlah larva yang ujikan<sup>5</sup>.



**Gambar 3.** Grafik Regresi Linear Konsentrasi Kitosan Windu (*Penaeus monodon*) Terhadap Nilai Probit

#### IV. Kesimpulan

Hasil kitosan kulit udang windu (*Penaeus monodon*) didapat % Derajat Deasetilasinya sebesar 60%, yang menyatakan bahwa hasil tidak memenuhi persyaratan Standart Nasional Indonesia yaitu %DD kitosan  $\geq 75\%$ . Nilai  $LC_{50}$  yang diperoleh dari kitosan kulit udang windu (*Penaeus monodon*) yaitu 4897,79  $\mu\text{g/ml}$  membuktikan bahwa kitosan tidak bersifat toksik pada *Artemia salina* Leach.

#### Referensi

- Ridwanto, Daulay, A. S., & Gurning, K. (2022, Apr). Isolation and Characterization of Chitosan From Sea and Freshwater Waste, North Sumatera Province, Indonesia. *Rasayan Journal of Chemistry*, 15(2), 780–785. <https://doi.org/10.31788/RJC.2022.1526721>

- Sari, N. A., Nurhamidah, I. S., Mulyana, S. A., & Rohyami, Y. (2019, Aug). Preparasi Dan Karakterisasi Kitosan Dari Limbah Pengolahan Udang. *Khazanah: Jurnal Mahasiswa*, 11(1).
- Rochmawati, Z. N., Nabila, F., & Ainurrohman, C. (2018). Karakterisasi Kitosan Yang Diisolasi Dari Cangkang Internal Cumi-cumi. *Saintekno: Jurnal Sains dan Teknologi*, 16(1), 105-112.
- Juniarti., D., & elvi Osmeli., Y. (2010, Apr). Kandungan Senyawa Kimia, Uji Toksisitas (Brine Shrimp Lethality Test) Dan Antioksidan (1,1-diphenyl-2-pikrilhidrazyl) Dari Ekstrak Daun Saga (*Abrus precatorius* L.). *Makara Journal of Science*, 13(1), 50–54.
- Puspitasari, E., & Rozirwan, M. H. (2018, Jun). Uji Toksisitas Dengan Menggunakan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Pada Ekstrak Mangrove (*Avicennia marina*, *Rhizophora mucronata*, *Sonneratia alba* dan *Xylocarpus granatum*) yang berasal dari Banyuasin, Sumatera Selatan. *Jurnal Biologi Tropis*, 18(1), 91-103.
- Ningdyah, A. W., Alimuddin, A. H., & Jayuska, A. (2015). Uji Toksisitas Dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) Terhadap Hasil Fraksinasi Ekstrak Kulit Buah Tampoi (*Baccaurea macrocarpa*). *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 4(1).
- Agustina, S., Swantara, I. M. D., & Suartha, I. N. (2015, Jul). Isolasi Kitin, Karakterisasi, dan Sintesis Kitosan Dari Kulit Udang. *Jurnal Kimia*, 9(2), 271-278.
- Dompeipen, E. J., Kaimudin, M., & Dewa, R. P. (2016). Isolasi Kitin Dan Kitosan Dari Limbah Kulit Udang. *Majalah Biam*, 12(1), 32-39.
- Fadli, A., Drastinawati, Alexander, O., & Huda, F. (2017). Disintesis Dari Limbah Industri Udang Kering. *Jurnal Sains Materi Indonesia*, 1, 61–67.
- Djamil, R., & Anelia, T. (2009, Sep). Penapisan Fitokimia, Uji BSLT, Dan Uji Antioksidan Ekstrak Metanol Beberapa Spesies Papilionaceae. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 7(2), 65-71.
- Lestari, D., Kartika, R., & Marlina, E. (2019, Jan). Uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) Umbi Bawang Tiwai (*Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb) dan Uji Toksisitas Akut Fraksi Aktif. *Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia*, 1(1), 1-10.
- Supriningrum, R., Sapri, S., & Pranamala, V. A. (2017). Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Akar KB (*Coptosapelta tomentosa* Valetton ex K. Heyne) Dengan Metode Brine Shrimp

- Lethality Test (BSLT). Jurnal ilmiah manuntung, 2(2), 161-165.
13. Mardiana, U. (2021). Isolasi Dan Karakterisasi Kitosan Pada Kerang Darah ( *Anadara granosa* ). Jurnal Program Studi Analisis Kesehatan, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Bakti Husada. Tasikmalaya., 1(1), 1–9.
  14. Panjaitan, R. B. (2011, Jul). Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Batang Pulasari (*Alyxiae cortex*) Dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *Skripsi*. Yogyakarta: Universitas Sanata Dharma.
  15. Mayer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, D.E., dan C.Laughlin, J. . (1982). Brine Shrimp: A Conveint General Bioassay for Active Plant Constituents. *Journal of Medicinal Planta Medica*, 45(5), 31–34.