

Sintesis Senyawa Turunan Khalkon dan Flavon Berbahan Dasar Vanilin dan Uji Sitotoksik Terhadap Sel Kanker Serviks (Hela), Sel Kanker Kolon (Widr), dan Sel Kanker Payudara (T47D) Secara In Vitro

Synthesis of Chalcones and Flavones Derivatives From Vanillin and In Vitro Cytotoxic Test Against Cervical (Hela) Cancer Cell, Colon (Widr) Cancer Cell, And Breast (T47D) Cancer Cell

Endang Lestari, Sabirin Matsjeh* dan Respati Tri Swasono

Departemen Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Gadjah Mada,
Sekip Utara Yogyakarta 55281

Abstrak

Telah dilakukan sintesis dan uji sitotoksitas secara in vitro senyawa turunan khalkon dan flavon dari vanilin. Senyawa turunan khalkon telah disintesis melalui reaksi Claisen-Schmidt dari vanilin dengan 2-hidroksiasetofenon dan 2,4-dihidroksiasetofenon dengan katalis KOH 40% dan KSF montmorilonit dalam metanol yang diaduk selama 24-48 jam dilanjutkan dengan refluks selama 24 jam. Melalui reaksi ini diperoleh senyawa 2',4'-dihidroksi-3-metoksikhalkon (senyawa **1**) dan 2',4',4'-trihidroksi-3-metoksikhalkon (senyawa **2**). Melalui reaksi siklisasi oksidatif antara senyawa **1** dan **2** dengan iodine dalam pelarut DMSO akan diperoleh 4'-hidroksi-3'-metoksiflavon (senyawa **3**) dan 7,4'-dihidroksi-3'-metoksiflavon (senyawa **4**). Semua produk dilakukan karakterisasi menggunakan spektrometer FT-IR, MS-Direct, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR (senyawa **1** dan **2**). Uji sitotoksitas senyawa turunan khalkon dan flavon secara in vitro terhadap sel kanker payudara (T47D), serviks (HeLa), dan kolon (WiDr) dilakukan dengan metode MTT. Senyawa **1** berhasil disintesis dengan rendemen 13,77% berupa padatan berwarna kuning cerah, senyawa **2** berupa padatan berwarna kuning dengan rendemen 6%, senyawa **3** berupa padatan kuning dengan rendemen 53,10% dan senyawa **4** berupa padatan putih kekuningan dengan rendemen 42,25%. Berdasarkan uji aktivitas sitotoksik senyawa **1**, **2**, **3** dan **4** terhadap ketiga sel kanker dan sel vero secara in vitro menunjukkan nilai IC₅₀ berturut turut sebesar 14,05; 2,09; 79,62; dan 134,58 µg/mL (sel HeLa), 27,34; 38,76; 106,33; dan 122,82 µg/mL (sel T47D), 28,53; -52,72; 86,09; dan 109,32 µg/mL (sel WiDr); dan 100,79; 103,26; 571,18 dan 122,36 µg/mL (sel Vero). Berdasarkan nilai IC₅₀, senyawa **1** dan **2** memiliki aktivitas sitotoksik tinggi terhadap sel kanker HeLa dan WiDr; dan aktivitas sitotoksik yang sedang terhadap sel kanker T47D dan sel Vero; sedangkan senyawa **3** dan **4** memiliki aktivitas sitotoksik sedang terhadap ketiga sel kanker. Senyawa **3** dan **4** memiliki aktivitas sitotoksik berturut-turut yaitu kategori tidak memiliki aktivitas sitotoksik dan aktivitas sitotoksik sedang terhadap sel Vero.

Kata kunci: *Khalkon, Flavon, Aktivitas antikanker, Sel kanker T47D, HeLa, WiDr, Vanilin*

Abstract

Synthesis and in vitro cytotoxicity activity of chalcone dan flavone derivatives from vanillin have been carried out. The chalcone derivatives (2',4'-dihydroxy-3-methoxychalcone and 2',4',4'-trihydroxy-3-methoxychalcone) have been synthesized through Claisen-Schmidt reaction from 2-hydroxyacetophenone and 2,4-dihydroxyacetophenone with 4-hydroxy-3-methoxy benzaldehyde (vanillin) in aqueous KOH 40% and montmorillonite KSF as catalyst in methanol. Furthermore, synthesis of 4'-hydroxy-3'-methoxyflavone (compound **3**) and 7,4'-dihydroxy-3'-methoxyflavone (compound **4**) were synthesized through oxidative cyclization from 2',4'-dihydroxy-3-methoxychalcone (compound **1**) and 2',4',4'-trihydroxy-3-methoxychalcone (compound **2**) with iodine in DMSO. All these products were characterized

by FT-IR, MS-Direct, ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectrometer (compound **1** and **2**). The compounds were tested cytotoxicity activity as an anticancer agent against cervical, colon, and breast cancer cells (Hela, WiDr, and T47D cell lines) in vitro using MTT assay. The result of study showed that the compound **1** as bright yellow crystal with a yield of 13.77%, the compound **2** as yellow crystals with a yield of 6%, the compound **3** as yellow solid in yield 53.10%, and the compound **4** as yellow solid in yield 42.25%. The chalcones derivatives showed that in vitro greater activities than the flavones derivatives in Hela, WiDr and T47D cell lines. The cytotoxicity test showed that IC₅₀ value of compound **1**, **2**, **3** and **4** were 14.05; 2.09; 79.62 and 134.58 µg/mL (HeLa cell lines), 27.34; 38.76; 106.33; and 122.82 µg/mL (T47D cell lines), and 28.53; -52.72; 86.09; and 109.32 µg/mL (WiDr cell lines) and 100.79; 103.26; 571.18 dan 122.36 µg/mL (sel vero) respectively. Based on the IC₅₀ value, compound **1** and **2** were most active against Hela and WiDr cell lines and less active against T47D and Vero cell lines; compound **3** and **4** were less active against the three cancer cell lines and vero cell lines. Compound **3** were inactive against vero cell lines.

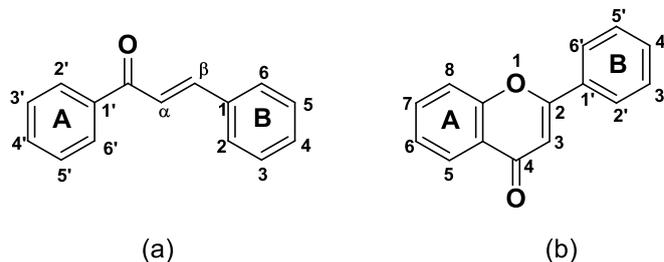
Keywords: *Chalcone, Flavone, Anticancer activity, T47D cell lines, HeLa cell lines, WiDr cell lines, Vanillin*

1. Pendahuluan

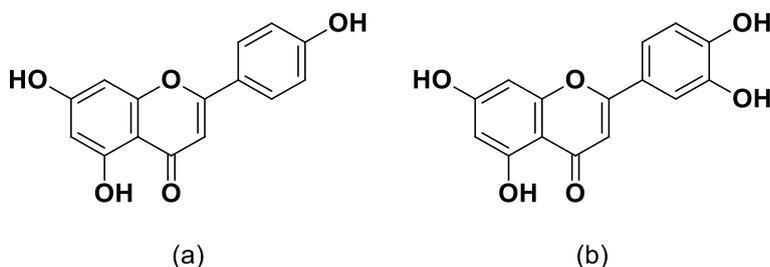
Kanker merupakan penyakit kedua yang menyebabkan kematian di seluruh dunia setelah penyakit kardiovaskular dan lebih dari 70% penyakit kanker terjadi di negara berkembang. Kematian karena penyakit kanker mengalami peningkatan terus menerus dan diperkirakan kematian dapat mencapai 12 juta pada tahun 2030 (Patel, dkk, 2011). Di Indonesia sendiri, jumlah penderita kanker serviks mencapai 19,18% dan kanker payudara mencapai 12,10% dari jumlah penduduk. Saat ini sudah banyak strategi yang dilakukan untuk pengobatan kanker diantaranya kemoterapi, operasi, fitoterapi dan radioterapi. Akan tetapi, beberapa obat kemoterapi memberikan efek samping seperti depresi sumsum tulang dan alopecia (Kuppusamy, dkk, 2014; Ranjit, dkk, 2013). Masalah ini menjadi lebih besar sejak terjadinya resistensi obat kemoterapi. Oleh karena itu, perlu kebutuhan secara terus menerus untuk mengembangkan obat antikanker yang dapat memberikan efek terapeutik maksimal tanpa menyebabkan resistensi.

Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa senyawa alam dari keluarga flavanoid secara *in vitro* memiliki aktivitas antikanker (Syam, dkk, 2012; Gracia dan Castillo, 2008). Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa polifenolik yang banyak ditemukan di tumbuhan. Beberapa senyawa golongan flavonoid diantaranya khalkon dan flavon (Gambar 1). Aktivitas sitotoksik senyawa khalkon dan flavon terhadap sel kanker dipengaruhi oleh posisi dan jenis substituen yang terikat pada kerangka kimianya. Beberapa literatur melaporkan bahwa gugus hidroksi dan metoksi yang terikat pada cincin A dan B senyawa khalkon dan flavon dapat mempengaruhi aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker. Penelitian sebelumnya melaporkan flavon apigenin dengan 3 gugus OH dan flavon luteolin dengan 4 gugus OH memiliki aktivitas antikanker yang lebih baik daripada flavanon naringenin dan flavanon eriodiktiol yaitu dengan memberikan nilai IC₅₀ secara berturut-turut sebesar 12,12; 4,57; 47,89; dan 45,95 µM terhadap sel kanker payudara (Gambar 2) (Way, dkk, 2004). Selain itu, senyawa khalkon dengan gugus hidroksi di posisi C-2' dan C-4' pada cincin A juga dilaporkan lebih aktif menghambat pertumbuhan sel kanker payudara dengan IC₅₀ sebesar 17,3 µM (Aponte, dkk, 2008). Adanya ikatan karbon α,β tidak jenuh pada senyawa khalkon juga berkontribusi dalam penghambatan sel kanker (Srinivasan, dkk, 2009; Aponte, dkk, 2008; Ferte, dkk, 1998). Penelitian sebelumnya juga mempelajari aktivitas antikanker senyawa flavonoid yang terdapat gugus hidroksi dan metoksi yang terikat pada cincin A dan B (Garcia dan Castillo, 2008). Hasil penelitian melaporkan setidaknya ada dua gugus hidroksi atau metoksi yang terikat pada cincin A dan B senyawa flavonoid akan memberikan aktivitas antikanker dan akan bertambah tinggi aktivitas antikankernya seiring dengan semakin banyak gugus hidroksi dan metoksi yang terikat. Pada

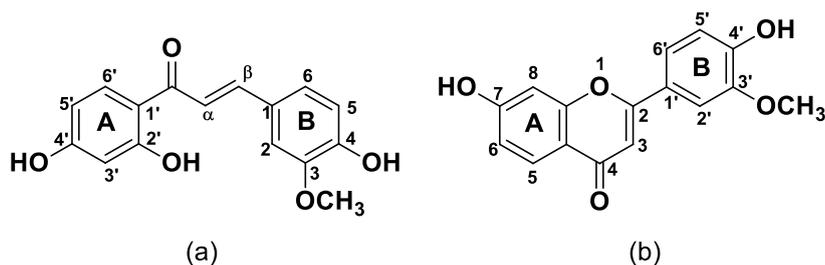
penelitian ini, senyawa turunan khalkon dan flavon yang disintesis memiliki gugus hidroksi di posisi C-2', C-4', C-7' dan gugus metoksi pada posisi C-3 (Gambar 3).



Gambar 1. (a) Struktur khalkon dan (b) Struktur flavon



Gambar 2. Flavon (a) apigenin dan (b) luteolin



Gambar 3. Senyawa turunan (a) khalkon dan (b) flavon hasil sintesis

Studi mengenai pembuatan senyawa khalkon sudah banyak dipelajari. Penelitian sebelumnya telah berhasil memanfaatkan vanilin untuk mensintesis turunan khalkon dengan 2,4-dihidroksiasetofenon melalui reaksi kondensasi Claisen-Schmidt (Srinivasan, dkk, 2009). Pada reaksi ini, atom H pada gugus hidroksi senyawa vanilin dapat diambil oleh suatu basa membentuk ion vanilat. Pembentukan ion vanilat ini menyebabkan kurang reaktifnya karbon karbonil sehingga reaksi ini susah terjadi. Adanya katalis KSF montmorilonit dapat mengatasi kurang reaktifnya karbon karbonil sehingga reaksi ini dapat berlangsung. Pada penelitian ini sintesis senyawa turunan khalkon dilakukan menggunakan metode ini. Akan tetapi, kami tidak berhasil mensintesis turunan khalkon melalui metode ini. Oleh karena itu, kami memodifikasi metode ini dengan menambahkan satu tahap reaksi yaitu penambahan akuades sebelum penambahan asam klorida.

Studi mengenai pembuatan senyawa flavon juga sudah banyak dipelajari. Penelitian sebelumnya berhasil mensintesis turunan flavon melalui siklisasi turunan 2'-hidroksikhalkon dengan iodin dalam pelarut DMSO yang direfluks pada temperatur 120 °C selama 24 jam (Choy dan Kwong, 2013). Penelitian sebelumnya juga telah berhasil mensintesis senyawa 7-hidroksi, 4'-metoksiflavon dari senyawa turunan khalkon menggunakan iodin dalam pelarut DMSO yang direfluks selama 3 jam (Ngama, dkk, 2015). Selain itu, penelitian sebelumnya juga telah berhasil mensintesis 7,4'-dihidroksi-3'-metoksiflavon melalui pembentukan senyawa khalkon yang dimodifikasi gugus OH pada posisi C-2' dan C-4' melalui reaksi benzoilasi. Kemudian sintesis senyawa flavon ini dilakukan

dengan mereaksikan khalkon dengan iodine dalam pelarut DMSO yang direfluks pada temperatur 140 °C-150 °C selama 1 jam (Murthy, dkk, 2010). Pada penelitian ini, kami melakukan sintesis 4'-hidroksi-3'-metoksiflavin dan 7,4'-dihidroksi-3'-metoksiflavin tanpa melalui tahap pembentukan senyawa khalkon yang terbenzoylasi. Selanjutnya, sintesis turunan flavon ini dilakukan dengan mereaksikan senyawa turunan khalkon dengan iodine dalam pelarut DMSO yang direfluks pada temperatur 120 °C selama 5 jam. Sebelumnya, kami menggunakan temperatur 140 °C pada sistem refluks. Akan tetapi, senyawa flavon tidak berhasil terbentuk. Oleh karena itu kami memodifikasi temperatur dan waktu refluks untuk sintesis flavon. Senyawa turunan khalkon dan flavon yang telah berhasil disintesis diharapkan secara *in vitro* memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker HeLa, WiDr, T47D dan sel normal (vero).

2. Metode Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah vanilin, HCl, akuades, metanol absolut, kalium hidroksida, KSF montmorilonit, iodine, etanol, DMSO, aseton, natrium klorida, *n*-hexana, etil asetat, kloroform, diklorometana, 2,4-dihidroksiasetofenon dan 2-hidroksiasetofenon, sel kanker T47D, sel kanker HeLa, sel kanker WiDr, sel normal (Vero), media *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), *Fetal Bovine Serum* (FBS), penisilin-streptomisin 2% (Sigma-Aldrich), fungison (Amphotericin B) 0,5% (Sigma-Aldrich), *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Sigma-Aldrich), DMSO, MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*), tripsin-EDTA, *sodium dodecyl sulfate* (SDS) 10%. Semua reagen yang digunakan adalah *proanalysis* dari Merck. Kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan dengan menggunakan plat aluminium (Merck) yang dilapisi silika gel 60 F-254 (20x20 cm).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi seperangkat alat refluks, alat gelas laboratorium, *plate* pengaduk magnet, alat timbang elektronik (Libror EB-330 Shimadzu), penyaring Buchner, kompor pemanas dan desikator vakum. Alat analisis yang digunakan meliputi alat penentu titik leleh (*Electrothermal-9100*), dan alat untuk mengidentifikasi struktur: spektrofotometer *Fourier Transform Infrared* (FT-IR, Shimadzu Prestige 21), Kromatografi Lapis Tipis (*TLC Scanner*, Camag 3), Kromatografi Gas-Spektrometer Massa (GC-MS, Shimadzu QP 2010S), Spektrometer Resonansi Magnetik Inti Proton dan Karbon (¹H dan ¹³C-NMR, JEOL JNM ECA 500 dengan pelarut aseton-d₆ dan DMSO-d₆), plat 96 sumuran (IWAKI), *conical tube*, sentrifuse, hemositometer, mikropipet 200; 500; 1000 µL (VWR Brand), autoklaf, vortex, pH-meter, mikroskop (Axiovert 25), inkubator (HERAEUS), *Laminar Air Flow*, ELISA *reader* (Microplate Reader, Benchmark).

2.1 Sintesis turunan khalkon (senyawa 1 dan 2)

Sebanyak turunan asetofenon dilarutkan dengan 6 mL metanol di dalam labu alas bulat 100 mL. Selanjutnya ke dalam larutan ini ditambahkan 15 mL larutan KOH 40 % (b/v). Sebanyak 1 gram (6,67 mmol) vanillin dimasukkan ke dalam labu alas bulat 100 mL dan ditambahkan ke dalamnya 10 mL metanol diaduk sampai larut, dimasukkan 0,1 gram KSF montmorilonit dan diaduk. Campuran diaduk pada temperatur kamar selama 24-48 jam, dilanjutkan dengan refluks selama 24 jam. Campuran ditambahkan akuades dan ditambahkan HCl 10% (v/v) hingga terbentuk padatan kuning. Padatan yang terbentuk dilarutkan dalam metanol dan disaring filtratnya. Filtrat kemudian dikristalisasi menggunakan etanol-akuades dan dicuci dengan air panas hingga netral. Produk dikeringkan dalam desikator vakum dan dianalisis menggunakan FT-IR, GC-MS, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR (Matsjeh, dkk, 2017).

2.2 Sintesis turunan flavon (senyawa 3 dan 4)

Sebanyak 1 mmol senyawa turunan khalkon dimasukkan ke dalam labu leher tiga 50 mL ditambahkan 0,075 gram iodine dan 2 mL larutan DMSO kemudian direfluks pada temperatur 120 °C selama 5 jam. Campuran reaksi dituang ke dalam air dingin dan didiamkan sampai terbentuk endapan. Padatan yang terjadi disaring dengan penyaring buchner, dicuci dengan etanol, akuades,

dan natrium tiosulfat. Kemudian dimurnikan dengan kromatografi kolom. Selanjutnya dianalisis menggunakan FT-IR, MS-Direct, dan $^1\text{H-NMR}$.

2.3 Uji sitotoksitas senyawa turunan khalkon dan flavon terhadap sel kanker dan sel normal (vero)

Sebanyak 100 μL suspensi sel dengan kepadatan 10^4 didistribusikan ke dalam 96 sumuran, selanjutnya diinkubasi dalam inkubator CO_2 5% pada temperatur 37 $^\circ\text{C}$ selama 24 jam. Plat yang berisi sel dengan kepadatan 10^4 tersebut dikeluarkan dari inkubator dan dibuang media dari sumuran. Selanjutnya sebanyak 100 μL sampel dengan variasi konsentrasi 6,25; 25; 50; 100 $\mu\text{g/mL}$ dimasukkan ke dalam 96 sumuran sesuai pola yang telah ditentukan. Kontrol sel hanya diisi sel dan media penumbuh sedangkan kontrol media diisi media penumbuh, kemudian plat ini diinkubasi dalam inkubator dalam aliran CO_2 5% pada temperatur 37 $^\circ\text{C}$ selama 24 jam. Sumuran yang sudah di *treatment* dibuang supernatannya dan ditambahkan 100 μL larutan MTT ke dalam setiap sumuran dan diinkubasi selama 4 jam. Kemudian setiap sumuran ditambahkan 50 μL SDS 10% yang berfungsi untuk menghentikan proses reduksi MTT. Plat dibungkus dengan kertas dan didiamkan pada temperatur ruang selama satu malam dalam keadaan gelap. Plat sel yang telah didiamkan semalaman dimasukan ke dalam alat pembaca ELISA *reader* untuk menentukan absorbansinya. ELISA *reader* digunakan untuk membaca absorbansi dari sumuran yang berisi sel hidup pada λ 595 nm. Data absorbansi yang telah diperoleh dihitung rata-rata untuk setiap seri konsentrasi sampelnya. Untuk menghitung persentase sel hidup setiap konsentrasi digunakan rumus:

$$\% \text{Sel hidup} = \frac{(A - B)}{(C - B)} \times 100\%$$

Keterangan:

A=Rata-rata absorbansi sel *treatment*

B= Rata-rata absorbansi kontrol media C = Rata-rata absorbansi kontrol sel.

Selanjutnya dibuat grafik hubungan antara persentase sel hidup terhadap konsentrasi sehingga diperoleh persamaan $y = ax + b$, saat nilai $y = 50$, x merupakan nilai dari IC_{50} .

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Sintesis 2',4-dihidroksi-3-metoksikhalkon (senyawa 1) dan 2',4',4-trihidroksi-3-metoksikhalkon (senyawa 2).

Senyawa turunan khalkon dibuat dengan bahan dasar vanilin dan turunan asetofenon dengan penambahan basa KOH 40% dan KSF montmorilonit yang diaduk selama 24-48 jam pada temperatur kamar dan direfluks selama 24 jam. Senyawa **1** dan **2** berhasil disintesis dengan rendemen berturut-turut sebesar 13,77% dan 6% berupa padatan berwarna kuning cerah. Senyawa turunan khalkon dilakukan karakterisasi menggunakan FT-IR, MS-Direct, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-HMR}$.

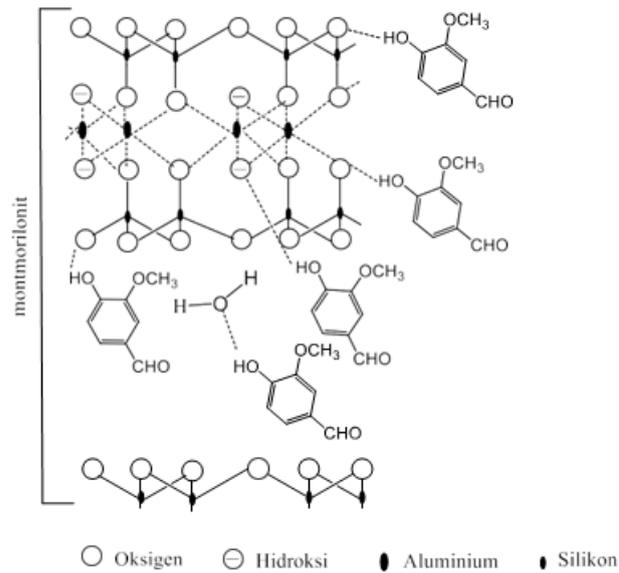
Berdasarkan hasil analisis FT-IR senyawa **1** menunjukkan adanya serapan pada bilangan gelombang 3371 cm^{-1} yang merupakan serapan vibrasi rentangan dari gugus hidroksi (-OH) (Syam, dkk, 2012). Bilangan gelombang 1635 cm^{-1} menunjukkan serapan gugus karbonil yang terkonjugasi dengan cincin aromatis dan olefin (Bano, dkk, 2013). Adanya serapan pada bilangan gelombang 1595 cm^{-1} merupakan serapan dari C=C olefin. Serapan pada bilangan gelombang 1273 cm^{-1} menunjukkan serapan dari vibrasi -C-O- fenol. Serapan pada bilangan gelombang 1026 cm^{-1} menunjukkan serapan vibrasi rentangan -C-O-C- eter. Serapan pada bilangan gelombang 1512 dan 1442 cm^{-1} menunjukkan -C=C-aromatis dari cincin benzen yang diperkuat oleh serapan pada daerah bilangan gelombang 3055-3008 cm^{-1} yang merupakan serapan =C-H aromatis (Syam, dkk, 2012).

Pada bilangan gelombang 1118 cm^{-1} menunjukkan karakteristik $-\text{OCH}_3$ (Syam, dkk, 2012). Berdasarkan hasil analisis FT-IR senyawa **2** menunjukkan adanya serapan pada bilangan gelombang 3394 cm^{-1} yang merupakan serapan vibrasi rentangan dari gugus hidroksi (OH). Ini didukung dengan adanya serapan pada bilangan gelombang 1273 cm^{-1} yang menunjukkan serapan dari vibrasi $-\text{C}-\text{O}$ -fenol. Serapan pada bilangan gelombang 1627 cm^{-1} menunjukkan serapan gugus karbonil ($\text{C}=\text{O}$). Hal ini sesuai dengan serapan karakteristik senyawa khalkon yang menunjukkan serapan $\text{C}=\text{O}$ pada bilangan gelombang $1622\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ (Bano, dkk, 2013). Karakteristik $\text{C}=\text{C}$ olefin ditunjukkan pada serapan dengan bilangan gelombang 1604 cm^{-1} , hal ini sesuai dengan serapan karakteristik $\text{C}=\text{C}$ olefin senyawa khalkon yaitu sekitar 1603 cm^{-1} (Bano, dkk, 2013). Pada bilangan gelombang 1134 cm^{-1} menunjukkan karakteristik serapan OCH_3 , ini didukung dengan adanya serapan $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ pada bilangan gelombang 1026 cm^{-1} dan adanya serapan $\text{C}-\text{H}$ pada gugus metil yang ditunjukkan pada bilangan gelombang 2924 dan 2854 cm^{-1} . Serapan $\text{C}=\text{C}$ aromatis ditunjukkan pada bilangan gelombang 1512 dan 1442 cm^{-1} .

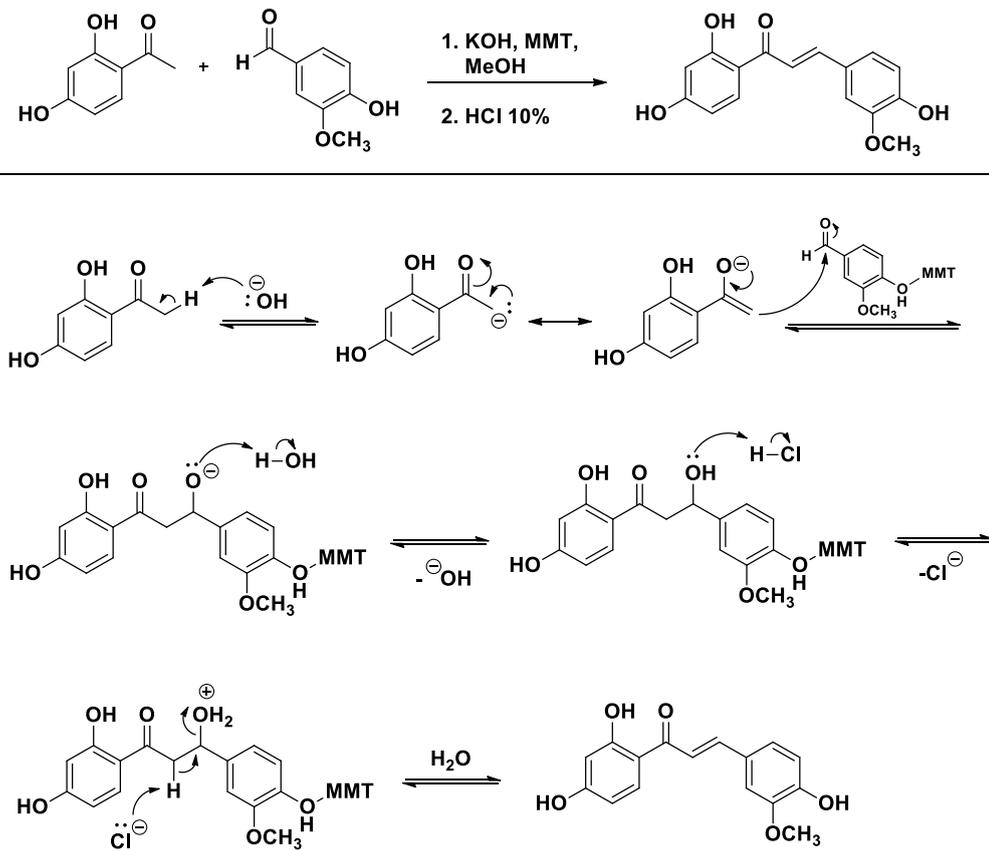
Berdasarkan hasil analisis *MS-Direct* menunjukkan senyawa hasil sintesis memiliki ion molekular (M^+) yang sesuai dengan massa molekul senyawa 2',4-dihidroksi-3- metoksikhalkon dan 2',4',4-trihidroksi-3-metoksikhalkon, yaitu 270 g/mol dan 286 g/mol . Berdasarkan hasil analisis $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa **1** sudah menunjukkan adanya H_α , H_β , C_α , dan C_β masing-masing berada pada pergeseran kimia (δ) $6,93\text{ ppm}$, $7,38\text{ ppm}$, $121,0\text{ ppm}$ dan $147,1\text{ ppm}$. Senyawa **2** juga sudah menunjukkan adanya H_α dan H_β masing-masing berada pada pergeseran kimia $7,75\text{ ppm}$, dan $7,82\text{ ppm}$ dengan konstanta kopling $J = 15,5$ dan $15,5\text{ Hz}$ dan posisi C_α , dan C_β masing-masing berada pada pergeseran kimia (δ) $115,6\text{ ppm}$ dan $145,6\text{ ppm}$. Berdasarkan analisis struktur menggunakan FT-IR, *MS-Direct*, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ terbukti bahwa senyawa **1** dan **2** telah terbentuk.

Senyawa **1** dan **2** ini disintesis melalui reaksi kondensasi Claisen-Schmidt menggunakan katalis KOH 40% dan KSF montmorilonit dengan rendemen 13,77% dan 6% berupa padatan kuning cerah. Penggunaan katalis KOH bertujuan untuk membentuk karbanion melalui pengambilan H_α dari 2-hidroksiasetofenon dan 2,4-hidroksiasetofenon. Karbanion inilah yang berperang sebagai nukleofil, dimana akan menyerang vanilin membentuk intermediet yang akan mengalami dehidrasi membentuk senyawa khalkon dengan melepas molekul air. Akan tetapi, penyerangan C karbonil oleh karbanion ini sulit terjadi karena atom H pada gugus hidroksi ini terlepas akibat adanya basa sehingga akan membentuk ion vanilat. Ion vanilat ini menyebabkan C karbonil kurang reaktif sehingga produk sulit terbentuk. Oleh karena itu, perlu ditambahkan katalis KSF montmorilonit yang mencegah kurang reaktifnya C karbonil pada vanilin.

Penambahan katalis KSF montmorilonit pada reaksi ini diperkirakan menyebabkan interaksi antara atom H pada gugus hidroksi yang terikat pada vanilin dengan atom O dari alumina silikat dan molekul H_2O yang terdapat dalam interlayer katalis KSF montmorilonit melalui terbentuknya ikatan hidrogen. Interaksi ini menyebabkan atom H pada gugus hidroksi senyawa vanilin tidak mudah lepas meskipun ada KOH , sehingga terbentuknya ion vanilat dapat dihindari. Ion vanilat menyebabkan atom C karbonil menjadi kurang reaktif karena adanya efek resonansi dari muatan negatif dari gugus hidroksi yang kehilangan atom H nya. Gugus hidroksi pada posisi para meningkatkan semakin kurang reaktifnya C karbonil. Muatan negatif dari atom O mengalami resonansi kedalam cincin benzen, dimana muatan negatif ini berpindah ke posisi orto dan para cincin benzen. Akibatnya, C karbonil menjadi kurang elektropositif sehingga sukar diserang oleh karbanion. Hal ini berdampak produk susah terbentuk. Perkiraan interaksi antara KSF montmorilonit dengan atom O pada vanilin ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Prediksi interaksi antara antara KSF montmorilonit dengan vanilin (modifikasi gambar montmorilonit dari Ji, dkk, 2001)



Gambar 5. Perkiraan mekanisme reaksi sintesis senyawa 2

Reaksi yang terjadi pada sintesis senyawa **1** dan **2** adalah reaksi kondensasi Claisen- Schmidt yang disebabkan karena 2-hidroksiasetofenon dan 2,4-dihidroksiasetofenon memiliki H_{α} . Sintesis senyawa ini diawali dengan pembentukan karbanion dari 2- hidroksiasetofenon dan 2,4-dihidroksiasetofenon yang memiliki H_{α} . Karbanion ini menyerang C karbonil dan menghasilkan intermediet. Suryani (2014) melaporkan metode sintesis turunan khalkon dari vanilin dengan 2,4-dihidroksiasetofenon menggunakan katalis KSF montmorilonit dan KOH tanpa penambahan akuades sebelum pengasaman dengan HCl 10%. Pada awalnya, senyawa **1** dan **2** disintesis melalui metode ini tetapi produk tidak terbentuk. Pada sintesis ini, senyawa **1** dan **2** terbentuk ketika akuades ditambahkan sebelum tahap pengasaman. Diperkirakan muatan negatif dari atom O intermediet ini mengambil H pada akuades membentuk senyawa intermediet β -hidroksi keton. Senyawa intermediet ini dengan adanya asam maka akan terjadi proses dehidrasi yaitu pelepasan gugus ^+H_2O sehingga produk dapat terbentuk. Perkiraan mekanisme reaksi sintesis senyawa **2** ditunjukkan pada Gambar 5.

3.2 Sintesis 4'-hidroksi-3'-metoksiflavin (senyawa 3) dan 7,4'-dihidroksi-3'-metoksiflavin (senyawa 4).

Senyawa turunan flavon disintesis dengan mereaksikan senyawa **1** dan **2** dengan iodin dalam pelarut DMSO melalui reaksi siklisasi oksidatif. Senyawa **3** berhasil disintesis rendemen sebesar 53,10% berupa padatan berwarna putih kekuningan dan senyawa **4** dengan rendemen sebesar 42,25% berupa padatan berwarna kuning. Senyawa **3** dan **4** ini dilakukan karakterisasi menggunakan FT-IR, MS-*Direct*, dan 1H -NMR.

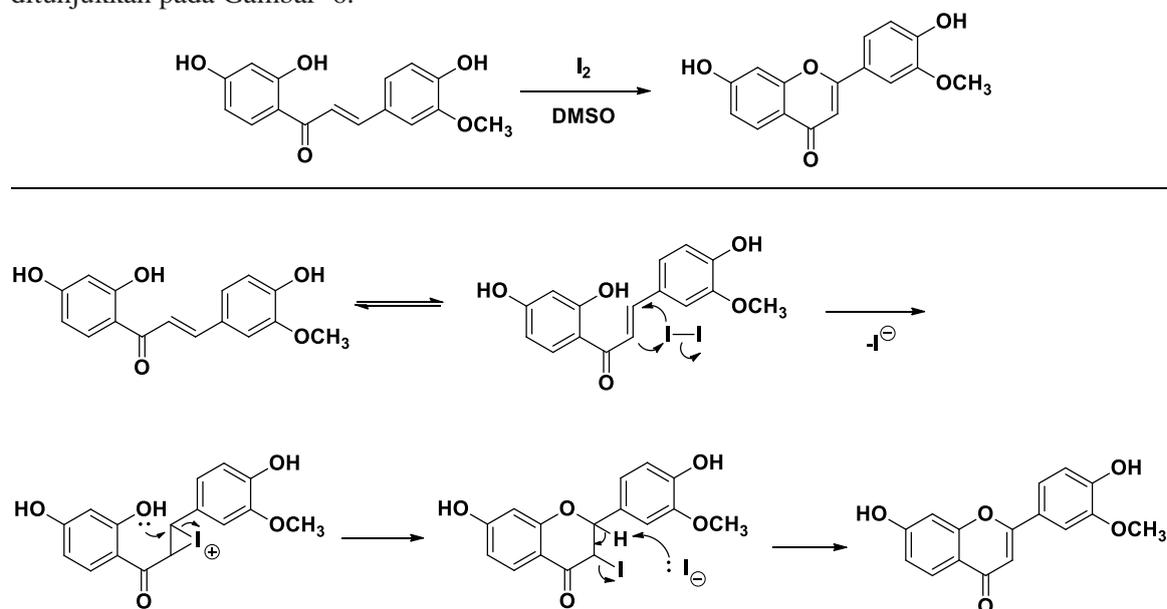
Berdasarkan hasil analisis FT-IR senyawa **3** menunjukkan adanya serapan gugus karbonil (C=O) pada bilangan gelombang 1627 cm^{-1} . Ini didukung dengan adanya serapan pada bilangan gelombang 1568 cm^{-1} yang merupakan karakterisasi C=C olefin, sesuai karakterisasi C=C olefin yaitu sekitar 1586 cm^{-1} (Bano, dkk, 2013). Karakteristik C=C aromatis ditunjukkan pada serapan dengan bilangan gelombang 1512 dan 1473 cm^{-1} (Suzana, dkk, 2014). Serapan pada bilangan gelombang cm^{-1} menunjukkan serapan gugus hidroksi (OH). Serapan pada bilangan gelombang 1273 cm^{-1} menunjukkan serapan dari vibrasi -C-O- fenol. Serapan pada bilangan gelombang 1041 cm^{-1} menunjukkan serapan vibrasi rentangan -C-O-C- eter. Pada bilangan gelombang 1126 cm^{-1} menunjukkan karakteristik OCH_3 . Ini didukung adanya serapan C-H pada gugus metil yang ditunjukkan pada bilangan gelombang 2924 dan 2854 cm^{-1} . Berdasarkan hasil analisis FT-IR senyawa **4** juga menunjukkan adanya serapan C=O pada bilangan gelombang 1627 cm^{-1} (Bano, dkk, 2013). Ini didukung dengan adanya serapan pada bilangan gelombang 1568 cm^{-1} yang merupakan karakterisasi C=C olefin, sesuai karakterisasi C=C olefin yaitu sekitar 1586 cm^{-1} (Bano, dkk., 2013). Adanya serapan gugus hidroksi pada bilangan gelombang 3425 cm^{-1} , yang didukung dengan adanya serapan pada bilangan gelombang 1249 cm^{-1} yang menunjukkan serapan dari vibrasi -C-O- fenol. Karakteristik C=C aromatis ditunjukkan pada serapan dengan bilangan gelombang 1512 cm^{-1} (Bano, dkk, 2013). Serapan pada bilangan gelombang 1033 cm^{-1} menunjukkan serapan vibrasi rentangan -C-O-C- eter. Pada bilangan gelombang 1165 cm^{-1} menunjukkan karakterisasi $-OCH_3$. Ini didukung adanya serapan C-H pada gugus metil yang ditunjukkan pada bilangan gelombang 2924 dan 2854 cm^{-1} .

Analisis lebih lanjut senyawa **3** dan **4** yakni analisis MS-*Direct*. Berdasarkan hasil analisis MS-*Direct* menunjukkan senyawa turunan flavon memiliki ion molekular (M^+) yang sesuai dengan massa molekul senyawa **3** dan **4**, yaitu 268 g/mol dan 284 g/mol . Berdasarkan analisis 1H -NMR, senyawa **3** menunjukkan hilangnya puncak atom H_{β} dan masih adanya puncak atom H_{α} yaitu pada δ 6,99 ppm dengan kenampakan *singlet* dan integritas 1. Posisi proton pada gugus $-OCH_3$ berada pada pergeseran kimia δ 3,90 ppm dengan kenampakan *singlet* dan integritas 3. Posisi proton pada C-5, C-6, C-7 dan C-8 diperkirakan berada pada pergeseran kimia berturut-turut antara lain δ 8,02 ppm;

7,46 ppm; 7,80 ppm; dan 7,62 ppm. Posisi proton pada C-2', C-3', dan C-6' diperkirakan berada pada pergeseran kimia berturut-turut δ 7,60 ppm; 6,93 ppm; dan 7,80 ppm. Senyawa **4** juga menunjukkan masih adanya puncak dari atom H_α yaitu pada δ 6,82 ppm dengan kenampakan *singlet* dan integritas 1 proton. Puncak dengan δ 3,88 ppm dengan kenampakan *singlet* dan integritas 3 proton diperkirakan serapan dari atom H pada gugus metoksi. Posisi proton yang terikat pada C-5, C-6, dan C-8 berada pada pergeseran kimia berurut-turut antara lain δ 7,84 ppm; 6,93 ppm dan 6,93 ppm. Posisi proton yang terikat pada C-2', C-3' dan C-6' berada pada pergeseran kimia berturut-turut antara lain dengan δ 7,53 ppm; 6,93 ppm; dan 7,53 ppm.

Berdasarkan analisis struktur menggunakan FT-IR, MS-Direct dan $^1\text{H-NMR}$ menunjukkan bahwa senyawa **3** dan **4** telah terbentuk. Senyawa **3** dan **4** ini disintesis melalui reaksi siklisasi oksidatif menggunakan katalis iodine dan pelarut DMSO yang direfluks pada temperatur 120 °C selama 5 jam dengan rendemen berturut turut sebesar 53,10% dan 42,25%. Iodin ini berperan sebagai katalis yang tersubstitusi kedalam ikatan rangkap antara C_α dan C_β . Sebelumnya temperatur yang digunakan pada sistem refluks yaitu 140 °C, dimana temperatur ini merupakan titik didih pelarut DMSO (Murthy, dkk, 2010). Akan tetapi, pada temperatur ini produk tidak berhasil terbentuk. Hal ini terlihat dari spot yang dilihat pada plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yaitu tidak terbentuknya spot pendar dengan R_f yang berbeda dari produk awal. Oleh karena itu, kami memodifikasi temperatur dan waktu refluks yaitu pada temperatur 120 °C selama 5 jam.

Penelitian sebelumnya telah melaporkan mekanisme reaksi yang terjadi antara senyawa heterosiklik yang memiliki ikatan rangkap dengan iodine, yaitu melalui pembentukan intermediet iodoiranium, yang diikuti penyerangan secara intramolekuler oleh nukleofil. Oleh karena itu, mekanisme reaksi senyawa **3** dan **4** diperkirakan melalui penyerangan senyawa **1** dan **2** yang memiliki ikatan rangkap terhadap I parsial positif pada iodine membentuk senyawa intermediet iodoiranium, kemudian diikuti penyerangan secara intramolekuler oleh atom O pada gugus hidroksi senyawa turunan flavon. Ion I parsial negatif yang terlepas kemudian menyerang atom H sehingga pada tahap ini terjadi pelepasan HI dan terbentuk ikatan rangkap pada cincin. Iodin berperan sebagai katalis yang tersubstitusi kedalam ikatan rangkap antara C_α dan C_β . Untuk menghilangkan iodine dari produk ditambahkan natrium tiosulfat jenuh. Selanjutnya mekanisme reaksi sintesis senyawa **4** ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Mekanisme reaksi pembentukan senyawa **4**

3.3 Uji Sitotoksitas senyawa turunan khalkon dan flavon terhadap Sel HeLa, WiDr, dan T47D

Uji sitotoksitas senyawa **1**, **2**, **3** dan **4** dilakukan dengan menggunakan metode MTT (3-(4,5-difeniltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazo-lium bromida) dengan parameter sitotoksik nilai IC₅₀. Prinsip dasar uji sitotoksitas adalah kerja enzim mitokondria pada sel aktif yang memetabolisme garam tetrazolium, sehingga terjadi pemutusan cincin tetrazolium oleh enzim dehidrogenase yang menyebabkan tetrazolium berubah menjadi formazan yang tidak larut dan berwarna ungu (Nurani, 2011). Intensitas warna ungu yang dihasilkan berbanding lurus dengan jumlah sel kanker yang masih hidup. Nilai absorbansi ini kemudian diolah untuk menentukan nilai persen kehidupan untuk menghitung nilai IC₅₀ nya.

Berdasarkan perhitungan yang telah dilakukan terhadap ketiga sel kanker, dapat ditarik suatu hubungan antara persen kehidupan dengan variasi konsentrasi dari larutan sampel. Nilai IC₅₀ dari turunan khalkon dan flavon dengan doxorubicin terhadap ketiga sel kanker dan satu sel normal (vero) disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai IC₅₀ senyawa turunan khalkon, flavon dan doxorubicin terhadap Sel HeLa, T47D, WiDr dan Vero

Sel	IC ₅₀ Sampel Uji (µg/mL)				
	Senyawa 1	Senyawa 2	Senyawa 3	Senyawa 4	Doxorubicin
HeLa	14,05	2,09	79,62	134,58	-77,35
T47D	27,34	38,76	106,33	122,82	21,10
WiDr	28,53	-52,72	86,09	109,32	-8,38
Vero	100,79	103,26	571,18	122,36	515,90

Hasil uji sitotoksik senyawa **1**, **2**, **3**, dan **4** terhadap sel kanker HeLa secara *in vitro* menunjukkan nilai IC₅₀ berturut-turut 14,05; 2,09; 79,62; dan 134,58 µg/mL. Berdasarkan nilai IC₅₀, senyawa **1** dan **2** memiliki aktivitas sitotoksik tinggi atau dikategorikan sangat aktif terhadap sel kanker HeLa (Ferte, dkk, 1998). Akan tetapi, obat doxorubicin menunjukkan aktivitas sitotoksik yang lebih baik dari kedua khalkon ini yaitu dengan nilai IC₅₀ -77,35 µg/mL. IC₅₀ dengan nilai yang negatif ini menunjukkan bahwa obat doxorubicin memiliki aktivitas sitotoksik yang sangat tinggi atau dapat dikategorikan sangat toksik terhadap sel kanker HeLa. Karena sangat toksiknya doxorubicin terhadap sel kanker HeLa sehingga pada konsentrasi yang sangat kecil sudah dapat menghambat pertumbuhan sel kanker. Konsentrasi yang sangat kecil ini dapat ditentukan dengan menggunakan persamaan garis lurus antara log konsentrasi terhadap persentase sel hidup, sehingga diperoleh nilai IC₅₀ sebesar 0,047 µg/mL. Berdasarkan nilai IC₅₀, senyawa **3** dan **4** memiliki aktivitas sitotoksik sedang terhadap sel kanker HeLa.

Berdasarkan uji aktivitas sitotoksik senyawa **1**, **2**, **3**, dan **4** terhadap sel kanker T47D secara *in vitro* menunjukkan nilai IC₅₀ berturut-turut 27,34; 38,76; 106,33; dan 122,82 µg/mL. Berdasarkan nilai IC₅₀, senyawa **1**, **2**, **3** dan **4** memiliki aktivitas sitotoksik yang sedang terhadap sel kanker T47D. Akan tetapi, obat doxorubicin menunjukkan aktivitas sitotoksik yang lebih baik dari keempat senyawa ini yaitu dengan nilai IC₅₀ sebesar 21,10 µg/mL.

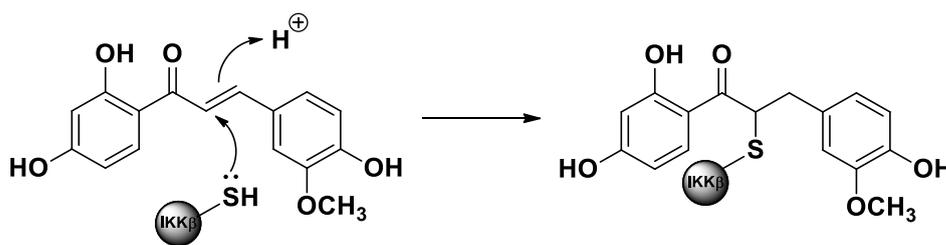
Selanjutnya, senyawa turunan khalkon dan flavon dilakukan uji sitotoksik terhadap sel kanker WiDr. Berdasarkan uji aktivitas sitotoksik senyawa **1**, **2**, **3**, dan **4** terhadap sel kanker WiDr secara *in vitro* menunjukkan nilai IC₅₀ berturut-turut 28,53; -52,72; 86,09; dan 109,32 µg/mL. Berdasarkan nilai IC₅₀, senyawa **1**, **3**, dan **4** menunjukkan aktivitas sitotoksik sedang terhadap sel kanker WiDr. Senyawa **2** dan doxorubicin ini memiliki sifat sangat toksik terhadap sel kanker WiDr, hal ini ditunjukkan nilai negatif pada IC₅₀ yaitu secara berturut-turut sebesar -52,72 µg/mL dan -8,38 µg/mL. Karena sangat toksiknya senyawa **2** dan doxorubicin terhadap sel kanker WiDr sehingga pada konsentrasi yang sangat kecil sudah dapat menghambat pertumbuhan sel kanker. Konsentrasi

yang sangat kecil ini dapat ditentukan dengan menggunakan persamaan garis lurus antara log konsentrasi dengan persentase sel hidup, sehingga diperoleh nilai IC_{50} berturut-turut sebesar 2,66 dan 2,43 $\mu\text{g/mL}$. Ini menunjukkan bahwa senyawa **2** memiliki nilai IC_{50} yang mendekati IC_{50} doxorubicin, dimana kedua senyawa ini memiliki aktivitas sitotoksik tinggi atau dikategorikan sangat aktif terhadap sel kanker WiDr.

Uji sitotoksik senyawa **1**, **2**, **3**, dan **4** terhadap sel normal (Vero) memberikan nilai IC_{50} berturut-turut sebesar 100,79; 103,26; 571,18 dan 122,36 $\mu\text{g/mL}$. Berdasarkan nilai IC_{50} , senyawa **1**, **2** dan **4** menunjukkan aktivitas sitotoksik sedang terhadap sel normal (Vero), sedangkan senyawa **3** dan doxorubicin menunjukkan tidak memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel normal (Vero).

Berdasarkan nilai IC_{50} , senyawa **1** dan **2** memiliki aktivitas sitotoksik yang tinggi atau dikategorikan sangat aktif terhadap sel HeLa yaitu 14,05 dan 2,09 $\mu\text{g/mL}$. Selain itu, senyawa **2** juga menunjukkan sangat aktif terhadap sel kanker WiDr. Akan tetapi, kedua senyawa ini menunjukkan juga aktivitas sitotoksik sedang terhadap sel normal (Vero). Hal ini menunjukkan bahwa senyawa **1** dan **2** tidak selektif terhadap sel kanker HeLa, WiDr dan sel normal.

Bila dikaji lebih lanjut dari struktur keempat senyawa tersebut menunjukkan adanya ikatan karbon α,β tidak jenuh dan adanya gugus hidroksi di posisi C-2' dan C-4' memberikan kontribusi besar pada aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker HeLa dan WiDr. Senyawa **1** dan **2** dengan ikatan karbon α,β tidak jenuhnya menunjukkan aktivitas sitotoksik yang tinggi terhadap kedua sel kanker. Senyawa **3** dan **4** yang tidak memiliki ikatan karbon α,β tidak jenuh menunjukkan aktivitas sitotoksik yang sedang terhadap ketiga sel kanker. Dari struktur kimia keempat senyawa tersebut yang memberikan pengaruh terhadap aktivitas sitotoksik adalah ikatan karbon α,β tidak jenuh dan gugus hidroksi yang terikat. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa keberadaan ikatan karbon α,β tidak jenuh dapat memberikan pengaruh penghambatan terhadap sinyal selular yaitu *nuclear factor kappa B* (NF- κ B), dimana jalur sinyal selular ini merupakan salah satu mekanisme yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antikanker secara *in vitro*. Penghambatan NF- κ B ini menyebabkan terjadinya kematian sel secara terprogram guna membuang sel yang tidak diperlukan oleh tubuh (apoptosis) dan mencegah proliferasi sel, dimana kanker terjadi karena terlalu sedikitnya apoptosis dan pembelahan sel yang tidak terkendali (proliferasi). Adanya interaksi kovalen antara ikatan karbon α,β tidak jenuh dengan I kappa B kinase 2 (IKK β), sehingga menonaktifkan kinase ini yang berdampak terhadap ketidakaktifan NF- κ B (Srinivasan, dkk, 2009). Berdasarkan penelitian tersebut, maka diprediksikan adanya interaksi kovalen antara ikatan karbon α,β tidak jenuh pada senyawa **2** dengan IKK β (Gambar 7).



Gambar 7. Prediksi interaksi kovalen antara ikatan karbon α,β tidak jenuh dengan IKK β

Senyawa **1** dan **2** memiliki gugus hidroksi dan metoksi dengan posisi orto di cincin B. Berdasarkan penelitian sebelumnya, adanya gugus metoksi dan hidroksi dengan posisi orto diperkirakan dapat menghambat aktivitas enzim siklooksigenase (COX) karena adanya halangan sterik yang besar yang lebih mudah berikatan dengan sisi aktif enzim siklooksigenase. Penghambatan enzim ini dapat mengurangi proliferasi sel kanker dan mempercepat apoptosis (Ahmad & Patong, 2005). Senyawa **2** memiliki dua gugus hidroksi dengan posisi meta di cincin A sehingga senyawa ini lebih sterik daripada senyawa **1** yang hanya memiliki satu gugus hidroksi. Diperkirakan aktivitas sitotoksik senyawa **2** terhadap sel kanker lebih tinggi daripada senyawa **1** karena adanya halangan sterik pada senyawa **2** sehingga lebih mudah mengikat sisi aktif enzim

siklooksigenase (Matsjeh, dkk, 2017). Penghambatan enzim ini dapat mengurangi proliferasi sel kanker dan mempercepat apoptosis (Ahmad & Patong, 2005). Selain itu, adanya gugus hidroksi dan metoksi yang terikat di cincin A dan B senyawa **3** dan **4** diperkirakan berkontribusi dalam aktivitas sitotoksik terhadap ketiga sel kanker karena adanya interaksi antara gugus hidroksi dan metoksi dengan asam amino dengan membentuk ikatan hidrogen (Ferte, dkk, 1998).

4. Kesimpulan

Sintesis turunan khalkon dari vanilin melalui reaksi kondensasi Claisen-Schmidt dengan katalis KOH dan KSF montmorilonit diperoleh senyawa **1** dengan rendemen sebesar 13,77% dan senyawa **2** dengan rendemen sebesar 6 %. Sintesis turunan flavon dari vanilin melalui reaksi siklisasi oksidatif dengan katalis I₂ diperoleh senyawa **1** dengan rendemen sebesar 53,10% dan senyawa **4** dengan rendemen sebesar 42,25%.

Berdasarkan uji aktivitas sitotoksik senyawa **1**, **2**, **3** dan **4** terhadap ketiga sel kanker dan sel vero secara *in vitro* menunjukkan nilai IC₅₀ berturut turut sebesar 14,05; 2,09; 79,62; dan 134.58 µg/mL (sel HeLa), 27,34; 38,76; 106,33; dan 122,82 µg/mL (sel T47D), 28,53; -52,72; 86,09; dan 109,32 µg/mL (sel WiDr); dan 100,79; 103,26; 571,18 dan 122,36 µg/mL (sel Vero). Berdasarkan nilai IC₅₀, senyawa **1** dan **2** memiliki aktivitas sitotoksik tinggi terhadap sel kanker HeLa dan WiDr, dan aktivitas sitotoksik yang sedang terhadap sel kanker T47D dan sel Vero; sedangkan senyawa **3** dan **4** memiliki aktivitas sitotoksik sedang terhadap ketiga sel kanker. Senyawa **3** dan **4** memiliki aktivitas sitotoksik berturut-turut yaitu kategori tidak memiliki aktivitas sitotoksik dan aktivitas sitotoksik sedang terhadap sel Vero.

Daftar Pustaka

- Ahmad, A. and Patong, R., Aktivitas Antikanker Senyawa Bahan Alam Kurkumin dan Analognya pada Tingkat Molekuler, Laboratorium Biokimia dan Bioteknologi, Departemen Kimia, Universitas Makasar.
- Aponte J.C., Verastegui M., Malaga E., Zimic M., Quiliano M., Vaisberg A.J., Gilman R.H., and Hammond G.B., 2008, *J. Med. Chem.*, 51, 6230-6234.
- Bano, S., Javed, K., Ahmad, S., Rathish, I.G., Singh, S., Chaitanya, M., Arunasree, K.M, and Alam, M.S., 2013, Synthesis of Some Novel Chalcones, Flavanones and Flavones and evaluation of Their Anti-Inflammatory Activity, *Eur. J. Med. Chem.*, 65, 51-59.
- Choy, P. Y., and Kwong, F. Y., 2013, Palladium-Catalyzed Ortho-CH-Bond Oxygenation of Aromatic Ketones, *Org. Lett.*, 15, 2, 270-273.
- Ferte, J., Kuhnel J.M., Chapuis G., Rolland, Y., Lewin G., and Schwaller M.A., 1998, Flavonoid-Related Modulators of Multidrug Resistance: Synthesis, Pharmacological Activity, and Structure-Activity Relationships, *J. Med. Chem.*, 42, 478-489.
- Garcia, O.B., and Castillo, J., 2008, Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids: New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-Inflammatory Activity, *J. Agric. Food Chem.*, 56, 6185-6205.
- Ji., S., Wan, L., dan Fan, Z., 2001, The Toxic Compounds and Leaching Characteristics of Spent Foundry Sands, *Kluwer Academic Publishers*, 132, 347-364.
- Kappusamy, P., Yusoff, M. M., Maniam, G. P., Ichwan, S. J. A., Soundharrajan, H., and Govindan, N., 2014, Nutraceuticals as Potential Therapeutic Agents for Colon Cancer: a Review, *Acta Pharm Sinica B*, 4(3), 173-181.
- Kashtriya, R.B., Shaikh, Y.I., Nazeruddin, G.M., 2015, A Brief Review: Flavonoids as a Pharmacophore, *J. Applicable Chem.*, 4 (3), 801-817.
- Matsjeh, S., Swasono, R. T., Anwar, C., Solikhah, E. N., and Lestari, E, 2017, Synthesis of 2',4'-dihydroxy-3-methoxychalcone and 2',4',4'-trihydroxy-3- methoxychalcone as a candidate

- anticancer against cervical (WiDr), colon (HeLa), and breast (T47D) cancer cell lines in vitro, AIP Conference Proceedings, 1823.
- N., Murthy Y.L., Viswanath, I.V. K, and Pandit, E.N., 2010, Synthesis, Characterization & Antibacterial Activity of 7,5'-Dihydroxy, 3'-Methoxy Flavones, *Int.J. ChemTech Res.*,2 (2), 1097-1101.
- Ngama, M., Pandiangan, D., dan Rumondor, M. J., 2015, Uji Potensi Antikanker Leukemia Ekstrak Metanol Daun *Selaginella delicatula* dan *Pteris vittata*, *Pharmacon jurnal Ilmiah Farmasi*, 4, 179-189.
- Nurani, L. H., 2011, Uji Sitotoksitas dan Antiproliferatif Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa*, Lour) Terhadap Sel Mieloma, *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 2, 11-21
- Parvaskar, P. T., Parameswaran, P. S., and Tilve, S. G., 2012, Recent Developments in The Synthesis of Five- and Six-Membered Heterocycles Using Molecular Iodine, *Chem. Eur. J.*, 18, 5460-5489.
- Patel, K., Karthikeyan C., Solomon V.R., Moorthy N.S.H.N., Lee H., Sahu K., Deora G.S., and Trivedi, P., 2011, Synthesis of Some Coumarinyl Chalcones and Their Antiproliferative Activity Against Breast Cancer Cell Lines., *Letters in Drug Design & Discovery*, 8.
- Ranjit, P.M., Rahaman, S.A., Kumar K.P., Prasad, Y.R., Santhipriya, T., Manikanta, G.C.V.S., and Sudeepthi, N.R.L., 2013, Synthesis, Screening And in vitro Anticancer Activity of Piperazine Nucleus Containing Novel Chalcones On Different Cell Lines, *Int. J. Pharm. Tech. Res.*, 5(1).
- Srinivasan B., Johnson T.E., Lad R., and Xing C., 2009, Structure-Activity Relationship Studies of Chalcone Leading to 3-Hydroxy-4,3',4',5'-tetramethoxychalcone and Its analogues as Potent Nuclear Factor κ B Inhibitors and Their Anticancer Activities, *J. Med. Chem.*, 52, 7228-7235.
- Suryani, O., 2014, Sintesis dan Uji Aktivitas Antibakteri Secara *In Vitro* Senyawa Turunan *N*-Asetil-2-Pirazolina Tersubstitusi Gugus Hidroksi Berbahan Dasar Vanilin, *Tesis*, Departemen Kimia FMIPA, Yogyakarta.
- Syam S., Abdelwahab S. I., Al-Mamary M.A., and Mohan S., 2012, Synthesis of Chalcone with Anticancer Activities, *Molecules*, 17, 6179-6195.
- Suzana, Amalia, K., Ika S., M., Ekowati, J., Rudyanto, M., Poerwono, H., dan Budiarti, T., 2014, Sintesis Khalkon dan Derivatnya Menurut Reaksi Kondensasi Claisen Schmidt dengan Iradiasi Gelombang Mikro, *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*, I, (1), 20-27.
- Way, T.D., Kao, M. C., and Lin, J.K., 2004, Degradation of HER2/neu by apigenin Induces Apoptosis Through Cytochrome C Release and Caspase-3 Activation in HER2/neu-Overexpressing Breast Cancer Cells, *FEBS Lett.*, 579, 145-152.