

Acute Toxicity Test of Pineapple Peel Aqueous Extract (*Ananas comosus* L.) with BSLT Method

Muhammad A. Fardiaz*, Iman S. Pratama, and Siti R. Aini

Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Mataram, Nusa Tenggara Barat, Indonesia

Abstract

Pineapple peel waste can be processed into pharmaceutical dosage form, but research related to the toxicity of pineapple peel is limited. This study seeks to establish acute toxicity of pineapple peel aqueous extract with method *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Preliminary tests were carried out using 10 *Artemia salina* larvae in 10 mL of pineapple peel water extract at concentrations 10000;1000;100;10;1; 0.1 ppm. After 24 hours, observations were performed on the number of deaths and morphological damage of *Artemia salina* larvae. An LC_{50} value will be generated by performing a probit analysis on data regarding the number of larvae deaths using *Microsoft Excel*. A morphological damage of *Artemia salina* larvae were analyzed descriptively. Results of the preliminary test are presented as concentration ranges for the final test, including 100, 251, 630, 1583, 3975, 6987, and 10,000 ppm. The LC_{50} value obtained based on the definitive test was 1185 ppm. Morphological damage to *Artemia salina* larvae due to exposure of pineapple peel aqueous extract occurred in antennula, appendages, abdomen, and digestive tract. Pineapple peel aqueous extract belongs to non-toxic category with $LC_{50} > 1000$ ppm. Morphological damage to *Artemia salina* larvae occurred at concentrations of 630-10000 ppm.

Keywords: Acute toxicity, BSLT, pineapple peel.

Uji Toksisitas Akut Ekstrak Air Kulit Buah Nanas (*Ananas comosus* L.) dengan Metode BSLT

Abstrak

Limbah kulit nanas dapat diolah menjadi sediaan farmasi, namun penelitian terkait toksisitas kulit nanas masih terbatas. Penelitian ini bertujuan menentukan toksisitas akut ekstrak air kulit nanas menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Uji pendahuluan menggunakan 10 ekor larva *Artemia salina* dalam 10 mL ekstrak air kulit nanas dengan konsentrasi 10000;1000;100;10;1; 0,1 ppm. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah kematian dan kerusakan morfologi larva *Artemia salina* setelah 24 jam. Data jumlah kematian larva dianalisis dengan analisa probit menggunakan perangkat *Microsoft Excel* dan dihasilkan nilai LC_{50} . Data pengamatan kerusakan morfologi larva *Artemia salina* dianalisis secara deskriptif. Hasil uji pendahuluan berupa rentang konsentrasi untuk uji definitif yaitu 100; 251; 630; 1583; 3975; 6987; dan 10000 ppm. Nilai LC_{50} yang didapatkan berdasarkan uji definitif 1185 ppm. Kerusakan morfologi larva *Artemia salina* akibat paparan ekstrak air kulit nanas terjadi di bagian antennula, apendages, perut, dan saluran pencernaan. Ekstrak air kulit nanas termasuk kategori tidak toksik dengan nilai $LC_{50} > 1000$ ppm. Kerusakan morfologi larva *Artemia salina* terjadi pada konsentrasi 630-10000 ppm.

Kata Kunci: BSLT, kulit nanas, toksisitas akut.

Article History:

Submitted 12 July 2023

Revised 10 July 2024

Accepted 23 July 2024

Published 19 March 2025

*Corresponding author:

fardiaz.abd@gmail.com

Citation:

Fardiaz, M.A.; Pratama, I.S.; Aini, S.R. Acute Toxicity Test of Pineapple Peel Aqueous Extract (*Ananas comosus* L.) with BSLT Method. Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology. 2025; 12 (1), 93-99.

1. Pendahuluan

Nanas merupakan salah satu buah yang banyak diproduksi di seluruh dunia, termasuk di Indonesia. Pada tahun 2020 produksi nanas di seluruh dunia mencapai 27.816.403 ton, di Indonesia sebesar 2.447.243 ton.^{1,2} Daerah penghasil nanas terbanyak di Indonesia diantaranya adalah Nusa Tenggara Barat dengan produksi mencapai 83.463 ton.² Produksi nanas yang besar sejalan dengan limbah yang dihasilkan. Kulit nanas merupakan bagian limbah yang paling banyak dihasilkan sekitar 612 ton pertahun sekitar 30-42% dari bagian buah.³

Daur ulang berguna untuk mengurangi timbunan limbah, karena limbah diolah menjadi bahan yang dapat digunakan kembali. Limbah yang didaur ulang dapat diubah menjadi produk baru yang jenisnya hampir sama atau sama dengan produk lain.⁴ Limbah kulit nanas dapat diolah menjadi produk olahan pangan, pakan ternak, bioenergi, pupuk organik, pengharum ruangan, dan sediaan farmasi.^{5,6}

Salah satu produk sediaan farmasi dari ekstrak kulit nanas adalah jus kulit nanas 25% b/v berkhasiat sebagai anticacing. Telah terbukti efektif terhadap *Paramphistomum* sp. dengan indeks kelangsungan hidup dan nilai motilitas relatif sebanding dengan Albendazol 10% b/v.⁷ Penelitian tersebut masih dalam tahap uji praklinik. Uji praklinik meliputi studi efek farmakologi dan toksikologi kandidat obat yang memberikan informasi khasiat dan keamanan kandidat obat.⁸ Uji toksisitas adalah studi untuk mengetahui efek toksik dari suatu zat dengan menganalisis hasil paparan pada organisme uji.⁹

Uji toksisitas in vitro yang umum digunakan dalam deteksi bioaktivitas ekstrak tumbuhan adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Keuntungan BSLT meliputi teknik yang cepat sekitar 24 jam, sederhana, non-aseptis, mudah dikerjakan, murah, dan bahan uji yang digunakan berjumlah kecil berkisar 2-20 mg.¹⁰ Nilai LC₅₀ (*Lethal Concentration 50*) ekstrak etanol dan hidroalkohol kulit nanas dengan metode BSLT berturut-turut 29,6 µg/mL bersifat sangat toksik dan 770 µg/mL bersifat sedikit toksik.^{11,12} Uji toksisitas ekstrak air kulit nanas dengan metode BSLT belum dilakukan. Ekstrak air kulit nanas sudah dikembangkan sebagai sediaan farmasi sehingga keamanannya perlu dievaluasi melalui uji toksisitas.

2. Bahan dan Metode

2.1. Alat

Aerator (Yamano®), gelas kimia 10 mL (Duran®), gelas kimia 200 mL (Pyrex®), labu ukur 10 mL (Iwaki®), labu

ukur 25 mL (Iwaki®), lampu pijar (Philips®), indikator universal (Mcolorphast®), timbangan analitik (Ohaus®), blender (Philips®), termometer akurarium (Effosola)

2.2. Bahan

Air, air laut, kulit buah nanas, kalium dikromat (Emsure®), dan telur *Artemia salina* (Supreme Plus®).

2.3. Prosedur

2.3.1. Penyiapan Sampel

Sampel berupa nanas diambil di Desa Lendang Nangka Utara, Kecamatan Masbagik, Kabupaten Lombok Timur, Provinsi Nusa Tenggara Barat. Buah nanas dan bagian-bagian tumbuhan nanas dibawa ke Laboratorium Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Mataram untuk dideterminasi.

Sampel berupa telur *Artemia salina* diperoleh dari toko ikan komersil secara online. Identifikasi sampel telur *Artemia salina* dilakukan dengan cara membawa sampel ke Laboratorium Kesehatan Ikan, Jurusan Perikanan dan Ilmu Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Mataram.

2.3.2. Pembuatan Ekstrak Air Kulit Nanas

Sejumlah 5 buah nanas dikupas dan bagian kulit diambil. Setelah itu disortir, dibersihkan dengan air mengalir, dan dipotong memanjang menggunakan pisau hingga menjadi ukuran lebih kecil. Setelah itu, kulit nanas ditimbang sejumlah 25 gram dan dimasukkan kedalam blender, kemudian ditambahkan 100 mL air hingga diperoleh jus dengan konsentrasi 25% b/v.⁷

2.3.3. Penetasan Telur *Artemia salina*

Akuarium penetasan diisi dengan air laut sejumlah 4 liter. Setelah itu, telur *Artemia salina* ditimbang sebanyak 100 mg menggunakan timbangan analitik kemudian dimasukkan kedalam bagian gelap akuarium. Bagian gelap akuarium diaerasi menggunakan aerator sebagai penyuplai oksigen dan diberikan pencahayaan lampu pijar 60 Watt. Telur *Artemia salina* dibiarkan selama 48 jam untuk melalui proses penetasan menjadi larva.¹³

2.3.4. Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan dengan variasi konsentrasi ekstrak air kulit nanas 10.000; 1.000; 100; 10; 1; dan 0,1 ppm.^{13,14} Tiap-tiap konsentrasi diambil sebanyak 10 mL dan dimasukkan kedalam gelas kimia 10 mL. Setelah itu, sejumlah 10 ekor larva *Artemia salina* dimasukkan ke dalam masing-masing gelas kimia

10 mL dan dibiarkan selama 24 jam. Setelah 24 jam diamati jumlah kematian larva. Selanjutnya ditentukan konsentrasi terkecil ekstrak air kulit nanas yang menyebabkan kematian larva *Artemia salina* (batas bawah) dan konsentrasi terbesar ekstrak air kulit nanas yang menyebabkan kematian larva *Artemia salina* (batas atas). Setelah itu, dilakukan perhitungan faktor penyebar dengan menggunakan rumus berikut.¹⁵

$$F = \sqrt[r]{l}$$

Keterangan:

F = Faktor penyebar

r = Jumlah variasi konsentrasi – 1

l = Batas atas / batas bawah

2.3.5. Uji Nyata

Pada uji nyata digunakan tujuh konsentrasi larutan uji ekstrak air kulit nanas (100; 251; 630; 1583; 3975; 6987; 10000 ppm), satu kontrol negatif yaitu air laut, dan satu kontrol positif yaitu kalium dikromat 39,06 ppm. Tiap-tiap konsentrasi diambil sebanyak 10 mL dan dimasukkan kedalam gelas kimia 10 mL. Setelah itu, sejumlah 10 ekor larva *Artemia salina* dimasukkan ke dalam masing-masing gelas kimia 10 mL dan dibiarkan selama 24 jam. Setelah 24 jam diamati jumlah kematian larva.

2.3.6. Pengamatan Morfologi Larva *Artemia salina*

Morfologi larva *Artemia salina* pada bagian tubuh yang telah terpapar larutan uji definitif selama 24 jam diamati menggunakan mikroskop cahaya binokuler dengan perbesaran total 100x. Pengamatan morfologi dilakukan dengan cara sejumlah 1 ekor larva *Artemia salina* dari masing-masing konsentrasi uji diambil dengan pipet Pasteur dan diletakkan pada kaca objek, kemudian kaca objek ditutup menggunakan kaca penutup.

3. Hasil

3.1. Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk menentukan rentang konsentrasi yang akan digunakan pada uji nyata.

Tabel 1. Data Hasil Uji Pendahuluan Ekstrak Air Kulit Nanas

Konsentrasi (ppm)	Jumlah Kematian Larva
10.000 ^{a)}	10
1000	3
100 ^{b)}	1
10	0
1	0
0,1	0

Keterangan : a) = batas atas; b) = batas bawah

Pada penelitian ini dilakukan uji pendahuluan dengan konsentrasi 10.000; 1000; 100; 10; 1; 0,1 ppm. Hasil uji pendahuluan tercantum pada tabel 1.

3.2. Uji Nyata

Uji nyata dilakukan menggunakan tujuh konsentrasi yaitu 100; 251; 630; 1583; 3975; 6987; dan 10000 ppm. Data hasil uji nyata tercantum pada tabel 2. Dari data tersebut dilakukan analisis data dengan metode probit. Hasil dari logaritma konsentrasi dengan probit dibuat persamaan regresi linier yang tercantum pada gambar 1. Validasi terhadap uji nyata dilakukan menggunakan dua parameter yaitu kontrol negatif air laut dan kontrol positif larutan kalium dikromat 39,06 ppm yang tercantum pada tabel 3.

3.3. Morfologi larva *Artemia salina*

Gambaran kerusakan morfologi larva *Artemia salina* diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran total 100x. Keseluruhan gambar kerusakan morfologi larva *Artemia salina* tercantum pada gambar 2.

4. Pembahasan

4.1. Identifikasi Sampel

Determinasi bertujuan untuk mengetahui identitas tumbuhan uji.¹⁶ Berdasarkan surat nomor 27/UN.F5/J3.4.PP/2023 yang dikeluarkan oleh Laboratorium Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Mataram menunjukkan bahwa sampel uji adalah tumbuhan nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.). Identifikasi hewan uji bertujuan untuk mengetahui identitas dari hewan uji yang digunakan. Berdasarkan surat nomor 011/UN18.F4.LKI/JPIK/2023 yang dikeluarkan oleh Laboratorium Kesehatan Ikan, Jurusan Perikanan dan Ilmu Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Mataram menunjukkan bahwa hewan uji adalah *Artemia salina*.

4.2. Penetasan *Artemia salina*

Pada saat proses penetasan sista menjadi larva, parameter suhu, pH, dan salinitas air laut dicatat

Tabel 2. Data Hasil Uji Nyata Ekstrak Air Kulit Nanas

Konsentrasi (ppm)	Logaritma Konsentrasi	Jumlah Kematian			Rerata	Persentase Kematian (%)	Probit
		PI	RI	RII			
10000	4,0	10	10	10	10	100	6.965
6987	3,8	8	9	9	8,7	87	6.130
3975	3,6	7	7	8	7,3	73	5.610
1583	3,2	4	5	6	5,0	50	5.000
630	2,8	2	4	4	3,3	33	4.560
251	2,4	1	2	3	2,0	20	4.160
100	2,0	0	0	1	0,3	3	3.120

Keterangan: PI = percobaan I; RI = replikasi I; RII = replikasi II

dan disesuaikan dengan kondisi penetasan *Artemia salina* yaitu temperatur air laut 28-30°C, pH 7,5 - 9 , dan salinitas 35-40 ppt.¹⁷ Hasil dari penetasan sista *Artemia salina* selama tiga hari adalah larva *Artemia salina* instar III seperti yang ditunjukkan pada gambar 3. Larva tergolong instar III karena memiliki antena, antenula, mandibula, tiga pasang appendages, dan saluran pencernaan yang lengkap.¹⁸

4.3. Uji Pendahuluan

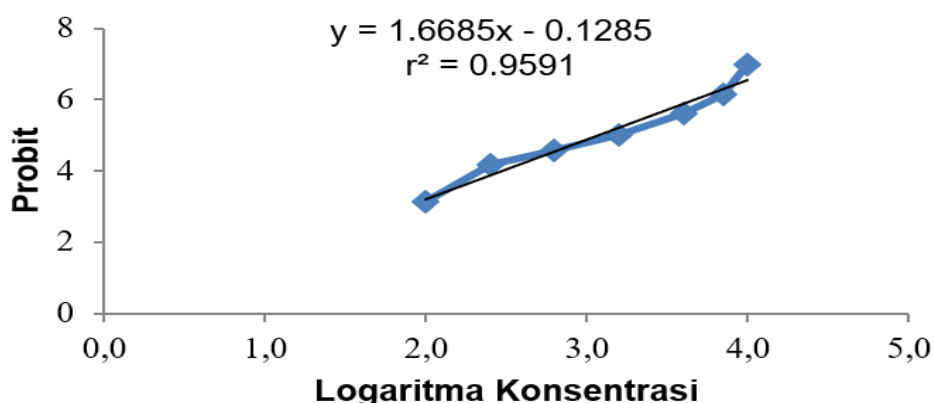
Pada uji pendahuluan diperoleh batas konsentrasi terkecil ekstrak air kulit nanas yang dapat menyebabkan kematian larva *Artemia salina* (batas bawah) yaitu 100 ppm dan konsentrasi terbesar ekstrak air kulit nanas yang dapat menyebabkan kematian larva *Artemia salina* (batas atas) yaitu 10.000 ppm. Untuk mencari rentang konsentrasi yang akan digunakan pada uji nyata perlu terlebih dahulu dihitung faktor penyebar dengan menggunakan rumus faktor penyebar diperoleh nilai 2,51. Rentang konsentrasi yang digunakan untuk uji nyata berdasarkan hasil uji pendahuluan yaitu konsentrasi 100; 251; 630; 1583; 3975; dan 10000 ppm.

4.4. Uji Nyata

Uji nyata dilakukan menggunakan enam seri konsentrasi berdasarkan hasil dari uji pendahuluan,

namun ditambah satu konsentrasi agar titik sebaran data kematian pada grafik LC₅₀ menjadi lebih linier. Konsentrasi tambahan dihitung dari konsentrasi tengah rentang 3975 – 10000 ppm dengan pertimbangan pada rentang tersebut masih terdapat data kematian larva yang berbeda dengan konsentrasi lain, sehingga pada uji nyata digunakan tujuh konsentrasi yaitu 100; 251; 630; 1583; 3975; 6987; dan 10000 ppm. Analisis data dilakukan terhadap logaritma konsentrasi terhadap probit. Nilai probit didapat berdasarkan persentase kematian yang dikonversi kedalam tabel probit, apabila terdapat persentase kematian 100% maka digunakan rumus koreksi persen kematian. Hasil dari logaritma konsentrasi dengan probit dibuat persamaan regresi linier yang tercantum pada gambar 1. Pada kurva hubungan antara logaritma konsentrasi terhadap probit didapatkan nilai $r^2 = 0,9591$. Nilai r^2 yang diperoleh memenuhi persyaratan minimum dari nilai r^2 untuk uji toksisitas yaitu 0,6-0,8.19 Kategori nilai r^2 tergolong kuat karena nilai lebih dari 0,75.²⁰ Nilai r^2 sebesar 0,9591 menunjukkan korelasi positif antara logaritma konsentrasi ekstrak air kulit nanas (x) dengan nilai probit (y). Semakin tinggi konsentrasi dan nilai logaritma konsentrasi maka semakin tinggi persentase kematian, ketika persentase kematian tinggi maka nilai probit akan tinggi juga.

Nilai LC₅₀ yang didapatkan menggunakan metode probit dengan perangkat lunak *Microsoft Excel* yaitu



Gambar 1. Kurva Hubungan Antara Logaritma Konsentrasi Terhadap Probit

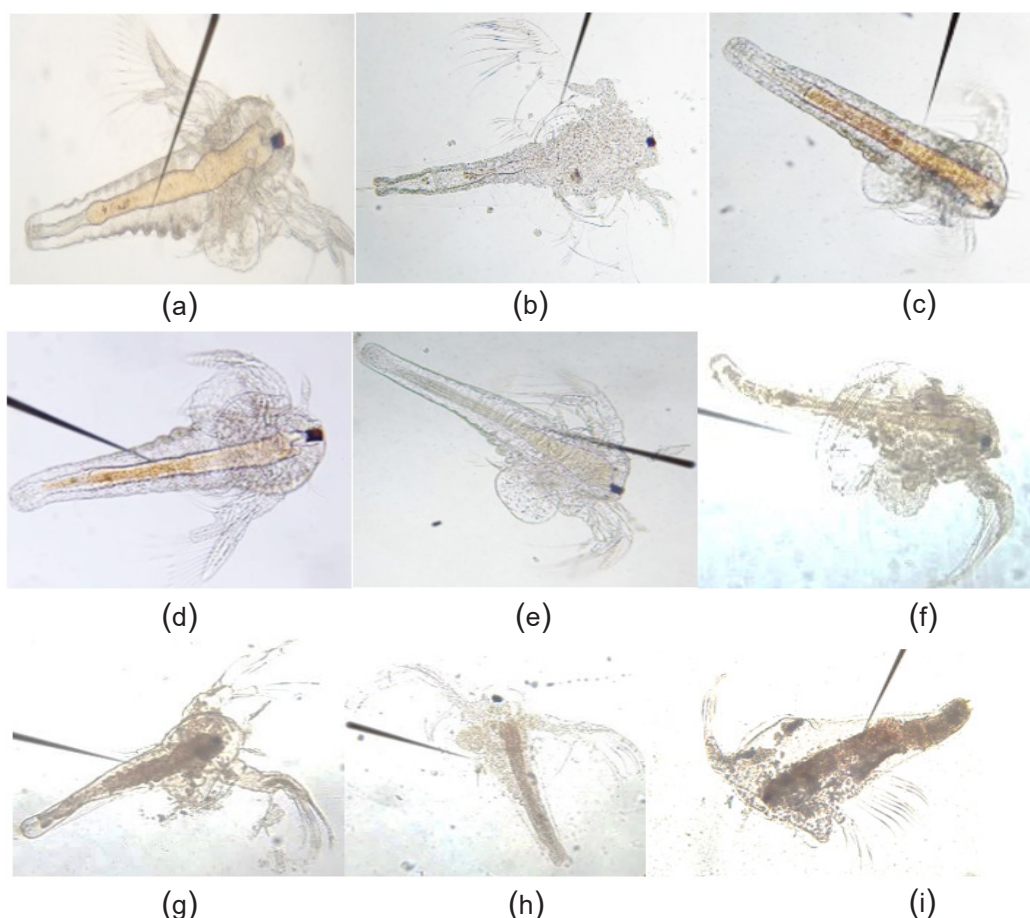
Tabel 3. Data hasil validasi uji nyata

Parameter	Jumlah Kematian			Rerata	Persentase Kematian (%)
	PI	RI	RII		
Kontrol negatif (air laut)	0	0	0	0	0
Kontrol positif (larutan kalium dikromat 39,06 ppm)	5	5	5	5	50

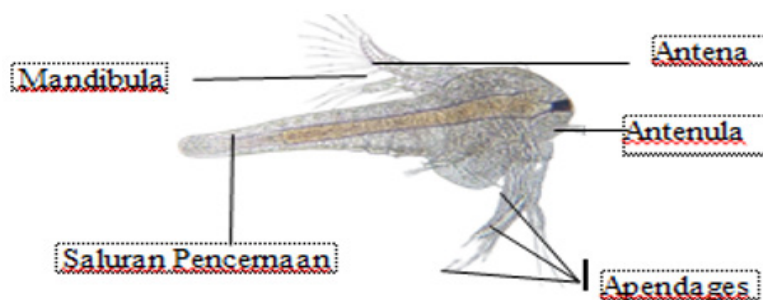
Keterangan: PI = percobaan I; RI = replikasi I; RII = replikasi II

sebesar 1185 ppm. Berdasarkan kriteria toksisitas Clarkson's nilai $LC_{50} > 1000$ ppm termasuk dalam kategori tidak toksik.¹⁷ Pada tingkat kepercayaan 95% didapatkan nilai selang kepercayaan yaitu 2,56-3,70. Selang kepercayaan menggambarkan rentang nilai logaritma konsentrasi yang menunjukkan nilai LC_{50} . Nilai dari logaritma konsentrasi masuk didalam rentang selang kepercayaan sehingga nilai LC_{50} dikatakan akurat. Parameter lain untuk mengukur akurasi yaitu kesalahan standar yang didapatkan nilai sebesar 0,284. Kesalahan standar menunjukkan ketepatan estimasi nilai sesungguhnya dari LC_{50} yang didapatkan. Semakin kecil nilai kesalahan standar maka akan mendekati nilai sesungguhnya.²¹ Kesalahan standar yang diterima dalam penelitian tidak melebihi nilai 0,9.²²

Validasi terhadap uji nyata dilakukan menggunakan dua parameter yaitu kontrol negatif dan kontrol positif. Hasil uji nyata dikatakan valid apabila persentase kematian pada kontrol negatif tidak melebihi 10%. dan persentase kematian pada kontrol positif kalium dikromat memenuhi nilai LC_{50} teoritis.¹⁴ Hasil uji nyata pada kontrol negatif dengan tiga kali percobaan didapatkan persentase kematian 0% dan dikatakan valid karena tidak melebihi 10%. Pada kontrol positif kalium dikromat konsentrasi 39,06 ppm dengan tiga kali percobaan didapatkan persentase kematian 50%, hal ini sesuai dengan teori bahwa nilai LC_{50} termasuk kategori super toksik.²³ Hasil percobaan dikatakan valid karena memenuhi parameter validitas kedua kontrol.



Gambar 2. Morfologi larva *Artemia salina*. (a) kontrol negatif air laut; (b) kontrol positif larutan kalium dikromat konsentrasi 39,06 ppm; (c) ekstrak air kulit nanas konsentrasi 100 ppm; (d) ekstrak air kulit nanas konsentrasi 251 ppm; (e) ekstrak air kulit nanas konsentrasi 630 ppm; (f) ekstrak air kulit nanas konsentrasi 1583 ppm; (g) ekstrak air kulit nanas konsentrasi 3975 ppm; (h) ekstrak air kulit nanas konsentrasi 6987 ppm; (i) ekstrak air kulit nanas konsentrasi 10000 ppm



Gambar 3. Larva *Artemia salina* instar III

4.5. Gambaran Kerusakan Morfologi Larva *Artemia salina*

Gambaran kerusakan morfologi larva *Artemia salina* diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran total 100x. Tujuan dilakukan pengamatan adalah untuk mengetahui kerusakan morfologi larva *Artemia salina* akibat paparan ekstrak air kulit nanas. Pada konsentrasi 100 dan 251 ppm menunjukkan telah terjadi akumulasi ekstrak pada bagian perut, namun tidak terjadi kerusakan morfologi larva *Artemia salina* yang menyerupai morfologi kontrol negatif. Kerusakan morfologi larva *Artemia salina* mulai terjadi pada konsentrasi 630 ppm. Pada konsentrasi 630 ppm bagian-bagian tubuh larva *Artemia salina* masih lengkap seperti pada kontrol negatif, tetapi terjadi perubahan warna tubuh larva yang menyerupai kontrol positif. Hal ini dapat disebabkan karena kekurangan kadar oksigen pada tubuh larva yang menyebabkan warna tubuh menjadi pucat.²⁴ Pada konsentrasi 1583, 3975, dan 6987 ppm bagian antenula mengalami perubahan bentuk. Pada bagian antenula terlihat seperti terjadi pelipatan yang mengakibatkan struktur antenula mengalami perubahan bentuk. Antenula normal berbentuk tabung silinder yang berfungsi sebagai alat peraba.²⁵ Pada bagian membran luar yaitu eksoskeleton yang tersusun atas kerangka luar kitin yang tipis telah rusak akibat paparan ekstrak, sehingga menyebabkan ekstrak dapat masuk ke dalam tubuh larva dan menumpuk di bagian perut. Pada bagian perut mengalami perubahan warna menjadi kecoklatan yang menunjukkan terjadi akumulasi ekstrak dalam jumlah besar di bagian perut. Kerusakan pada antenula, membran luar, dan perut dapat menyebabkan gangguan osmoregulasi berupa kelebihan cairan dalam tubuh yang mempengaruhi proses pencernaan.²⁶ Pada konsentrasi 10000 ppm terjadi kerusakan morfologi berupa kehilangan antenula dan bagian appendages. Appendages merupakan alat gerak pada larva *Artemia salina* yang berjumlah tiga pasang.¹⁸ Apabila terjadi kerusakan atau kehilangan pada bagian antenula dan appendages dapat menyebabkan gangguan stimulus dan pergerakan.²⁷ Pada konsentrasi 10000 ppm bagian penajut dan saluran pencernaan larva

Artemia salina mengalami perubahan warna menjadi hitam kecoklatan disertai dengan perubahan struktur tubuh menjadi tidak beraturan. Perubahan warna disebabkan karena penumpukan ekstrak di bagian perut dan saluran pencernaan, sedangkan perubahan struktur tubuh pada perut dan saluran pencernaan terjadi karena peningkatan tegangan permukaan membran sel yang merusak bagian kitin pada eksoskeleton.²⁶ Seluruh tubuh larva ditutupi dengan kerangka luar kitin yang tipis dan fleksibel tempat otot-otot melekat secara internal. Kerusakan kerangka luar kitin dapat disebabkan karena pengaruh pH ekstrak air kulit nanas yang bersifat asam.

5. Simpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan ekstrak air kulit nanas 25% b/v memiliki nilai LC₅₀ sebesar 1185 ppm termasuk dalam kategori tidak toksik. Gambaran kerusakan morfologi larva *Artemia salina* akibat paparan ekstrak air kulit nanas terjadi pada konsentrasi 630, 1583, 3975, 6987, dan 10000 ppm. Kerusakan terjadi di bagian antenula, appendages, perut, dan saluran pencernaan.

Konflik Kepentingan

Penulis menyampaikan bahwa data yang dipublikasikan dalam naskah ini tidak memiliki konflik kepentingan dengan pihak manapun.

Referensi

1. Food and Agriculture Organization. World production quantity pineapples 2020 [Internet]. 2020 [cited 2022 September 1]. Available from: <https://fao.org/faostat/en/#data/QC>
2. Badan Pusat Statistik. Produksi buah-buahan 2020 [Internet]. 2020 [cited 2022 September 1]. Available from: <http://www.bps.go.id/indicator/55/62/produksi-tanaman-buah-buahan.html>
3. Sandika, A. S., Muria, S. R. & Yenti, S. R. Fermentasi kulit nanas menjadi bioetanol menggunakan *Zymomonas mobilis* dengan variasi pemekatan medium dan waktu fermentasi. Jurnal Online Mahasiswa Fakultas Teknik. 2017;4(1).

4. Suhartini, S., & Nurika I. Teknologi pengolahan limbah agroindustri. Malang: UB Press; 2018.
5. Rabi, Z., Maigari, F.U., Lawan, U., & Mukhtar, Z.G. Pineapple waste utilization as a sustainable means of waste. Singapore City: Springer Nature; 2018.
6. Salve, R.R., & Ray, S. Green extraction of polyphenolics as potential bioactive components from pineapple skin: a review. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2021;12(2).
7. Damiyati, S.Y., Pratama, I.S., & Tresnani, G. *In vitro* anthelmintic activity of pineapple peel juice (ananas comosus (L.) Merr.) Against paramphistomum sp. Communications in Science and Technology. 2021;6(1).
8. Guha, R. Preclinical pharmacology and toxicology: an important aspect in drug discovery. Advances in Clinical Toxicology. 2016;1(1).
9. Klaassen C, & Watkins J. Casarett & Doull's essentials of toxicology. 4th ed. New York: McGraw Hill Education; 2021.
10. Colegate S.M., & Molyneux R.J. Bioactive natural products detection, isolation, and structural determination. 2nd ed. Florida: CRC Press; 2008.
11. Evangelista, J. H., Vera, M. J. De, Garcia, R. S., Joven, M. G., & Solidum, J. N. Preliminary assessment of *in vitro* anticoagulant activity vs heparin 1000 iu and cytotoxicity of selected philippine medicinal plants. International Journal of Chemical and Environmental Engineering Preliminary. 2012;3(6).
12. Paixao, J.A.D., Neto, J.F.D.A., Nascimento, B.O.D., Costa, D.M.D., Brandao, H.N., Souza, F.V.D., Alves, Q.L., Erling, S.B.L., & David, J.P.D.L. Pharmacological actions of ananas comosus L. merrill: revision of the works published from 1966 to 2020. Pharmacognosy Reviews. 2021;15(29).
13. Sarah, Q. S., Anny, F. C., & Misbahuddin, M. Brine shrimp lethality assay. Bangladesh Journal of Pharmacology, 2017;12(2).
14. Vanhaecke, P., Persoone, G., Claus, C., & Sorgeloos, P. Proposal for a short-term toxicity test with artemia nauplii. Ecotoxicology and Environmental Safety. 1981;5(3).
15. Lazuardi, M. Bagian umum ilmu farmasi veteriner. Jakarta: Ghalia Indonesia; 2016.
16. Ngakan O.P., Nasri N., Hamzah A.S., Wahyudi., Karim H.A., & Maulany R.I. Dendrologi: dasar-dasar mengenal pohon. Makassar: Fakultas Kehutanan Universitas Hasanuddin; 2022.
17. Hamidi, R.M., Jovanova, B., & Kadifkova, P.T. Toxicological evaluation of the plant products using brine shrimp (*artemia salina* L.) Model. Macedonian Pharmaceutical Bulletin. 2014;60(1).
18. Obregon E.B., & Vargas A. Chronic toxicity bioassay with populations of the crustacean *artemia*. Biol Res. 2010;43.
19. Mounts, I.D. Methods for aquatic toxicity identification evaluations. Minnesota: National Effluent Toxicity Assessment Center; 1989.
20. Hair J.F., Black W.C., Babin B.J., & Anderson R.E. Multivariate data analysis. New York: Prentice Hall; 2011.
21. Lind A., Douglas, William G. Marchal, & Samuel A.W. Statistical techniques in business & economics. New York: McGraw Hill; 2005.
22. Tighe, J., McManus, I. C., Dewhurst, N. G., Chis, L., & Mucklow, J. The standard error of measurement is a more appropriate measure of quality for postgraduate medical assessments than is reliability: an analysis of mrcp(uk) examinations. BMC Medical Education. 2010;10(1).
23. Ayoub, N., Kaouthar, E. B., Soumaya, R., Chaimaa, M., Nadia, I., & Souad, E. A. Evaluation of the effects of three chemical fertilizers on artemia salina. Journal of Ecological Engineering. 2023; 24(5).
24. Silva, R. M. D., Miguel, T. B. A. R., de Castro Miguel, E., Campelo, P. H., Fernandes, F. A. N., & Rodrigues, S. Protective effect of ultrasound-processed amazonian sapota-do-solimões (*quararibea cordata*) juice on artemia salina nauplii. Processes. 2022;10(9).
25. Abatzopoulos, T.J., Beardmore, J.A., Clegg, J.S., & Sorgeloos, P. Artemia basic and applied biology. Berlin: Springer; 2002.
26. Lo Nostro, P., Ninham, B.W., Carretti, E., Dei, L., & Baglioni, P. Specific anion effects in artemia salina. Chemosphere. 2015;335.
27. Najla, M. A., Syaizwan, Z.Z., Ahmad I., Azmai N.M.A., & Yusuf F.M. Selected morphological changes in nauplii of brine shrimp (*artemia salina*) after tributyltin chloride (tbtcl) exposure. World Applied Sciences Journal, 2015;33(8).