

UJI TOKSISITAS EKSTRAK DAUN TENGGULUN (*Protium javanicum* Burm. F) DENGAN METODE BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BSLT)

N. M. Puspawati*, I K. D. Yasa dan I. A. R. A. Asih

Program Studi Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Udayana,
Jalan Raya Kampus Unud, Jimbaran-Bali, Indonesia

*Email: made_puspawati@unud.ac.id

ABSTRAK

Tumbuhan tenggulun (*Protium javanicum* Burm F.) secara tradisional telah digunakan untuk mengatasi berbagai macam penyakit seperti batuk, perut nyeri, diare, dan radang. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk menentukan toksisitas ekstrak *n*-heksana, etil asetat, *n*-butanol daun tenggulun terhadap larva *Artemia salina* L dan mengidentifikasi senyawa aktifnya. Toksisitas ekstrak ditentukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dan identifikasi senyawa aktifnya dengan LCMS/MS (*Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*). Maserasi 1000 g daun tenggulun dengan metanol menghasilkan 116,9936 g ekstrak kasar metanol. Partisi ekstrak kasar metanol memakai pelarut *n*-heksana, etil asetat, dan *n*-butanol masing-masing menghasilkan ekstrak kental *n*-heksana, etil asetat, dan *n*-butanol. Hasil uji toksisitas terhadap ekstrak *n*-heksana, etil asetat, dan *n*-butanol diperoleh nilai LC₅₀ sebesar 218,78; 134,90; dan 223,87 ppm. Ekstrak etil asetat menunjukkan toksisitas yang relatif lebih tinggi dibandingkan ekstrak lainnya. Pemisahan senyawa aktif pada ekstrak etil asetat dilakukan dengan metode kromatografi vakum cair (KVC) dengan fase diam silika gel dan fase gerak (*n*-heksana 100% sampai metanol 100 %) menghasilkan 5 fraksi (FA, FB, FC, FD, dan FE). Toksisitas tertinggi pada konsentrasi uji 100 ppm ditunjukkan oleh FA dengan persentase kematian larva 83,33%. Hasil analisis spectra LC-MS/MS dari fraksi aktif ekstrak etil asetat daun tenggulun FA menunjukkan adanya kandungan senyawa aktif yang diduga sebagai *benzodioxepin-7-yl-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one* dan *10-(1,3-benzodioxol-5-yl)-9H-[2]benzofuro[6,5-g][1,3]benzodioxol-7-one*.

Kata kunci: *Brine Shrimp Lethality Test*, LC-MS/MS, Tenggulun (*Protium javanicum* Burm F), toksisitas.

ABSTRACT

Tenggulun (*Protium javanicum* Burm F.) plant has traditionally been used to treat various diseases such as coughing, stomachaches, diarrhea, and inflammation. This study aims to determine the toxicity of *n*-hexane, ethyl acetate, and *n*-butanol of the tenggulun leaves extracts against *Artemia salina* L larvae and identify its active compounds. Toxicity test was performed using the *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) method and identification with LCMS/MS (*Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*). Maceration of 1000 g of tenggulun leaves powder with methanol produced 116.9936 g of crude methanol extract. The crude methanol extract was then partitioned into *n*-hexane, ethyl acetate, and *n*-butanol extracts respectively. The toxicity test result expressed as LC₅₀ value for the *n*-hexane, ethyl acetate, and *n*-butanol extracts were 218.78, 134.90, and 223.87 ppm respectively. This result suggested that the ethyl acetate extract showed relatively higher toxicity than the others. The separation of the active compound in the ethyl acetate extract was carried out by the vacuum liquid chromatography (VLC) method producing 5 combined fractions (FA, FB, FC, FD, and FE). The highest toxicity at 100 ppm was shown by FA with a percentage mortality of 83.33%. The analysis of LC-MS/MS data showed that the active fraction of the ethyl acetate extract of the tenggulun leaves FA contained terpenoid compounds that tentatively assigned as *benzodioxepin-7-yl-7H-furo [3,2-g] chromen-7-one* and *10-(1,3-benzodioxol-5-yl)-9H-[2]benzofuro[6,5-g][1,3]benzodioxol-7-one*.

Keywords: BSLT, LCMS/MS, Tenggulun (*Protium javanicum* Burm F), toxicity.

PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit yang mematikan yang ditakuti oleh masyarakat. Berdasarkan data statistika Badan Kesehatan Dunia (WHO) (2017) melaporkan bahwa pada

tahun 2015 penyakit kanker mengakibatkan 22% kematian atau tidak kurang dari 8,8 juta kematian pada manusia. Beberapa pengobatan yang telah dilakukan untuk mengurangi kematian yang disebabkan oleh kanker antara lain kemoterapi, pembedahan, dan radioterapi. Pengobatan tersebut dilakukan untuk menghilangkan dan

membunuh sel kanker pada tubuh manusia, namun biaya yang diperlukan untuk pengobatan tersebut cukup tinggi dan menimbulkan banyak efek samping, seperti rambut rontok, kulit menghitam, dan badan kurus (Bignold, 2015). Hal ini menyebabkan masyarakat mulai beralih ke pengobatan alternatif untuk dapat menyembuhkan kanker dengan efek samping yang relatif lebih sedikit.

Secara tradisional tumbuhan telah digunakan untuk mengobati kanker dan beberapa senyawa aktif antikanker dari tumbuhan seperti vicristine, vinblastin, artemisin telah diisolasi (Yang Qu *et al.*, 2018 dan Abu-Lafi *et al.*, 2019). Spesies tumbuhan dari genus *protium* seperti *P.heptaphylum*, *P.olongiphylum* dilaporkan bersifat antikanker (Taylor *et al.*, 2006). *Protium serratum* Wall juga dilaporkan bersifat toksik dengan nilai LC_{50} sebesar 3,57 ppm (Tanamatayarat *et al.*, 2016) yang berpotensi sebagai antikanker.

Protium javanicum Burm F. merupakan salah satu tumbuhan obat Indonesia dari genus *protium*, famili Burseraceae yang di Bali dikenal dengan tumbuhan tenggulun yang dipercaya memiliki khasiat untuk mengatasi beberapa macam penyakit seperti batuk, perut nyeri, diare, dan radang. Kandungan metabolit sekunder daun tenggulun yaitu senyawa golongan fenolik, steroid, terpenoid, flavonoid, tanin (Suirta *et al.*, 2016), dan minyak atsiri (Sukmajaya *et al.*, 2012). Senyawa α dan β amirin dari golongan terpenoid, sitosterol dari golongan steroid dan beberapa senyawa alkohol rantai panjang telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi dari daun tenggulun (Puspawati *et al.*, 2019). Peneliti lainnya, Adfa *et al.* (2010) melaporkan adanya kandungan senyawa kuersetin, dan skopoletin pada ekstrak daun tenggulun. Beberapa penelitian menunjukkan senyawa α dan β amirin, sitosterol, dan kuersetin, bersifat antikanker sehingga daun tenggulun berpotensi sebagai antikanker (Abu-Lafi *et al.*, 2019 dan Dajas *et al.*, 2012).

Kajian ilmiah tentang khasiat daun tenggulun lebih banyak dilaporkan pada minyak atisrinya (Sukmajaya *et al.*, 2012; Suirta *et al.*, 2016; dan Setianingsih *et al.*, 2013). Ekstrak metanol daun tenggulun dilaporkan memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi (Ahuja *et al.*, 2019), sebagai antibakteri (Puspawati *et al.*, 2020) dan beberapa penelitian melaporkan bioaktivitas ekstrak kulit batang tenggulun sebagai antiinflamasi (Dewi *et al.*, 2015 dan Suirta *et al.*, 2016).

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) ialah salah satu metode yang dipakai untuk mengetahui bahan – bahan yang dapat dimanfaatkan sebagai obat dengan cara menguji toksisitas sampel terhadap larva *Artemia salina* Leach. Hasil uji toksisitas ini memberikan hubungan positif terhadap potensinya sebagai bahan antikanker. Apabila hasil uji memberikan nilai LC_{50} kurang dari 1000 ppm maka bahan alam yang diuji mengandung senyawa yang berpotensi sebagai antikanker (Hostettmann, 1991).

Sejauh ini belum ditemukan penelitian yang mengkaji potensi ekstrak daun tenggulun sebagai antikanker. Berdasarkan latar belakang diatas dan melalui pendekatan kemotaksonomi, maka penulis tertarik untuk menguji toksisitas ekstrak daun tenggulun (*Protium javanicum* Burm. F) sebagai skrining awal untuk melihat potensinya sebagai senyawa antikanker dan mengidentifikasi senyawa aktifnya.

MATERI DAN METODE

Bahan

Daun tenggulun yang diambil dari daerah Kediri-Tabanan dan telah dideterminasi merupakan spesies *Protium javanicum* Burm F, telur *Artemia salina* L, etil asetat p.a, *n*-butanol p.a, *n*-heksana p.a, metanol teknis, aquades, silika gel GF254 untuk kromatografi kolom, plat Kromatografi lapis tipis (digunakan silika gel GF254), dimetilsulfoksida (DMSO), suspense rasi, air laut, pereaksi sitoborat, kontrol pelarut, pereaksi Wagner, Pereaksi Meyer, $FeCl_3$ 1%, asam klorida (HCl), logam magnesium, asetat anhidrida dan H_2SO_4 pekat.

Alat

Akuarium, seperangkat alat gelas, *rotary evaporator*, pipet volume, mikro pipet, seperangkat alat kromatografi vacum cair, kertas saring, lampu pijar, aerator, neraca analitik, vial, spatula, labu ukur, lampu ultra violet (UV) λ_{254} , dan 366 nm, alat penyemprot noda, LC-MS/MS XEVO G2-S QTOF.

Cara Kerja

Persiapan Sampel dan Uji Kadar Air

Daun tenggulun muda hingga setengah tua yang sudah bersih dikeringanginkan, dipotong kecil – kecil, dan diblender sampai menjadi serbuk. sebanyak 3 g serbuk daun tenggulun kemudian ditentukan kadar airnya dengan metode gravimetri.

Ekstraksi dan Partisi Daun Tenggulun

Satu kilogram serbuk kering daun tenggulun diekstraksi dengan metanol selama 3 x 24 jam selanjutnya pelarutnya diuapkan dengan *rotary evaporatory*. Kemudian ekstrak kental metanol dipartisi dengan pelarut berbeda polaritas yaitu n-heksana, etil asetat dan n-butanol setelah itu pelarutnya diuapkan dengan *rotary evaporator*.

Uji Toksisitas

Ekstrak n-heksana, etil asetat, dan n-butanol diuji toksisitasnya dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) yang dikembangkan Meyer (1982) dalam penelitian Cahyaningrum *et al* (2013). Ekstrak yang memiliki sifat paling toksik dilanjutkan skrining fitokimia, pemisahan dan pemurnian.

Uji Fitokimia Alkaloid

Keberadaan senyawa alkaloid dilihat melalui uji dengan pereaksi Wagner dan Meyer. Adanya senyawa alkaloid terlihat dari timbulnya endapan coklat yang dihasilkan setelah penambahan pereaksi Wagner dan endapan putih setelah penambahan pereaksi Meyer.

Flavonoid

Keberadaan senyawa flavonoid dapat dilihat dengan uji Wilstatter. Uji Wilstatter dilakukan dengan cara menambahkan HCl pekat pada sampel dalam alkohol kemudian ditambahkan 2-3 potong kecil logam Magnesium. Adanya senyawa flavonoid terlihat dari perubahan warna yang dihasilkan yakni warna merah sampai jingga.

Fenol

Dalam Pemeriksaan senyawa golongan fenol dilakukan dengan penambahan FeCl₃ 1% pada sampel. Hasil positif terdapat senyawa fenol ditunjukkan dengan perubahan warna larutan sampel menjadi biru hingga hijau kehitaman.

Saponin

Dalam Uji saponin dilakukan dengan menambahkan aquades pada sampel lalu dipanaskan dan dikocok selama 2 menit. Terbentuk busa yang stabil menandakan sampel mengandung saponin.

Steroid dan Terpenoid

Uji senyawa terpenoid dan steroid dilakukan dengan penambahan pereaksi Leibermann-Burchard (asetat anhidrida - H₂SO₄). Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna merah hingga ungu untuk terpenoid dan hijau hingga biru untuk steroid.

Pemisahan dan Pemurnian

Ekstrak paling toksik dipisahkan dengan metode kromatografi vakum cair (KVC) secara gradien selanjutnya dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dan dielusi dengan eluen etil asetat : asam asetat : asam formiat : air (10:1:1:2,6). Penggabungan eluat menjadi beberapa fraksi dilihat berdasarkan kesamaan pola noda pada plat KLT. Kemudian masing – masing fraksi diuji toksisitasnya untuk memperoleh fraksi paling toksik yang dilanjutkan pada identifikasi LCMS/MS.

Identifikasi LC-MS/MS

Senyawa aktif pada isolat yang memiliki sifat toksik tertinggi selanjutnya dianalisis dengan LC-MS/MS XEVO G2-S QTOF. Identifikasi dilakukan dengan membandingkan spektrum hasil analisis dengan spektrum dari senyawa standar yang terdapat dalam database. Data yang diperoleh diproses dengan aplikasi *masslynx v4.1* kemudian rumus struktur dicek pada website www.chemspider.com.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang digunakan pada penelitian ini merupakan daun tenggulun dari spesies *Protium javanicum* Burm F. dalam bentuk serbuk kering dengan kadar air 8,28%. Penentuan kadar air sampel sangat penting dilakukan karena bila kadar air sampel terlalu tinggi maka sampel sangat rentan terhadap pertumbuhan jamur dan mikroba lainnya yang dapat menurunkan kualitas sampel. Kadar air suatu sampel tidak boleh melebihi batas maksimal 10% (BPOM, 2000) sehingga sampel serbuk daun tenggulun yang digunakan pada penelitian ini sudah memenuhi kriteria standarisasi sampel.

Hasil maserasi 1000 gram sampel dengan metanol 90% menghasilkan ekstrak kental berwarna hijau kehitaman sebanyak 116,99 gram dengan rendemen sebesar 11,7%. Metanol baik digunakan sebagai pelarut dikarenakan memiliki gugus (-CH₃) yang bersifat

non-polar dan gugus (-OH) yang bersifat polar yang berdekatan, sehingga pelarut ini akan menarik lebih banyak kandungan kimia dari senyawa nonpolar hingga senyawa polar yang terkandung dalam sampel. Selain itu, metanol memiliki rumus struktur yang relatif lebih pendek dari alkohol lainnya sehingga memiliki titik didih yang rendah dan mudah diuapkan. Dari hasil proses partisi 10 gram ekstrak dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan *n*-butanol dihasilkan berturut-turut sebanyak 1,50; 1,56 dan 0,68 g ekstrak. Proses partisi menghasilkan jumlah ekstrak etil asetat yang hampir sama dengan ekstrak *n*-heksana dan lebih besar dari *n*-butanol.

Nilai LC₅₀ hasil Uji toksisitas pada ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan *n*-butanol disajikan pada Tabel 1. Nilai LC₅₀ didapatkan berdasarkan perhitungan dengan metode Reed-Muench dengan memplotkan % mortalitas dengan log konsentrasi (Colegate dan Molyneux, 1993). Seperti data pada Tabel 1, ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan *n*-butanol mempunyai nilai LC₅₀ secara berturut – turut sebesar 218,78; 134,90 dan 223,87 ppm. Meyer (1982) menyatakan bahwa ekstrak yang memiliki nilai LC₅₀ kurang dari 1000 ppm bersifat toksik dan berpotensi sebagai antikanker, sehingga baik ekstrak *n*-heksana, etil asetat maupun *n*-butanol bersifat toksik dan berpotensi sebagai antikanker. Ketiga ekstrak daun tenggulun ini memiliki sifat toksik lebih rendah dibandingkan dengan genus protium lainnya yakni *Protium serratum* Wall dengan nilai LC₅₀ sebesar 3,57 ppm, namun kedua genus ini sama-sama berpotensi sebagai agen antikanker. Berdasarkan data nilai LC₅₀ pada ketiga ekstrak daun tenggulun, ekstrak etil asetat memiliki nilai LC₅₀ relatif paling kecil atau bersifat relatif paling toksik dibandingkan dengan ekstrak lainnya.

Tabel 1. Nilai LC₅₀ ekstrak hasil partisidaun tenggulun

Jenis Ekstrak	%Mortalitas			Nilai LC ₅₀ ppm
	10 ppm	100 ppm	1000 ppm	
n-heksana	8,88 ± 3,37	32,42 ± 8,20	87,78 ± 4,55	218,78
Etil asetat	8,21 ± 3,72	43,94 ± 6,94	100,00 ± 0,00	134,90
n-butanol	7,41 ± 3,20	29,29 ± 3,50	100,00 ± 0,00	223,87

Hasil skrining fitokimia ekstrak etil asetat daun tenggulun yang bersifat paling toksik dicantumkan pada Tabel 2. Berdasarkan data pada Tabel 2 memperlihatkan bahwa terdapat golongan senyawa alkaloid, flavonoid, fenol, saponin, dan terpenoid pada ekstrak etil asetat daun tenggulun namun tidak mengandung golongan senyawa steroid.

Tabel 2. Hasil Uji fitokimia ekstrak etil asetat daun tenggulun

Uji Fitokimia	Pereaksi	Perubahan yang terjadi	Hasil
Alkaloid	Meyer	Endapan putih	+
	Wagner	Endapan coklat	+
Flavonoid	Mg-HCl	Kuning	+
		kemerahan	
Fenol	FeCl ₃	Hijau kehitaman	+
Saponin	Air-HCl	Adanya busa	+
		Coklat	
Terpenoid	LB	kemerahan	+
Steroid	LB	Tidak ada	-

Keterangan: + = positif, - = negatif,
LB = Lieberman-Burchard

Ekstrak aktif etil asetat kemudian dipisahkan dengan metode kromatografi vakum cair (KVC) secara gradien. Pemisahan ini dilakukan dengan menaikkan sifat kepolaran pada masing – masing eluen secara perlahan dari 100% *n*-heksana sampai 100 % metanol. Hasil pemisahan diperoleh 15 eluat yang disajikan pada Tabel 3.

Hasil pemisahan tersebut selanjutnya dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT) yang dielusi dengan eluen asam etil asetat : asam asetat : asam formiat : air (10:1:1:2,6) dan dideteksi dengan pereaksi sitoborat. Eluat yang memiliki kesamaan pola noda pada plat KLT digabungkan menjadi satu fraksi. Proses penggabungan dengan KLT diperoleh 5 fraksi yakni FA, FB, FC, FD, dan FE. Kelima fraksi tersebut masing-masing diuji toksisitasnya pada konsentrasi uji 100 ppm. Hasil uji toksisitas kelima fraksi tersebut disajikan pada Tabel 4. Seperti tertera pada Tabel 4 pada konsentrasi 100 ppm, FA dapat membunuh larva *Artemia salina* Leach paling banyak dibandingkan fraksi lainnya yaitu sebesar 83,33%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa FA bersifat paling toksik dibandingkan fraksi lainnya. FA selanjutnya diidentifikasi untuk mengetahui kandungan senyawa aktifnya dengan menggunakan LC-MS/MS.

Tabel 3. Hasil pemisahan dengan metode KVC secara gradien

Fase Gerak	Warna larutan	Fraksi
H:E (70 : 30)(v/v)	Bening	E1
H:E (60 : 40)(v/v)	Kuning	E2
H:E (50 : 50)(v/v)	Kuning	E3
H:E (40 : 60)(v/v)	Kuning	E4
H:E (30 : 70)(v/v)	Kuning	E5
H:E (20 : 80)(v/v)	Kuning	E6
E 100 (v/v)	Kuning	E7
E:M (80 : 20)(v/v)	Kuning	E8
E:M (70 : 30)(v/v)	Coklat	E9
E:M (60 : 40)(v/v)	Coklat	E10
E:M (50 : 50)(v/v)	Coklat	E11
E:M (40 : 60)(v/v)	Coklat	E12
E:M (30 : 70)(v/v)	Merah muda	E13
E:M (20 : 80)(v/v)	Merah muda	E14
M 100 (v/v)	Merah muda	E15

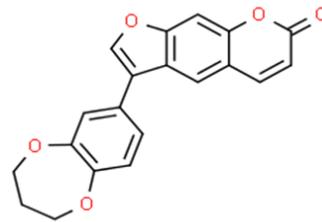
Keterangan: H = n-heksana, E = etil asetat, M = metano

Tabel 4. Hasil proses penggabungan dengan KLT dan uji kematian terhadap *Artemia salina*L.

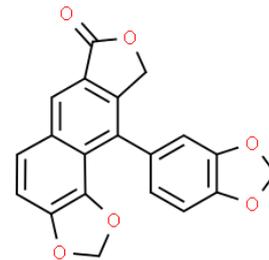
Jenis Fraksi Gabungan	Fraksi	Hasil Uji Kematian Pada Konsentrasi 100 ppm (%)
FA	F2 - F3	83,33
FB	F4 - F6	10,00
FC	F7	6,33
FD	F8 - F9	66,67
FE	F10 – F15	3,33

Pada proses identifikasi senyawa aktif yang terkandung pada FA ekstrak etil asetat daun tenggulun dengan LC-MS/MS terdapat 2 puncak kromatogram dengan waktu retensi 9,12 dan 9,96 menit yang dapat diidentifikasi. Senyawa yang teridentifikasi pada waktu retensi 9,12 menit yaitu senyawa 3-(3,4-Dihydro-2H-1,5-benzodioxepin-7-yl)-7H-furo[3,2g]chromen-7-one dan pada waktu retensi 9,92 menit yaitu senyawa 10-(1,3-benzodioxol-5-yl)-9H-[2]benzofuro[6,5-g][1,3]benzodioxol-7-one (Helioxhantin). Kedua senyawa yang teridentifikasi tersebut merupakan senyawa yang termasuk kedalam golongan terpenoid. Hal ini dikarenakan fraksi A merupakan gabungan dari senyawa - senyawa yang relatif bersifat nonpolar.

Pada penelitian Adfa *et al.* (2013) melaporkan bahwa tumbuhan tenggulun memiliki kandungan 6-desacetylnimbin yang memiliki struktur dasar yang sama dengan senyawa - senyawa diatas yang merupakan golongan terpenoid. Menurut Deppava *et al.* (2011) menjelaskan bahwa kebanyakan senyawa – senyawa dari golongan terpenoid berpotensi sebagai agen antikanker. Struktur senyawa – senyawa tersebut dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2.



Gambar 1. Senyawa 3-(3,4-Dihydro-2H-1,5-benzodioxepin-7-yl)-7H-furo[3,2g]chromen-7-one



Gambar 2. Senyawa 10-(1,3-benzodioxol-5-yl)-9H-[2]benzofuro[6,5-g][1,3]benzodioxol-7-one

SIMPULAN DAN SARAN

Ekstrak n-heksana, etil asetat, dan n-butanol daun tenggulun bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* L. dengan nilai LC₅₀ berturut-turut 218,78; 134,90, dan 223,87 ppm. Ekstrak etil asetat daun tenggulun menunjukkan toksisitas yang relatif lebih tinggi dari ekstrak lainnya. Fraksi A (FA) yang menunjukkan toksisitas paling tinggi pada ekstrak aktif etil asetat daun tenggulun diduga mengandung senyawa 3-(3,4-Dihydro-2H-1,5-benzodioxepin-7-yl)-7H-furo [3,2g]chromen-7-one dan 10-(1,3-benzodioxol-5-yl)-9H-[2]benzofuro[6,5-g][1,3]benzodioxol-7-one.

Sebagai saran, perlu dilakukan pemurnian lebih lanjut dan pengujian terhadap sel kanker pada Fraksi A (FA).

DAFTAR PUSTAKA

- Abu-Lafi, S., Rayan, B., Kadan S., Abu-Lafi, M., dan Rayan, A. 2019. Anticancer Activity and Phytochemical Composition of wild *Gundelia tournefortii*. *Oncology letters*. 17: 713-717.
- Adfa, M., Yoshimura, T., Komura, K., and Koketsu, M. 2010. Antitermite Activities of Coumarin Derivatives and Scopoletin from *Protium javanicum* Burm. F. *J Chem Ecol*. 36: 720-726.
- Adfa, M., Yoshimura, T., Komura, K., and Koketsu, M. 2013. Chemical constituents of Indonesian plant *Protium javanicum* Burm. F. and their antifeedant activities against *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*. (27)3: 270-273.
- Ahuja, A., Kim, M. Y., and Cho, J. Y. 2019. *Protium Javanicum* Burm. Methanol Extract Anttenuates LPS-induced Inflammatory Activities in Macrophage-Like RAW264.7 Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1-12.
- Bignol, L. P. 2015. *Principles of Tumors A Translational Approach to Foundations*. USA: Elviser Inc.
- BPOM RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Cahyaningrum, P. T., Swantara, I. M. D., dan Mahardika, I. G.. 2015. Toksisitas Isolat dari Ekstrak Metanol Spons *Clatharia (Thalysias) sp* Terhadap Larva *Artemia salina* L. *Cakra Kimia*. 3(12): 50-55.
- Colegate, S. M., dan Molyneux, R. J. *Bioactive Natural Products Detection, Isolation and Structural Determination*. USA: CRC Press Inc.
- Dajas, F. 2012. Life or Death: Neuroprotective and Anticancer Effects of Quercetine. *Journal of Ethnopharmacology*. 143: 383-396.
- Devappa, R. K., Makar, H. P. S., dan Becker K. 2011. *Jatropha Diterpen: a Review*. *J Am Oil Chem Soc*88. 302-322
- Dewi, A. A. T. S., Puspawati, N. M., dan Suarya, P. 2015. Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Eter Kulit Batang Tenggulun (*Protium javanicum*Burm) Terhadap Edema Pada Tikus Wistar Yang Diinduksi Dengan Karagenan. *Jurnal Kimia*. 9(1): 13-19.
- Hostettmann, K. 1991. *Methods in Plant Biochemistry Volume 6 Assay for Bioactivity*. New York: Academic Press Limited.
- Puspawati, M. N., Prager R. H., and Perkin M. V. 2019. The Chemical constituent of Tenggulun (*Protium javanicum* Burm F.) Leaf. *Proceedings of the Indonesian Chemical Society*. 1(1): 17-22.
- Puspawati, N. M., Widiari, N. L. P. F., Sukadana. I. M. 2020. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tenggulun (*Protium javanicum* Burm F.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Kimia*. 14(1): 56 – 62.
- Setianingsih, L. P. P., Suirta W., dan Puspawati, M. 2013. Uji Toksisitas Minyak Atsiri Daun Tenggulun (*Protium javanicum* Burm. F.) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Jurnal Kimia*. 7(2): 133-140.
- Suirta, I. W., Puspawati, N. M., dan Asih, I. A. R. A. 2016. Aktivitas Antiinflamasi Topikal Minyak Atsiri dan Ekstrak Eter Tumbuhan Tenggulun. *Protium javanicum* Burm Terhadap Model Inflamasi Kulit Pada Tikus. *Cakra Kimia*. 1(4): 8-17.
- Sukmajaya, A. P. I G. P., Puspawati, N. M., dan Putra, A. A. B. 2012. Analisis Kandungan Minyak Atsiri Daun Tenggulun (*Protium javanicum* Burm. F.) dengan Metode Kromatografi Gas Spektroskopi Massa. *Jurnal Kimia*. 6(2): 155-162.
- Tanamatayarat, P. 2016. Antityrosinase, antioxidative activities, and brine shrimp lethality of ethanolic extracts from *Protium serratum* (Wall. ex Colebr.) Engl. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 6(12): 1050-1055.
- Taylor, P. G., Cesari, I. M., Arsenak, M., Ballen, D., Abad, M. J., Fernandes, A., Milano, B., Ruiz, M. C ., Williams, B., dan Michelangeli, F. 2006. Evaluation of Venezuelan Medicinal Plant Extract for Antitumor and Antiprotease Activities. *Pharmaceutical Biology*. 5(44): 349-362.
- Yang, Q., Safonova, O., dan De Luca, V. 2018. *Completion of The Canonical Pathway for Assembly of Anticancer Drugs Vincristine/Vinblastine in Catharanthus rooseus*. Department of Biological Sciences. Brock University. Canada.