

## UJI TOKSISITAS EKSTRAK CACING TAMBELO (*Bactronophorus thoracites*) DENGAN METODE BRINE SHRIMP LETHALITY TEST

Lely Okmawaty Anwar, Sri Fatmah Sari\*, Asrul Ambo Elo, Rosmawati,  
Iin Nurdiyanty Nurdin, Anwar Said

Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Muhammadiyah Kendari

Diterima: 10 Maret 2021/Disetujui: 21 Agustus 2021

\*Korespondensi: srifatma.sari@umkendari.ac.id

**Cara sitasi:** Anwar LO, Sari SF, Elo AA, Rosmawati, Nurdin IN, Said A. 2021. Uji toksisitas ekstrak cacing tambelo (*Bactronophorus thoracites*) dengan metode brine shrimp lethality test. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 24(2): 243-248.

### Abstrak

Cacing tambelo merupakan moluska yang menetap pada batang *Rhizophora* sp yang sudah mati. Studi ini bertujuan untuk menentukan tingkat toksisitas dari ekstrak cacing tambelo dengan metode *brine shrimp lethality test* (BSLT). Cacing tambelo diambil dari hutan mangrove di Desa Moolo, Kecamatan Batukara, Kabupaten Muna, Sulawesi Tenggara. Ekstrak cacing tambelo dipreparasi memakai larutan metanol. Uji toksisitas BSLT pada penelitian ini terdiri atas dua tahap, uji preliminary dan uji definitif. Uji preliminary bertujuan untuk menentukan kisaran *lethal concentration* ( $LC_{50}$ ), nilai kisaran konsentrasi tersebut akan digunakan pada uji selanjutnya (uji definitif). Uji preliminary menggunakan konsentrasi ekstrak tambelo sebesar 10, 100, 1.000  $\mu\text{g/mL}$  dan 0 sebagai kontrol. Uji definitif menggunakan 4 konsentrasi (masing-masing 3 ulangan) yaitu: 17,78; 31,61; 56,21; 99,94  $\mu\text{g/mL}$  dan 0 sebagai kontrol. Data yang diperoleh dari uji definitif selanjutnya dianalisis dengan probit. Hasil analisis tersebut menunjukkan bahwa nilai  $LC_{50}$ -24jam dari ekstrak tambelo ialah 42,43  $\mu\text{g/mL}$ . Nilai  $LC_{50}$  tersebut mengindikasikan bahwa ekstrak cacing tambelo bersifat sangat toksik terhadap larva udang.

Kata kunci: *brine shrimp*, ekstrak tambelo, *lethal concentration*, toksisitas

### Toxicity Test of Wood-boring Shipworm (*Bactronophorus thoracites*) using Brine Shrimp Lethality Test

#### Abstract

Shipworm, local name *tambelo*, is an organism that live on dead *Rhizophora* sp timbres. The objective of this research was to determine the toxicity of shipworm extract using brine shrimp lethality test. Shipworm were collected from mangrove forests of Moolo Village, Batukara Subdistrict, Muna District, in Southeast Sulawesi. Extract of shipworm was prepared using methanol solvent. Toxicity test by brine shrimp lethality test was done through two stages of testing, preliminary and definitive test. Preliminary test was aimed to determine the range of lethal concentration ( $LC_{50}$ ), this range was used in the next definitive test. The preliminary test used a concentration of 10, 100, 1,000; and 0  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  as control. The definitive test used 4 concentrations in triplicates, 17,78, 31,61, 56,21, 99,94, and 0  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  as control. Data obtained from definitive test were subjected to probic analysis. The analysis showed that  $LC_{50}$ -24hours of tambelo extract was equal to 42,431  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ .  $LC_{50}$  value indicated that the toxicity of shipworm was very toxic to brine shrimp.

Keywords: brine shrimp, lethal concentration, wood-boring shipworm extract, toxicity

## PENDAHULUAN

Saat ini, penelitian mengenai potensi senyawa bioaktif yang berasal dari beberapa organisme laut sudah mendapat banyak perhatian. Bahan alami dari laut (*marine natural product*) sudah diinisiasi sejak sepuluh tahun terakhir ini (Haris dan Werorilangi 2009). Beberapa biota laut di antaranya adalah: karang, spons, alga, dan lamun telah diteliti dapat menjadi bahan baku obat baru. Namun, cacing tambelo (*Bactronophorus thoracites*) masih digolongkan sebagai bahan alami dalam pengembangan bahan baku obat.

Cacing tambelo adalah hewan pengerat kayu yang hidup pada batang kayu bakau yang lapuk dan telah membusuk, organisme ini dikelompokkan kedalam filum bivalvia, kelas Myoida, ordo Teredinidae (Turner 1971). Hasil penelitian terdahulu membuktikan bahwa cacing tambelo memiliki kandungan senyawa bioaktif. Leiwakabessy (2011) menyatakan bahwa ekstrak tambelo mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, dan steroid. Anwar (2015) juga melaporkan bahwa tambelo ditemukan pada batang *Rhizophora* sp. terdeteksi mengandung kelompok senyawa kimia alkaloid, flavonoid, steroid, peptida, karbohidrat, fenol hidrokuinon, gula pereduksi, dan asam amino. Riviani *et al.* (2016) juga telah melakukan penelitian tentang profil asam amino, asam lemak, kandungan mineral tambelo (*Bactronophorus* sp.) dari Kendari Sulawesi Tenggara demikian juga Anwar *et al.* (2014) yang meneliti fermentasi tambelo dan karakteristik produknya.

Tambelo telah dikonsumsi oleh beberapa masyarakat karena dipercaya dapat menyembuhkan berbagai penyakit. Menurut Hardinsyah *et al.* (2006) Suku Kamoro di Kabupaten Mimika, Papua, mempercayai bahwa tambelo “*koo*” berkhasiat menyembuhkan beberapa penyakit, antara lain: rematik, sakit pinggang, flu, batuk, malaria, serta dapat menjadi *asi booster*, menambah nafsu makan dan meningkatkan vitalitas pria. Sementara itu, di Brazil Utara, tambelo “*туру*” (*Teredinidae*) sangat populer digunakan untuk mengobati penyakit menular (Trindade-Silva *et al.* 2009).

Pengujian BSLT telah digunakan untuk menguji toksisitas berbagai macam ekstrak

organisme laut (Carballo *et al.* 2002). Uji BSLT menggunakan larva udang (*Artemia salina*) adalah salah satu pengujian toksisitas yang dapat dilakukan dengan cepat, praktis, ekonomis dan aman untuk skrining, fraksinasi, dan menentukan bioaktivitas senyawa pada bahan alami. *National Cancer Institute United State of America* (NCI USA) menyatakan bahwa terdapat signifikansi antara pengujian toksisitas terhadap nauplius udang (*Brine Shrimp Lethality Test*) pada penghambatan sel tumor manusia yang dilakukan secara *in vitro*.

Pengujian BSLT awalnya dikembangkan oleh Michael *et al.* (1956) dan kemudian diadaptasi oleh Vanhaecke *et al.* (1981), Meyer *et al.* (1982), Sleet dan Brendel (1983). Uji toksisitas BSLT ini termasuk uji toksisitas akut, efek toksik dari suatu senyawa dapat ditentukan dalam waktu yang singkat, dalam rentang waktu selama 24 jam setelah pemberian dosis uji. Suatu ekstrak dikategorikan toksik berdasarkan metode BSLT jika nilai  $LC_{50} < 1.000 \mu\text{g/mL}$  (Meyer *et al.* 1982).

Uji toksisitas beberapa organisme laut menggunakan metode BSLT juga telah dilakukan oleh beberapa peneliti. Albuntana *et al.* (2011) melaporkan bahwa, ekstrak empat jenis teripang suku *Holothuridae* yang diambil dari pulau Penjaliran Timur, Kepulauan Seribu, Jakarta, bersifat toksik dengan nilai  $LC_{50}$  yaitu, *Actinopyga miliaris* (70,54  $\mu\text{g/mL}$ ), *Holothuria leucospilota* (73,56  $\mu\text{g/mL}$ ), *Bohadschia argus* (69,25  $\mu\text{g/mL}$ ), dan *Bohadschia marmorata* (77,06  $\mu\text{g/mL}$ ). Uddin *et al.* (2013) melaporkan bahwa, ekstrak hati ikan buntal bersifat sangat toksik dengan nilai  $LC_{50} = 0,75 \mu\text{g/mL}$ . Martiningsih (2013) melaporkan bahwa, ekstrak etil asetat spons *Leucetta* sp. bersifat toksik dengan nilai  $LC_{50}$  sebesar 104,47  $\mu\text{g/mL}$ .

Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan toksisitas ekstrak cacing tambelo (*Bactronophorus thoracites*) dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Sedangkan manfaat penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan untuk penelitian lebih lanjut mengenai potensi antikanker dari cacing tambelo (*Bactronophorus thoracites*).

## METODE

### Ekstraksi Tambelo

Ekstraksi cacing tambelo terdiri dari penimbangan, perendaman, penyaringan, dan penguapan. Perendaman dilakukan dengan metode maserasi (Khopkar 2003). Sampel sebanyak 100 g dimaserasi menggunakan pelarut metanol selama 3x24 jam, perlakuan ini dilakukan pada suhu ruang dan tetapi terhindar dari cahaya. Filtrat yang diperoleh dipisahkan menggunakan evaporator putar untuk memperoleh ekstrak cacing tambelo pekat, dan ekstrak tersebut diangin-anginkan agar sisa metanol menguap. Ekstrak ini selanjutnya digunakan sebagai sampel uji.

### Uji Toksisitas (BSLT)

Pada penelitian ini, uji toksisitas dilakukan dengan dua tahap pengujian, yaitu uji pendahuluan dan uji definitif.

Uji pendahuluan dilaksanakan untuk mengetahui nilai rentang konsentrasi ekstrak yang dapat mematikan minimal 50% hewan uji. Uji pendahuluan terdiri dari penyiapan hewan uji, pembuatan konsentrasi ekstrak dan uji toksisitas.

Pembuatan konsentrasi ekstrak untuk uji pendahuluan dilakukan mengikuti metode Mc Laughlin *et al.* (1991) dengan membagi konsentrasi sampel uji untuk BSLT 1.000 µg/mL, 100 µg/mL, 10 µg/mL, dan kontrol (0 µg/mL). Untuk kontrol digunakan air laut (tanpa campuran ekstrak sampel).

Uji toksisitas dilakukan dengan memasukkan larva udang *A. salina* sebanyak 10 individu pada setiap wadah uji (tabung reaksi) yang berisi ekstrak metanol dan air laut (sebagai kontrol). Perlakuan ini diulang sebanyak 3 kali. Selama pengujian wadah uji tersebut disimpan di tempat yang terhindar dari sinar lampu. Setelah 24 jam diamati berapa jumlah *A. salina* yang telah mati untuk selanjutnya dihitung persentase kematiannya.

Uji definitif dilakukan dengan tahapan yang sama seperti uji pendahuluan, yaitu penyiapan hewan uji, pembuatan konsentrasi ekstrak dan uji toksisitas. Perbedaan uji definitif dari uji pendahuluan hanya pada penggunaan konsentrasi ekstrak yang lebih sempit. Penentuan konsentrasi ekstrak

yang digunakan dalam uji letal berdasarkan pada hasil uji pendahuluan, yaitu pada rentang konsentrasi dimana perkiraan LC<sub>50</sub> uji pendahuluan berada dengan mengacu pada skala logaritmik (Rand 1980). Penentuan konsentrasi ekstrak untuk uji letal menggunakan perhitungan:

$$\text{Log} \frac{N}{n} = k \text{Log} \frac{a}{n}$$

Keterangan: N adalah Batas atas, n adalah batas bawah, k adalah jumlah konsentrasi yang akan diujikan, dan a adalah konsentrasi pertama. Untuk menentukan konsentrasi selanjutnya, konsentrasi b, c, d,...dst. digunakan rumus:

$$\text{Log} \frac{N}{n} = k \text{Log} \frac{a}{n}$$

### Analisis Data

Data persentase kematian *A. salina* masing-masing ulangan pada setiap konsentrasi dan kontrol ditabulasi. Dari data yang telah diperoleh dianalisis probit (Mursyidi 1984). Analisis probit dilakukan dengan menentukan log konsentrasi dan nilai probit persentase kematian hewan uji pada setiap konsentrasi. Selanjutnya, dibuat grafik persamaan garis lurus hubungan antara log konsentrasi dan nilai probit persentase kematian, yaitu y, dengan y adalah nilai probit persentase kematian dan x adalah log konsentrasi. Kemudian ditarik garis dari nilai probit kematian sebesar 5 (=50% kematian) menuju sumbu x, sehingga diperoleh nilai x (log konsentrasi). Log konsentrasi diantilogkan untuk mendapatkan nilai LC<sub>50</sub> (Priyanto 2009).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Metode BSLT merupakan metode yang cukup mudah dikerjakan, membutuhkan biaya yang minim, dengan hasil uji yang cepat dan cukup akurat (Meyer *et al.* 1982). Relevansi dari metode ini berdasarkan peran dari BSLT untuk menentukan aktivitas biologis dari bahan baku obat-obatan yang biasanya telah dikonsumsi oleh orang dan suku berbeda, oleh karena itu petunjuk penentuan dari aktivitas biologis tersebut bertujuan untuk

mengevaluasi potensi indikasi terapeutik dan senyawa-senyawa yang aman untuk dikonsumsi (Arcanjo *et al.* 2011).

Senyawa yang diuji pada metode BSLT ini adalah zat yang menyebabkan kematian setengah dari spesimen pada konsentrasi mematikan hingga 1.000 µg/mL(LC<sub>50</sub>), akan dianggap aktif, dan dengan demikian berpotensi baik untuk aktivitas antitumor. Senyawa/zat tersebut kemudian diuji dalam uji coba ini, sehingga diperoleh korelasi yang baik (McLaughlin and Rogers 1988).

Uji pendahuluan dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kisaran konsentrasi yang akan digunakan dalam uji definitif. Hasil uji pendahuluan dapat dilihat pada *Table 1*.

Meyer *et al.* (1982) mengategorikan toksisitas suatu ekstrak berdasarkan LC<sub>50</sub>, yaitu toksik (<1.000 µg/mL), dan tidak toksik (>1.000 µg/mL). Berdasarkan uji pendahuluan, diketahui bahwa ekstrak tambelo menunjukkan aktivitas ketoksikan dan LC<sub>50</sub> diperkirakan berada pada konsentrasi 10–100 µg/mL karena pada pada konsentrasi 10 µg/mL didapatkan persentase kematian sebesar 26,66% dan pada konsentrasi 100 µg/mL persentase kematian sudah mencapai 96,66%. Dengan demikian, penelitian dilanjutkan pada uji letal dan ditentukan range konsentrasi untuk uji letal berada pada 10–100 µg/mL.

Berdasarkan uji pendahuluan, dilakukan uji letal dengan cara yang sama dengan uji pendahuluan, tetapi dengan variasi konsentrasi yang lebih sempit. Penentuan konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam uji letal ditentukan dengan mengacu pada skala logaritmik (Rand 1980). Setelah dilakukan perhitungan, diperoleh konsentrasi 17,78 µg/mL, 31,61 µg/mL, 56,21 µg/mL, dan 99,94 µg/mL serta kontrol untuk uji letal. Hasil uji definitif LC<sub>50</sub> dapat dilihat pada *Table 2*, sedangkan grafik log konsentrasi dan probit mortalitas uji letal disajikan pada *Figure 1*.

Berdasarkan hasil perhitungan probit maka diperoleh nilai LC<sub>50</sub> pada uji toksisitas ekstrak tambelo ialah 42,431 µg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak cacing tambelo bersifat sangat toksik. Anderson (1991) menyatakan bahwa suatu ekstrak dianggap sangat toksik jika nilai LC<sub>50</sub> antara 0-250 µg/mL. Clarkson *et al.* (2004) juga menyatakan bahwa suatu ekstrak sebagai sangat toksik jika nilai LC<sub>50</sub> antara 0-100 µg/mL.

Toksitas ekstrak cacing tambelo dengan nilai LC<sub>50</sub> 42,431 µg/mL diduga berkaitan dengan kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam cacing tambelo. Hasil uji fitokimia ekstrak kasar tambelo yang dilakukan oleh Leiwakabessy (2011) menunjukkan bahwa ekstrak cacing tambelo

Table 1 Preliminary research of wood-boring shipworm extract to *A.salina* mortality

Wood-boring shipworm extract (µg/ml)	<i>A. salina</i> mortality (%)
1,000	100
100	96,66
10	26,66
0 (control)	13,33

Table 2 LC<sub>50</sub> Test Results of wood-boring shipworm extract to *A.salina* mortality

Wood-boring shipworm extract (µg/ml)	<i>A. salina</i> mortality (%)
99,94	100,00
56,21	63,33
31,61	6,67
17,78	6,67
0 (control)	0,33

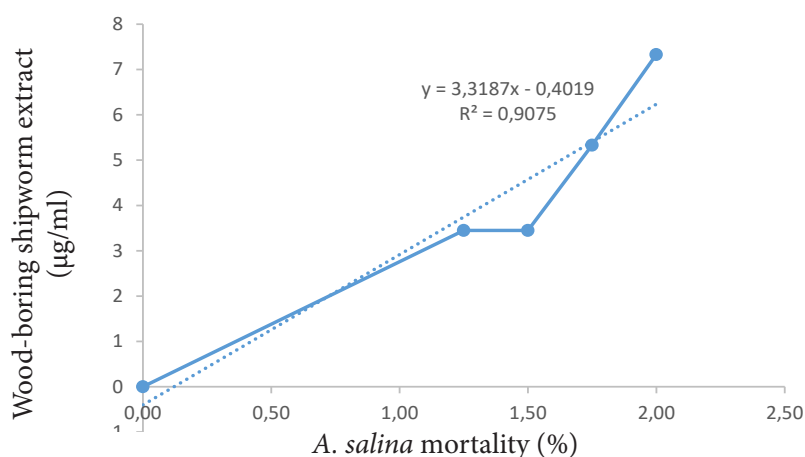


Figure 1 Log of Concentration and Mortality

yang diambil dari perairan Andai, Kabupaten Manokwari, Papua Barat, mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, dan steroid. Anwar (2015) melaporkan bahwa pada ekstrak cacing tambelo yang diambil dari hutan mangrove Desa Wonuakongga, Kecamatan Laeya, Kabupaten Konawe Selatan, Sulawesi Tenggara, terdeteksi mengandung kelompok senyawa kimia alkaloid, flavonoid, steroid, peptide, karbohidrat, fenol hidrokuinon, gula pereduksi dan asam amino.

Menurut Woo dan Kim (2013), flavonoid dan tanin memiliki mekanisme antikanker. Salah satu mekanisme flavonoid sebagai antikanker, melalui mekanisme pengaktifan jalur apoptosis sel kanker. Mekanisme apoptosis sel kanker sebagai akibat dari fragmentasi DNA. Fragmentasi yang diawali dengan pelepasan rantai proksimal DNA oleh senyawa oksigen reaktif seperti radikal hidroksil. Sedangkan efek lainnya adalah flavonoid sebagai penghambat proliferasi tumor/kanker yang salah satunya melalui penghambatan aktivitas protein kinase, dimana jalur transduksi sinyal dari membran ke inti sel terhambat. Flavonoid menghambat aktivitas reseptor tirosin kinase, karena aktivitas reseptor tirosin kinase yang meningkat berperan dalam pertumbuhan dan keganasan sel kanker. Flavonoid juga berperan dalam mereduksi resistensi tumor terhadap agen kemoterapi.

## KESIMPULAN

Hasil ekstraksi cacing tambelo yang diambil dari batang mangrove *Rhizophora* sp. di Desa Moolo, Kecamatan Batukara, Kabupaten Muna, Sulawesi Tenggara memiliki nilai  $LC_{50}$  sebesar 42,431 µg/mL yang berarti ekstrak cacing tambelo bersifat sangat toksik pada larva *A. salina*, sehingga memiliki indikasi berpotensi sebagai antikanker.

## DAFTAR PUSTAKA

- Albuntana A, Yasman, Wardhana W. 2011. Uji toksisitas ekstrak empat jenis teripang suku Holothuridae dari Pulau Panjaliran Timur, Kepulauan Seribu, Jakarta menggunakan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis* 3: 65-72.
- Anderson JE, Goetz CM, Mc Laughlin JL. 1991. *A Blind Comparison of Simple Bench-top Bioassay and Human Tumor Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescreens, Natural Product Chemistry*. Amsterdam (NL): Elsevier.
- Anwar LO. 2015. Komposisi Kimia Tambelo (*Bactronophorus* sp.) dan Karakteristik Produk Hasil Fermentasinya. [Tesis]. Bogor. Institut Pertanian Bogor.
- Anwar LO, Harjito L, Desniar. 2016. Fermentasi tambelo dan karakteristik produknya. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 17(3): 254-262
- Arcanjo DDR, Albuquerque ACM, Melo-

- Neto B, Santana LCLR, Medeiros MGF, Citó AMGL. 2012. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. *Brazilian Journal of Biology*. 72 (3): 505-509
- Carballo JL, Hernández-Inda ZL, Pérez P, García-Grávalos MD. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*. 2: 17.
- Clarkson C, Muharaj VJ, Crouch NR, Grace OM, Pillay P, Matsabisa MG, Bhagwandin N, Smith PJ, Folb PI. 2004. In vitro antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalized in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*. 92: 177-191.
- Hardiansyah, Sumule A, Letsoin J. 2007. Jenis dan jumlah konsumsi tambelo, siput dan kerang oleh penduduk di Kawasan Muara Mimika, Papua. *Jurnal Gizi dan Pangan*. 1(1): 1-12.
- Haris A, Werorilangi S. 2009. Uji Sitotoksitas Ekstrak (Crude Extract) Karang Lunak (*Octocorallia alycyonacea*) dari Kepulauan Spermonde Kota Makassar. Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin.
- Khopkar M. 2003. *Konsep Dasar Ilmu Analitik*. Jakarta: UI-Press.
- Leiwakabessy L. 2011. Komposisi Kimia dan Identifikasi Senyawa Antioksidan dari Ekstrak Tambelo (*Bactronophorus thoracites*). [Tesis]. Bogor. Institut Pertanian Bogor.
- Martiningsih NW. 2013. Skrining Awal Ekstrak Etil Asetat Spons *Leucetta sp.* Sebagai Antikanker dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Semnas FMIPA Undiksha 2013.
- Mc. Laughlin J L, Chang C J, Smith DL. 1991. Bench-top, bioassay for the discovery of bioactive natural products, an update. *Natural Product Chemistry*. Amsterdam (NL): Elsevier.
- Mc. Laughlin JL, Rogers LL. 1988. The use of biological assay to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*. 32: 513-514.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Mc. Laughlin JL. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituent. *Planta Medica*. 45: 31-34.
- Michael AS, Thompson CG, Abramovitz M. 1956. *Artemia salina* as a test-organism for bioassay. *Science*. 123: 464.
- Mursyidi A. 1984. *Statistik Farmasi dan Biologi*. Cetakan I. Ghalia Indonesia: Jakarta.
- Priyanto. 2009. *Toksikologi: Terapi Antidotum dan Penilaian Resiko*. Lembaga Studi dan Konsultasi Farmakologi. Jakarta.
- Riviani, Purwaningsih S, Tarman K. 2016. Profil asam amino, asam lemak, kandungan mineral tambelo (*Bactronophorus sp.*) dari Kendari Sulawesi Tenggara. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 19(1): 51-57
- Sleet R.B., dan Brendel K., 1983. Improved Methods for Harvesting and Counting Synchronous Population of *Artemia Nauplii* for Use in Development Toxicology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 7: 435-446.
- Trindade Silva E, Machado-Ferreira E, Senra MVX, Vizzon VF, Yparraguirre LA, Leoncini OA. 2009. Physiological traits of the symbiotic bacterium *Teredinibacter turnerae* isolated from the mangrove shipworm neoterredo reynei. *Genetics and Molecular Biology*. 1:1.
- Tunner R.D. 1971. Identification of Marine Wood-Boring Mollusks. In: Jones E.B.G. and Eltringham, S.K., (Ed.) Paris: *Marine Borers, Fungi, and Fouling Organisms of Wood*. OECD. 17-64.
- Uddin M, Pervin R, Kabir Y, Absar N. 2013. Preliminary Screening of Secondary Metabolites and *Brine Shrimp Lethality Bioassay* of Warm-Water Extract of Puffer Fish Organs Tissue, *Tetraodon cutcutia*, Available in Bangladesh. *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research* 2(5):14-18.
- Vanhaecke P, Persoone G, Claus C, Sorgeloos P. 1981. Proposal for A Short-Term Toxicity Test with *Artemia Nauplii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 5: 382-387.