

**Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Astaxanthin Kulit  
Udang *Litopenaeus vannamei* terhadap Jumlah Neutrofil  
dan Limfosit Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinjeksi  
Karagenin**

**SKRIPSI**



**Graciela Carina Naj Joan**

**31160014**

**Program Studi Biologi  
Fakultas Bioteknologi  
Universitas Kristen Duta Wacana  
Yogyakarta  
2021**

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
SKRIPSI/TESIS/DISERTASI UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademika Universitas Kristen Duta Wacana, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Graciela Carina Najoan  
NIM : 31160014  
Program studi : Biologi  
Fakultas : Bioteknologi  
Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Kristen Duta Wacana **Hak Bebas Royalti Noneksklusif** (*None-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

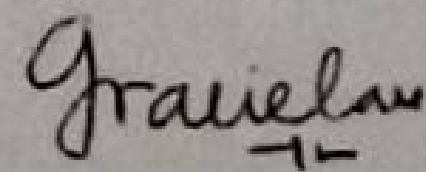
**“Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Astaxanthin Kulit Udang *Litopenaeus vannamei* terhadap Jumlah Neutrofil dan Limfosit Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinjeksi Karagenin”**

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti/Noneksklusif ini Universitas Kristen Duta Wacana berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama kami sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Yogyakarta  
Pada Tanggal : 12 April 2020

Yang menyatakan



(Graciela Carina Najoan)  
NIM.31160014

Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Astaxanthin Kulit Udang  
*Litopenaeus vannamei* terhadap Jumlah Neutrofil dan Limfosit  
Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinjeksi Karagenin

**Skripsi**

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh

Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Pada Program Studi Biologi, Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana



**Graciela Carina Najoan**

**31160014**

**Program Studi Biologi**

**Fakultas Bioteknologi**

**Universitas Kristen Duta Wacana**

**Yogyakarta**

**2021**

## LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

Judul : Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Astaxanthin Kulit Udag  
*Litopenaeus vannamei* terhadap Jumlah Neutrofil dan Limfosit  
Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinjeksi Karagenin.

Nama Mahasiswa : Graciela Carina Najoa

Nomor Induk Mahasiswa : 31160014

Hari/Tanggal Ujian : 5 Februari 2021

Disetujui Oleh :

Pembimbing I,



(Dra. Aniek Prasetyaningsih, M.Si)

NIK: 884E075

Pembimbing II,



(drh. Vinsa Cantya P, SKH., M.Sc)

NIK: 204E539

Ketua Program Studi Biologi



(Dra. Aniek Prasetyaningsih, M.Si)

NIK: 884E075

## Lembar Pengesahan

Skripsi dengan judul:

UJI AKTIVITAS ANTIINFLAMASI EKSTRAK ASTAXANTHIN KULIT  
UDANG *LITOPENAEUS VANNAMEI* TERHADAP JUMLAH NEUTROFIL DAN  
LIMFOSIT TIKUS PUTIH (*RATTUS NORVEGICUS*) YANG DIINJEKSI  
KARAGENIN

telah diajukan dan dipertahankan oleh:

**GRACIELA CARINA NAJOAN**

**31160014**

dalam Ujian Skripsi Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana

dan dinyatakan DITERIMA untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar  
Sarjana Sains pada tanggal 5 Februari 2021

Nama Dosen

1. Prof.Dr.L. Hartanto Nugroho, M.Agr  
(Ketua Tim/Penguji I)
2. Dra.Aniek Prasetyaningsih, M.Si.  
(Dosen Pembimbing Utama/Penguji II)
3. drh.Vinsa Cantya P,SKH.,M.Sc.  
(Dosen Pembimbing Pendamping/Penguji III)

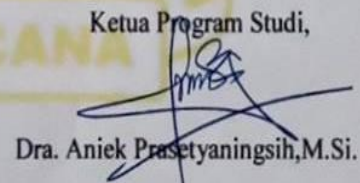
Tanda Tangan



Yogyakarta, 5 Februari 2021

Disahkan oleh :

  
Dekan,  
Drs.K.jsworw,M.Sc.  
NIK : 874E054

  
Ketua Program Studi,  
Dra. Aniek Prasetyaningsih,M.Si.  
NIK : 884E075

## LEMBAR PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Graciela Carina Najoa

NIM : 31160014

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi dengan judul :

**“Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Astaxanthin Kulit Udang  
*Litopenaeus vannamei* terhadap Jumlah Neutrofil dan Limfosit Tikus Putih  
(*Rattus norvegicus*) yang Diinjeksi Karagenin”**

adalah hasil karya saya dan bukan merupakan duplikasi sebagian atau seluruhnya dari karya orang lain, yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali secara tertulis diacu didalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Pernyataan ini dibuat dengan sebenar-benarnya secara sadar dan bertanggung jawab dan saya bersedia menerima sanksi pembatalan skripsi apabila terbukti melakukan duplikasi terhadap skripsi atau karya ilmiah lain yang sudah ada.

Yogyakarta, 5 Februari 2021



(Graciela Carina Najoa)

NIM : 31160014

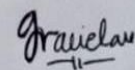
## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan Yesus Kristus, karena kemurahan dan pertolonganNya sehingga peneliti dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi dengan judul "**Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Astaxanthin Kulit Udang *Litopenaeus vannamei* terhadap Jumlah Neutrofil dan Limfosit Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinjeksi Karagenin**". Tujuan penulisan skripsi ini untuk memenuhi salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi, Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana. Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Drs. Kisworo, M.Sc. selaku dekan Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana.
2. Dra. Aniek Prasetyaningsih, M.Si., selaku ketua program Studi Biologi, Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana dan sekaligus dosen pembimbing utama yang siap meluangkan waktu, sabar dalam memberikan arahan, masukan, koreksi, serta semangat dan perhatian kepada penulis dari awal penelitian hingga penulisan skripsi.
3. drh. Vinsa Cantya P,SKH, M.Sc., selaku dosen pembimbing pendamping yang bersedia ikut membantu dalam pengerjaan penelitian, siap meluangkan waktu untuk konsultasi dan sabar dalam memberikan arahan serta masukan.
4. Prof.Dr. L. Hartanto Nugroho, M.Agr., selaku dosen penguji yang berkenan meluangkan waktu untuk memberikan masukan serta bimbingan dalam penyelesaian skripsi.
5. Theresia Sri Retnowati, dan Wida Hening, S.Pd selaku laboran yang selalu membantu selama proses penelitian di laboratorium sehingga dapat berjalan dengan baik.
6. Papa dan mama, kakak-kakak yang ada di Salatiga dan Jakarta yang selalu mendoakan dan memberikan dukungan pada peneliti.
7. Gadis perantau (Adonia, Elza, Febry, Vibe, dan Finolia) yang membantu dalam penelitian dan memberi dukungan bagi peneliti, Tika, Jecica, Natalie dan Cindy Tien yang ikut membantu peneliti serta memberikan dukungan dan Abner selaku partner dalam penelitian.
8. Teman-teman Bioteknologi angkatan 2016 yang sudah berjuang bersama-sama selama 4 tahun.

Penulis berharap penelitian ini dapat memberikan kontribusi bagi pengembangan ilmu pengetahuan serta menjadi referensi dan pertimbangan dalam melakukan penelitian kedepannya. Penulis juga menyadari bahwa penelitian ini masih memiliki banyak kekurangan dan keterbatasan, sehingga mengharapkan adanya saran dan masukan, agar penelitian kedepan lebih baik dari penelitian ini.

Yogyakarta, 5 Februari 2021



Graciela Carina Najooan

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN JUDUL BAGIAN DALAM .....	i
LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI .....	ii
LEMBAR PENGESAHAN TIM PENGUJI.....	iii
LEMBAR PERNYATAAN .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI .....	vi
DAFTAR TABEL .....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	x
DAFTAR LAMPIRAN .....	xii
ABSTRAK .....	xiv
<i>ABSTRACT</i> .....	xv
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan.....	4
1.4 Manfaat penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	5
2.1 Udang .....	5
2.1.1 Udang Vaname .....	5
2.1.2 Kulit Udang .....	6
2.1.3 Kandungan astaxanthin pada udang .....	7
2.2 Astaxanthin.....	8
2.2.1 Struktur molekul dan fungsi .....	8
2.2.2 Aktivitas biologi sebagai antiinflamasi .....	9



2.3 Inflamasi .....	10
2.3.1 Pengertian inflamasi .....	10
2.3.2 Peran neutrofil dan limfosit pada proses inflamasi .....	11
2.4 Ekstraksi .....	12
2.5 Kromatografi Lapis Tipis .....	13
2.6 Uji salkowski .....	14
<b>BAB III METODOLOGI.....</b>	<b>15</b>
3.1 Waktu dan tempat penelitian .....	15
3.2 Alat .....	15
3.3 Bahan .....	15
3.4 Desain penelitian .....	15
3.5 Cara Kerja.....	18
3.5.1 Preparasi sampel kulit udang .....	18
3.5.2 Ekstraksi .....	18
3.5.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ekstrak kasar .....	18
3.5.4 Preparasi kolom kromatografi .....	19
3.5.5 Kolom kromatografi ekstrak kasar kulit udang .....	19
3.5.6 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) fraksi kolom.....	20
3.5.7 Uji salkowski .....	20
3.5.8 Spektrofotometri UV-Vis.....	20
3.5.9 <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC) .....	21
3.5.10 Uji praklinis .....	21
3.5.10.1 Pemberian perlakuan .....	22
3.5.10.2 Pembuatan preparat apus darah .....	22
3.5.10.3 Pewarnaan apus darah .....	23
3.5.10.4 Pengamatan dan analisis jumlah neutrofil dan limfosit .....	23

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....	25
4.1 Preparasi dan ekstraksi kulit udang vaname .....	25
4.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ekstrak kasar kulit udang .....	26
4.3 Uji salkowski .....	29
4.4 Kolom kromatografi .....	30
4.5 Spektrofotometri UV-Vis ekstrak kasar dan fraksi kolom .....	33
4.6 <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC) .....	36
4.7 Uji praklinis .....	37
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....	44
DAFTAR PUSTAKA .....	46
LAMPIRAN .....	52

©UKYDWN

## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
Tabel 2.1 Konsentrasi astaxanthin pada berbagai jenis udang.....	7
Tabel 2.2 Nilai Rf astaxanthin berdasarkan pustaka (Lorenz Todd, 1998) .....	14
Tabel 2.3 Nilai Rf astaxanthin berdasarkan pustaka (Kobayashi dan Sakamoto, 1999) .....	14
Tabel 3.1 Nilai relative (%) limfosit dan neutrofil pada tikus putih jantan dan betina .....	24
Tabel 4.1 Nilai Rf hasil KLT fraksi kolom .....	31
Tabel 4.2 Hasil absorbansi dari kelima konsentrasi astaxanthin standar .....	33
Tabel 4.3 Konsentrasi astaxanthin pada ekstrak kasar kulit udang dan fraksi.....	35
Tabel 4.4 Persentase nilai relatif neutrofil dan limfosit pada berbagai perlakuan dari waktu ke waktu .....	39

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
Gambar 2.1 Struktur molekul astxanthin .....	9
Gambar 3.1 Diagram alir penelitian.....	17
Gambar 4.1 Kulit udang vaname yang telah dibersihkan dan berat basah kulit sebesar 864 gram .....	26
Gambar 4.2 Kulit udang vaname yang telah dihaluskan dan berat kering sebesar 161 gram.....	26
Gambar 4.3 Ekstrak kasar kulit udang sebesar 25 gram .....	26
Gambar 4.4 Hasil UV ekstrak kasar menggunakan perbandingan 8:2 dengan nilai Rf 0.43, 0.56 dan 0.93 .....	28
Gambar 4.5 Hasil uji terpenoid terbentuk dua lapisan yang berwarna cokelat kemerahan .....	29
Gambar 4.6 Fraksi kolom dari kanan ke kiri fraksi 1,fraksi 2, fraksi 3,fraksi 4 dan fraksi 5.....	30
Gambar 4.7. Hasil UV fraksi 3 Nilai Rf 0.18 dan 0.25.....	31
Gambar 4.8 Hasil UV fraksi 4 Nilai Rf 0.18 dan 0.25.....	31
Gambar 4.9 Hasil UV fraksi 5 Nilai Rf 0.18 dan 0.25.....	31
Gambar 4.10 Hasil UV fraksi 5 Nilai Rf 0.43, 0.55,0.62.....	31
Gambar 4.11 Hasil UV fraksi 5 Nilai Rf 0.43, 0.5, 0.62, 0.68 dan 0.75.....	32
Gambar 4.12 Hasil UV fraksi 5 Nilai Rf 0.81 dan 0.93.....	32
Gambar 4.13 Kurva standar penentuan konsentrasi astaxanthin pada panjang gelombang 477 nm.....	34
Gambar 4.14 Hasil HPLC standar astaxanthin dengan waktu retensi (tR) 2.069 dan peak area 27989.....	36

Gambar 4.15 Hasil HPLC fraksi dengan waktu retensi (tR) 1.450 dan 2.024 dan peak area 111180 dan 1663..... 36

©UKDW

## DAFTAR LAMPIRAN

	<b>Halaman</b>
Lampiran 1: Perhitungan pengenceran larutan stok untuk penetapan konsentrasi kurva standar .....	52
Lampiran 2: Perhitungan konsentrasi hasil fraksi pada rumus persamaan regresi .....	53
Lampiran 3: Perhitungan Konsentrasi astaxanthin dalam sampel fraksi .....	54
Lampiran 4: Hasil fraksi kolom kromatografi yang telah dikering anginkan .....	55
Lampiran 5: Fraksi gabungan kolom kromatografi .....	56
Lampiran 6: Fraksi gabungan kolom kromatografi .....	57
Lampiran 7: Hasil KLT ekstrak kasar kulit udang menggunakan fase gerak benzene : etil asetat (1:1), aseton : heksana (3:7) dan etil asetat : heksana (2,5 : 1) .....	58
Lampiran 8: Hasil KLT ekstrak kasar kulit udang menggunakan fase gerak petroleum eter : etanol (9:1,8:2,7:3,6:4,5:5,1:9,2:8,3:7,4:6,5:5) dan spreji penanda noda ninhidrin .....	59
Lampiran 9: Hasil KLT ekstrak kasar kulit udang menggunakan fase gerak acetone : heksana dengan perbandingan (9:1,8:2,7:3,6:4,5:5,1:9,2:8,3:7,4:6,5:5) dan semprotan penanda noda ninhidrin. ....	60
Lampiran 10: Hasil KLT menggunakan sampel ekstrak kasar pelarut petroleum eter : etanol (9:1,8:2,7:3,6:4,5:5,1:9,2:8,3:7,4:6,5:5) dengan semprotan anisaldehyd. ....	61
Lampiran 11: Hasil KLT standar astaxanthin (Giffarine Astaxanthin) menggunakan fase gerak petroleum eter : etanol (9:1,8:2,7:3,6:4,5:5,1:9,2:8,3:7,4:6,5:5) dan spreji penanda noda anisaldehyd .....	62
Lampiran 12: Hasil KLT kolom kromatografi , fase gerak yang digunakan adalah petroleum eter : etanol (8:2) dan spreji penanda noda yaitu anisaldehyd .....	64

Lampiran 13: Dokumentasi Diferensial Leukosit (Neutrofil dan Limfosit) .....	65
Lampiran 14: Pembengkakan atau edema pada kaki tikus .....	69
Lampiran 15: Hasil uji statistic menggunakan <i>Repeated measure ANOVA</i> dan Friedman test .....	70
Lampiran 16: Surat keterangan kelayakan etik.....	75
Lampiran 17: Kartu Konsultasi.....	76

©UKDW

# Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Astaxanthin Kulit Udang *Litopenaeus vannamei* terhadap Jumlah Neutrofil dan Limfosit Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinjeksi Karagenin

GRACIELA CARINA NAJOAN

31160014

## ABSTRAK

Indonesia adalah negara maritim yang memiliki potensi laut melimpah, potensi tersebut memberikan peluang bagi Indonesia khususnya dalam pemanfaatan sumber daya kelautan sebagai sumber senyawa bioaktif. Salah satu biota laut yang berpotensi memiliki senyawa bioaktif, dan merupakan salah satu komoditas ekspor yang utama adalah udang. Kulit udang mengandung karotenoid, salah satunya astaxanthin. Astaxanthin merupakan karotenoid xantofil berwarna merah-jingga dan memiliki efek farmakologis yang potensial, salah satunya sebagai antiinflamasi. Penelitian kali ini, dilakukan pengujian terhadap aktivitas antiinflamasi ekstrak astaxanthin kulit udang *Litopenaeus vannamei* terhadap jumlah neutrofil dan limfosit tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinjeksi karagenin. Pengujian-pengujian yang dilakukan meliputi ekstraksi, kromatografi lapis tipis (KLT), uji salkowski, kolom kromatografi, uji spektrofotometri UV-Vis, *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), dan yang terakhir uji praklinis, memakai model edema pada kaki tikus putih dengan menginjeksikan karagenin 1%. Perlakuan yang diberikan adalah fraksi dengan dosis 50 mg/kgbb, 100 mg/kgbb dan 150 mg/kgbb, kontrol positif menggunakan celexocib dosis 18 mg/kgbb dan kontrol negatif propilen glikol sebanyak 1 ml. Nilai relatif neutrofil dan limfosit didapat dari menghitung neutrofil dan limfosit per 100 sel, dan diuji menggunakan *Repeated measure ANOVA* untuk uji parametrik dan uji non-parametrik menggunakan Friedman test. Hasil yang didapat yaitu ( $p>0.05$ ) artinya tidak ada perbedaan signifikan antara setiap perlakuan terhadap penurunan nilai relatif neutrofil dan juga terhadap nilai relatif limfosit, dari jam ke-0 jam ke-4 dan jam ke-8. Nilai relatif neutrofil dan limfosit masih berada pada batas nilai normal yang dapat juga menunjukkan bahwa fraksi yang mengandung astaxanthin, tidak memberikan efek terhadap perubahan nilai relatif neutrofil maupun limfosit.

Kata kunci : Astaxanthin, *Litopenaeus vannamei*, Antiinflamasi, Neutrofil, Limfosit



***Antiinflammatory Activity Test of Litopenaeus vannamei Shrimp Shells  
Astaxanthin Extract against the Number of Neutrophils and  
Lymphocytes of White Rats (Rattus norvegicus) Injected with  
Carrageenan***

GRACIELA CARINA NAJOAN

31160014

***ABSTRACT***

One of Indonesia's marine biota with the potential to have bioactive compounds and is one of the main export commodities is shrimp. Shrimp shells contain carotenoids, one of which is astaxanthin, red-orange xanthophyll carotenoid with potential pharmacological effects such as anti-inflammatory. In this research, we tested the anti-inflammatory activity of the astaxanthin extract of *Litopenaeus vannamei* shrimp shell on the number of neutrophils and lymphocytes of white rats (*Rattus norvegicus*) injected with carrageenan. The tests carried out were extraction, thin layer chromatography (TLC), salkowski test, column chromatography, UV-Vis spectrophotometric test, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), and preclinical test using an edema model on the feet of white rats by injecting carrageenan 1%. The treatments given were fractions with a dose of 50 mg / kgbb, 100 mg / kgbb and 150 mg / kgbb, positive control using celecoxib dose of 18 mg / kgbb and negative control using 1 ml propylene glycol. The relative values of neutrophils and lymphocytes were obtained from counting them per 100 cells, and were tested using a repeated measure ANOVA for parametric tests and Friedman test for non-parametric. The results obtained were ( $p > 0.05$ ) meaning that there was no significant difference between each treatment for the decrease in the relative value of neutrophils and lymphocytes, from the 0 to 4th and 8th hour. The relative value of neutrophils and lymphocytes is still in the normal range, which can also indicate that the fraction containing astaxanthin does not have an effect on changes in relative value.

Keywords: Astaxanthin, *Litopenaeus vannamei*, Antiinflammatory, Neutrophils, Lymphocytes

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara maritim dengan potensi laut yang sangat kaya. Sumber daya kelautan tersebut dapat dimanfaatkan sebagai sumber senyawa bioaktif dan dengan majunya penelitian mengenai bahan aktif obat, menjadi peluang besar bagi Indonesia untuk memanfaatkan senyawa bioaktif menjadi bahan aktif obat. Diharapkan dengan adanya peluang ini, Indonesia dapat mandiri terkait dengan penyediaan obat-obatan dimasa yang akan datang. Biota laut yang memiliki potensi sebagai sumber senyawa bioaktif, dan termasuk salah satu komoditas ekspor yang utama dan potensial adalah udang. Udang pada perairan timur Indonesia terdiri dari 24 jenis dan digolongkan menjadi lima famili yang terdiri dari Aristaeidae, Pandalidae, Penaeidae, Nematocarcinidae dan Sicyonidae, dan untuk perairan barat Indonesia terdapat 38 jenis dan udang Penaeid (*Plesiopenaeus edwardsianus*) adalah yang paling dominan (Suman dan Satria, 2013). Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP) Indonesia menyatakan proyeksi produksi perikanan budidaya udang pada tahun 2020 adalah 18.440.000 ton dan 2021 sebesar 19.470.000 ton, serta potensi lahan untuk budidaya udang mencapai 2.964.331,24 Ha, selain itu udang merupakan komoditas penting dengan volume produksi nasional sebesar 886.520 ton (Bappenas, 2019).

Udang yang merupakan komoditas penting tentunya banyak di produksi, dimanfaatkan dan juga diekspor dalam bentuk olahan. Hal tersebut menyebabkan produksi limbah, terutama dari bagian yang tidak digunakan yaitu kulit maupun bagian kepala. Limbah yang dihasilkan dari produksi udang untuk diekspor berupa kulit, kepala, ekor dan kaki sekitar 35%-50% dari berat awal, kemudian limbah produksi (pengalengan serta pembekuan udang, dan pengolahan kerupuk udang) berkisar antara 30% - 75% dari berat udang (Swastawati *et al.*, 2008). Limbah dari udang tersebut belum optimal dimanfaatkan, dan biasanya dijadikan sebagai

campuran bahan terasi dan juga pakan ternak. Kurangnya pemanfaatan limbah kulit udang menjadi salah satu faktor pembuangan limbah sembarangan, sehingga menimbulkan pencemaran dan menyebabkan kandungan *Biochemical Oxygen Demand* (BOD), *Chemical Oxygen Demand* (COD) dan *Total suspended solids* (TSS) perairan di sekitar pabrik cukup tinggi (Swastawati *et al.*, 2008; Judhaswati dan Damayanti, 2018).

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- $\beta,\beta$ -carotene-4,4'-dione) merupakan salah satu senyawa bioaktif pada kulit udang, yaitu pigmen karotenoid seperti zeaxanthin, lutein, dan  $\beta$ -karoten namun secara khusus sebagai pigmen berwarna merah-oranye dan termasuk kelompok xantofil. Kandungan astaxanthin pada limbah udang segar (cephalothorax dan kulit) berkisar dari 4,79mg / 100g untuk udang *P. Indicus* (Sachindra *et al.*, 2007 dalam L.M-A.J. Seabra dan L.F.C. Pedrosa, 2010), dan kandungan astaxanthin pada kulit *Penaeus monodon* sebesar 86.6  $\mu\text{g/g}$ , serta kulit *Metapenaeus dobsonii* sebesar 83.3  $\mu\text{g/g}$  (Sachindra *et al.*, 2005), kemudian kandungan astaxanthin pada kulit *Litopenaeus vannamei* sebesar 94 mg (Santos *et al.*, 2012). Adanya gugus keto dan hidroksil pada astaxanthin membuatnya memiliki aktivitas biologi lebih tinggi dibandingkan karotenoid yang lain (Davinelli *et al.*, 2018). Astaxanthin bahkan memiliki antioksidan melampaui  $\beta$ -karoten atau bahkan  $\alpha$ -tokoferol (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006). Sumber astaxanthin pada biota laut dapat ditemukan pada ikan salmon, udang, udang karang dan banyak juga ditemukan pada mikro alga *Haematococcus pluvialis*. Astaxanthin banyak diteliti bahkan sudah banyak diperdagangkan, karena memiliki efek farmakologis yang potensial, seperti antikanker, antidiabetik, aktivitas antioksidan, efek neurologis, kardiovaskular, serta sebagai antiinflamasi (Davinelli *et al.*, 2018).

Penelitian efek astaxanthin dari kulit udang sebagai antiinflamasi sebelumnya sudah dilakukan oleh Santos *et al.* (2012) dan Kuedo *et al.* (2016) yang juga menggunakan udang *Litopenaeus vannamei* dengan hasil, astaxanthin dari ekstrak udang dapat dianggap sebagai sumber senyawa bioaktif yang menjanjikan dengan aktivitas antiinflamasi. Khususnya pada penelitian Kuedo *et al.* (2016) yang

meneliti salah satunya mengenai pengaruh astaxanthin dari udang *Litopenaeus Vannamei* pada edema mencit yang diinduksi karagenin, dan mengukur ketebalan edema pada kaki mencit, namun pada penelitian ini untuk mengetahui efek astaxanthin kulit udang *Litopenaeus Vannamei* sebagai antiinflamasi dilihat dari penurunan persentase diferensial (relatif) leukosit yaitu neutrofil dan limfosit. Hal tersebut karena, leukosit atau yang dikenal sebagai sel darah putih berperan penting dalam respon inflamasi sistemik terhadap infeksi, cedera, syok politrauma dan syok yang parah (Zahorec, 2001). Leukosit juga dapat menjadi penanda bahwa tubuh mengalami inflamasi dengan adanya peningkatan kadar neutrofil maupun limfosit pada apus darah yang berada diatas ambang batas normal (Enjelina M *et al.*, 2015). Astaxanthin yang berpotensi sebagai antiinflamasi yang akan diuji dalam penelitian ini dapat mengurangi inflamasi dengan menekan dan menghambat produksi sitokin dan mediator inflamasi (Lee *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2012 ). Oleh karena itu, penelitian ini mencoba memanfaatkan kulit udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang memiliki potensi senyawa bioaktif salah satunya astaxanthin yang berfokus pada efek farmakologis astaxanthin sebagai antiinflamasi. Melalui penelitian ini juga, astaxanthin yang terdapat pada kulit udang diharapkan dapat memberikan peluang sebagai salah satu alternatif bahan aktif obat untuk inflamasi.

## **1.2 Rumusan Masalah**

- 1.2.1 Apakah kulit udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) mengandung astaxanthin?
- 1.2.2 Berapakah konsentrasi astaxanthin yang terkandung dalam ekstrak kasar kulit udang dan fraksi kolom kromatografi?
- 1.2.3 Apakah ekstrak astaxanthin kulit udang *Litopenaeus vannamei* efektif untuk antiinflamasi?
- 1.2.4 Berapakah nilai relatif neutrofil dan nilai relatif limfosit pada pemberian ekstrak astaxanthin kulit udang?

### **1.3 Tujuan**

- 1.3.1 Mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada kulit udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) khususnya astaxanthin.
- 1.3.2 Mengetahui konsentrasi astaxanthin yang terdapat pada ekstrak kasar kulit udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) dan hasil fraksi kolom kromatografi.
- 1.3.3 Mengetahui efektivitas ekstrak astaxanthin kulit udang *Litopenaeus vannamei* terhadap antiinflamasi.
- 1.3.4 Mengetahui penurunan nilai relatif neutrofil dan juga nilai relatif limfosit dari jam ke-0, jam ke-4 dan jam ke-8.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

- 1.4.1 Manfaat dalam bidang akademik, diharapkan penelitian ini dapat menambah wawasan dan referensi bagi akademisi yang akan atau ingin melakukan riset mengenai astaxanthin dan potensinya.
- 1.4.2 Manfaat bagi industri, diharapkan menambah informasi bagi industri yang akan melakukan riset mengenai metabolit sekunder, khususnya astaxanthin dari kulit udang untuk pengembangan obat-obatan.
- 1.4.3 Manfaat bagi lingkungan, penelitian ini diharapkan menjadi alternatif dalam membantu mengolah limbah kulit udang sehingga dapat mengurangi pencemaran lingkungan.
- 1.4.4 Manfaat bagi masyarakat pesisir pantai dan berprofesi sebagai nelayan, melalui penelitian ini diharapkan dapat menambah informasi bagi masyarakat pesisir pantai, serta alternatif untuk pengembangan ekonomi masyarakat pesisir dan nelayan melalui pengolahan limbah udang.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

- 5.1.1 Berat kering kulit udang sebesar 161 gram dan berat ekstrak kasar sebesar 25 gram dengan rendemen mencapai 15.52%.
- 5.1.3 Kulit udang vaname mengandung astaxanthin dan juga senyawa terpenoid, berdasarkan hasil uji salkowski untuk ekstrak kasar serta Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan uji spektrofotometer untuk ekstrak kasar dan fraksi hasil kolom kromatografi, namun hasil fraksi masih menunjukkan terdapat senyawa lain.
- 5.1.4 Konsentrasi astaxanthin pada sampel ekstrak kasar sebesar 0,52 mg astaxanthin/gr ekstrak kasar dan pada sampel fraksi sebesar 220,77 mg astaxanthin/gr fraksi.
- 5.1.5 Kulit udang vaname tidak memberikan efek antiinflamasi dilihat dari perlakuan yang diberikan yaitu fraksi hasil kolom kromatografi tidak menyebabkan penurunan nilai relatif neutrofil maupun nilai relatif limfosit.
- 5.1.6 Tidak ada penurunan rerata nilai relatif neutrofil maupun nilai relatif limfosit dari jam ke-0, jam ke-4 dan jam ke-8 pada dosis fraksi 50mg/kgbb, 100 mg/kgbb dan 150 mg/kgbb. Namun, pemberian perlakuan yaitu fraksi tidak menyebabkan *neutrophilia* (**peningkatan neutrofil**) maupun *neutropenia* (**penurunan neutrofil**) dan *Lymphocytopenia* (**penurunan limfosit**) maupun *Lymphocytosis* (**peningkatan limfosit**)

#### 5.2 Saran

- 5.2.1 Saran untuk penelitian selanjutnya yaitu menggunakan metode yang dapat menghitung sel leukosit dalam jumlah yang lebih besar.
- 5.2.2 Perlu dilakukan uji pendahuluan sebelum uji praklinis.

- 5.2.3 Konsentrasi karagenin pada penelitian selanjutnya dapat ditingkatkan untuk induksi inflamasi.
- 5.2.4 Kondisi kesehatan hewan coba, serta lingkungan tempat pemeliharaan hewan harus diperhatikan dengan baik, karena dapat mempengaruhi sel leukosit.
- 5.2.5 Ekstraksi astaxanthin dari berbagai metode dan pelarut untuk melihat jenis metode maupun pelarut yang lebih baik, dalam mengekstraksi astaxanthin dari kulit udang dapat juga menggunakan pelarut minyak tumbuhan yang lebih ramah lingkungan dan aman jika dikonsumsi.

©UKDW

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, Ri., D. T. Indrawati, dan M. A. Masruhin. (2015). *Aktivitas Ekstrak Daun (Eugenia poyantha) Sebagai Antiinflamsi Pada Tikus Putih (Rattus norvegicus)*. *J. Trop. Pharm. Chem.* 3(2):120-123.
- Adewoyin, A. S., & Nwogoh, B. (2014). Peripheral blood film - a review. *Annals of Ibadan postgraduate medicine*, 12(2), 71–79.
- Ambati, Dr. Ranga Rao & Phang, Siew-Moi & Ravi, Sarada & Gokare, Ravishankar. (2014). *Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review*. *Marine drugs*. 12. 128-152. 10.3390/md12010128.
- Bele, Archana & Khale, Anubha. (2011). An overview on thin layer chromatography. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2.
- Brotosudarmo, Tatas & Limantara, Leenawaty & Setiyono, Edi & Heriyanto, Heriyanto. (2020). *Structures of Astaxanthin and Their Consequences for Therapeutic Application*. *International Journal of Food Science*. 2020. 1-16. 10.1155/2020/2156582.
- Bryda, E. C. (2013). The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. *Missouri medicine*, 110(3), 207.
- Coskun O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *Northern clinics of Istanbul*, 3(2), 156–160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>
- Crunkhorn, P., & Meacock, S. C. (1971). Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. *British journal of pharmacology*, 42(3), 392–402. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1971.tb07124.x>
- Chung, J., Ou, X., Kulkarni, R. P., & Yang, C. (2015). *Counting White Blood Cells from a Blood Smear Using Fourier Ptychographic Microscopy*. *PloS one*, 10(7), e0133489. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133489>
- Das, B. K., Al-Amin, M. M., Russel, S. M., Kabir, S., Bhattacharjee, R., & Hannan, J. M. (2014). Phytochemical Screening and Evaluation of Analgesic Activity of *Oroxylum indicum*. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 76(6), 571–575.



- Davinelli, Sergio, Nielsen E. Michael, Scapagnini Giovanni. (2018). *Astaxanthin in Skin Health, Repair, and Disease: A Comprehensive Review*. *Nutrients*,10:4 522; doi:10.3390/nu10040522.
- Durbin, Cathy & Guo, Kevin & Hoffman, Wherly & Schultze, Albert & White, Sandy. (2009). Estimating leukocyte, platelet, and erythrocyte counts in rats by blood smear examination. *Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology*. 38. 157-62. 10.1111/j.1939-165X.2009.00110.x.
- Du, X., Dong, C., Wang, K., Jiang, Z., Chen, Y., Yang, Y., & Ni, H. (2016). Separation and purification of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* by preparative high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography B*, 1029, 191-197.
- Enjelina, M., Ilmiawan, I. M., dan Bangsawan, P.I. (2015). *Uji Antiinflamasi Kombinasi Astaxanthin dan Vitamin C terhadap Jumlah Neutrofil dan Limfosit pada Tikus Putih Galur Wistar yang diinduksi Karagenin*. *Jurnal Cerebellum*.Vol.1 No. 2.
- F. Sánchez Rojas, J.M. Cano Pavón.(2005). *SPECTROPHOTOMETRY (Biochemical Applications)*.*Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*, Elsevier. Pages 366-372.ISBN 9780123693976. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00722-6>
- Filho, Wilson & Lima, Caio & Paunksnis, Marcos & Silva, Ariana & Perilhão, Mauro & Caldeira, Marina & Bocalini, Danilo & Souza, Romeu. (2017). Reference database of hematological parameters for growing and aging rats. *The Aging Male*. 21. 1-4. 10.1080/13685538.2017.1350156.
- Guerin, M.; Huntley, M.E.; Olaizola, M. (2003). *Haematococcus astaxanthin: Applications for human health and nutrition*. *Trends Biotechnol.*21, 210–216.
- Ghufron.,M, Lamdi.,M, Wulan Sari.,D.,P, Suprpto Hari. (2017). *Teknik Pembesaran Udang Vaname (Litopenaeus vannamei) pada Tambak Pendampungan PT. Central Proteina PrimaTbk di Desa Randutatah Kecamatan Paiton, Probolinggo, Jawa Timur*. *Journal of Aquaculture and Fish Health* Vol. 7 No.2.
- Gilligan, J. P., Lovato, S. J., Erion, M. D., & Jeng, A. Y. (1994). Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P. *Inflammation*, 18(3), 285–292. <https://doi.org/10.1007/BF01534269>

- Haliman, R.W dan Dian A.S. 2006. Udang Vannamei. Penebar Swadaya. Jakarta
- Higuera-Ciapara, I.; Felix-Valenzuela, L.; Goycoolea, F.M. (2006). *Astaxanthin: A review of its chemistry and applications*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 46, 185–196.
- Hu, J., Lu, W., Lv, M., Wang, Y., Ding, R., & Wang, L. (2019). Extraction and purification of astaxanthin from shrimp shells and the effects of different treatments on its content. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(1), 24-29.
- Izzaty,A., Dewi,N., Pratiwi Noviana, I.D. (2014). *Ekstrak haruan(Channa striata)secara efektif menurunkan jumlah limfosit faseinflamasi dalam penyembuhan luka(Extract of haruan (Channa striata) decreases lymphocyte count in inflammatory phase of wound healing process effectively)*. Dentofasial, Vol.13, No.3:176-181. ISSN:1412-8926.
- Ibrahim, D. M. (2006). Reduce, refine, replace: The failure of the three R's and the future of animal experimentation. *U. Chi. Legal F.*, 195.
- Iannaccone, P. M., & Jacob, H. J. (2009). Rats!. *Disease models & mechanisms*, 2(5-6), 206–210. <https://doi.org/10.1242/dmm.002733>
- Judhaswati,D,Ratna., Damayanti,O,Herna.(2018). *Kelayakan Usaha Pengolahan Limbah Kulit Udang dan Rajungan (Studi di Kabupaten Situbondo dan Banyuwangi Provinsi Jawa Timur*. Cakrawala, 12(2) 2018: 118-136. DOI: <https://doi.org/10.32781/cakrawala.v12i2.253>
- Kiemer, A. K., Hartung, T., Huber, C., and Vollmar, A. M. (2003). *Phyllanthus amarus has anti-inflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the NF-κB pathway*. J. Hepatol.38,289–297.
- Kenneth, K. *et al.*(2010). William Hematology 8th Edition. Ebook p.38-39.
- Kuedo,Z.,Sangsuriyawong, A., Klaypradit, W., Tipmanee, V., & Chonpathompikunlert, P. (2016). Effects of Astaxanthin from Litopenaeus Vannamei on Carrageenan-Induced Edema and Pain Behavior in Mice. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(3), 382. <https://doi.org/10.3390/molecules21030382>
- Kusumastuti, E., Handajani,J., Susilowati,H.(2014). *Ekspresi COX-2 dan Jumlah Neutrofil Fase Inflamasi pada Proses Penyembuhan Luka Setelah Pemberian Sistemik Ekstrak Etanolik Rosela (Hibiscus sabdariffa) (studi in vivo pada Tikus Wistar)*. Maj Ked Gi 21(1): 13 – 19.

- Lee, Seon-Jin & Bai, Se-Kyung & Lee, Kwang-Soon & Namkoong, Seung & Na, Hee-Jun & Ha, Kwon-Soo & Han, Jeong-A & Sung-Vin, Yim & Chang, Kwang & Kwon, Y. & Lee, Sung & Misun, Kim. (2003). Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I $\kappa$ B kinase-dependent NF- $\kappa$ B activation. *Molecules and cells*. 16. 97-105.
- Lee A. C. (2018). Haematologist-reviewed peripheral blood smear in paediatric practice. *Singapore medical journal*, 59(2), 64–68. <https://doi.org/10.11622/smedj.2018013>
- Lim K.C., Yusoff F.M., Shariff M., Kamarudin M.S. (2017). *Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals*. *Rev. Aquacult.* doi: 10.1111/raq.12200.
- Lin, K. H., Lin, K. C., Lu, W. J., Thomas, P. A., Jayakumar, T., & Sheu, J. R. (2015). Astaxanthin, a Carotenoid, Stimulates Immune Responses by Enhancing IFN- $\gamma$  and IL-2 Secretion in Primary Cultured Lymphocytes in Vitro and ex Vivo. *International journal of molecular sciences*, 17(1), 44. <https://doi.org/10.3390/ijms17010044>
- L,M-A,J, Seabra ., L,F,C, Pedrosa. (2010). *Astaxanthin : Structural and Fungsional Aspect*. *Rev. Nutr., Campinas*, 23(6):1041-1050, nov./dez.
- Malviya, Rishabha & Bansal, Vvipin & Pal, Om & Sharma, Pramod. (2010). High performance liquid chromatography: A short review. *Journal of Global Pharma Technology*. 2. 22-26.
- Macedo, Rita & Bolin, Anaysa & Marin, Douglas & Otton, Rosemari. (2010). Astaxanthin addition improves human neutrophils function: In vitro study. *European journal of nutrition*. 49. 447-57. 10.1007/s00394-010-0103-1.
- Munshi, H. G., & Montgomery, R. B. (2000). Severe neutropenia: a diagnostic approach. *The Western journal of medicine*, 172(4), 248–252. <https://doi.org/10.1136/ewjm.172.4.248>
- Novoveská, L., Ross, M. E., Stanley, M. S., Pradelles, R., Wasiolek, V., & Sassi, J. F. (2019). Microalgal Carotenoids: A Review of Production, Current Markets, Regulations, and Future Direction. *Marine drugs*, 17(11), 640. <https://doi.org/10.3390/md17110640>
- Parasuraman S. (2011). Rat guide: A guide to health, medication use, breeding, and care of rats. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*, 2(4), 313–314. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.85932>

- Petrova, O. E., & Sauer, K. (2017). High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Based Detection and Quantitation of Cellular c-di-GMP. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1657, 33–43. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7240-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7240-1_4).
- Purnamasari, Indah., Purnama, Dewi., Utami, Fajar, M. A. (2017). *Pertumbuhan Udang Vaname (Litopenaeus vannamei) di Tambak Intensif*. Jurnal Enggano Vol. 2, No. 1. EISSN: 2527-5186.
- P.J. Worsfold. (2005). *SPECTROPHOTOMETRY(overview)*. Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition), Elsevier. Pages 318-321. ISBN 9780123693976. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00714-7>
- Ridwan Endi. (2013). “*Etika pemanfaatan hewan percobaan dalam penelitian kesehatan*”. Indon Med Assoc; Vol. 63 No. 3: h. 114
- Rosales, C., Lowell, C. A., Schnoor, M., & Uribe-Querol, E. (2017). Neutrophils: Their Role in Innate and Adaptive Immunity 2017. *Journal of immunology research*, 2017, 9748345. <https://doi.org/10.1155/2017/9748345>
- Santos, Suzan & Cahu, Thiago & Firmino, Guilherme & Castro, Célia & Carvalho, Luiz & Bezerra, Ranilson. (2012). Shrimp Waste Extract and Astaxanthin: Rat Alveolar Macrophage, Oxidative Stress and Inflammation. *Journal of food science*. 77. H141-6. 10.1111/j.1750-3841.2012.02762.x.
- Sachindra, N. M., Bhaskar, N., & Mahendrakar, N. S. (2005). Carotenoids in different body components of Indian shrimps. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(1), 167-172.
- Salvemini, D., Wang, Z. Q., Wyatt, P. S., Bourdon, D. M., Marino, M. H., Manning, P. T., & Currie, M. G. (1996). Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *British journal of pharmacology*, 118(4), 829–838. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15475.x>
- Shahidi, F., Metusalach, & Brown, J. A. (1998). Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. *Critical reviews in food science and nutrition*, 38(1), 1–67. <https://doi.org/10.1080/10408699891274165>
- Sowmya, R. & Nm, Sachindra. (2012). Evaluation of antioxidant activity of carotenoid extract from shrimp processing byproducts by in vitro assays and in

- membrane model system. *Food Chemistry*. 134. 308–314. 10.1016/j.foodchem.2012.02.147.
- Suman dan Satria.(2013).*Strategi Pengelolaan Udang Laut Dalam Secara Berkelanjutan di Indonesia*. J. Kebijakan. Perikan. Ind. Vol.5 No. 1, p 47-55.
- Swastawati, Fronthea & Wijayanti, Ima & Susanto, Eko. (2008). *Pemanfaatan Limbah Kulit Udang Menjadi Edible Coating untuk Mengurangi Pencemaran Lingkungan*.  
puslit2.petra.ac.id/ejournal/index.php/jtl/article/viewFile/17554/17469.4:101-106.
- Tayeb, M.A. & Ismail, B.S. & Jansar, Khairiatul & Choo Ta, Goh. (2016). Troubleshooting and maintenance of high-performance liquid chromatography during herbicide analysis: An overview. 45. 237-245.
- Taksima, Takunrat & Chonpathompikunlert, Pennapa & Sroyraya, Morakot & Hutamekalin, Pilaiwanwadee & Limpawattana, Maruj & Klaypradit, Wanwimol. (2019). Effects of Astaxanthin from Shrimp Shell on Oxidative Stress and Behavior in Animal Model of Alzheimer's Disease. *Marine Drugs*. 17. 628. 10.3390/md17110628.
- Takanari, J., Hirayama, Y., Homma, K., Miura, T., Nishioka, H., & Maeda, T. (2015). Effects of Active Hexose Correlated Compound on the Seasonal Variations of Immune Competence in Healthy Subjects. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 20(1), 28–34. <https://doi.org/10.1177/2156587214555573>
- Ushakumari, U.N. and Ramanujan, R. (2012). *Astaxanthin from shrimp shell wastes*. *International Journal Of Pharmaceutical Chemistry Research*. 1: 1-6
- Vinegar R, Schreiber W, Hugo R. Biphasic development of carrageenin edema in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1969 Mar;166(1):96–103
- Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese medicine*, 13, 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>