



## SINTESIS, UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIKANKER SENYAWA 3',4'-DIMETHOXY FLAVONOL

Muhamad Rokim, Adel Zamri, Hilwan Yuda Teruna

Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Riau, Indonesia, Indonesia

\*Corresponding author: [m.rohim@staff.unri.ac.id](mailto:m.rohim@staff.unri.ac.id)

### ARTICLE INFO

Received  
03 November 2018  
Accepted  
30 November 2018  
Available online  
30 April 2019

*Keywords:*  
3,4-dimethoxy-2'-  
hydroxychalcone,  
DPPH, MTS

### ABSTRACT

3',4'-dimethoxy flavonol have been synthesized from 3,4-dimethoxy-2'-hydroxychalcon under basic condition (KOH). The structures of all compounds were characterized based on the interpretation of HPLC chromatograms and spectroscopic data including UV, FTIR, NMR and HRMS. Antioxidant activity was evaluated using the DPPH assay and anticancer activity was evaluated using the MTS assay which showed that the 3',4'-dimethoxy flavonol was active as antioxidants and weak anticancer activity.

© 2019 IJoPAC. All rights reserved

### 1. Pendahuluan

Senyawa bahan alam merupakan sumber yang efektif sebagai senyawa bioaktif<sup>[1]</sup> yang berfungsi sebagai penghambat penyakit degeneratif. Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang terdapat di alam, yang berpotensi untuk dapat digunakan dalam terapi pengobatan penyakit kanker<sup>[2]</sup>. Salah satu senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid yang banyak disintesis untuk dipelajari bioaktivitasnya adalah kalkon. Senyawa kalkon dan turunannya dikenal memiliki beragam aktivitas biologi. Dalam bidang sintesis, senyawa kalkon telah banyak digunakan untuk membuat berbagai macam senyawa heterosiklik salah satunya flavonol<sup>[3],[4]</sup> yang memiliki aktivitas biologi yang menarik termasuk didalamnya sebagai antioksidan dan antikanker.

Aktivitas biologi senyawa-senyawa turunan kalkon seperti flavonol dipengaruhi oleh jenis substituenya<sup>[4]</sup>. Beberapa analog flavonol turunan kalkon dilaporkan berpotensi untuk diteliti lebih lanjut dan dikembangkan sebagai obat kanker prostat berdasarkan uji sitotoksik menggunakan *cell line* 22rv1 (kanker prostat pada manusia) dengan nilai  $IC_{50} < 5 \mu M$ <sup>[3]</sup>.

Selain memiliki potensi sebagai antikanker, senyawa flavonol juga sangat dikenal dengan aktivitas antioksidannya. Oleh karena itu, menjadi hal yang sangat menarik untuk melihat pengaruh berbagai jenis dan posisi substituen terhadap potensi antikanker dan antioksidan dari senyawa 2'-hidroksikalkon dan turunannya.

Variasi substituen pada cincin aromatik akan menghasilkan kalkon dan turunannya dengan struktur yang luas dan aktivitas yang beragam. Variasi struktur yang luas tersebut tidak dapat diperoleh melalui isolasi dari bahan alam, selain karena membutuhkan biaya yang lebih mahal dan

waktu pengerjaan yang lebih lama. Senyawa kalkon dan turunan kalkon tersubstitusi halogen, metil, dan isopropil tidak dapat ditemukan di alam. Oleh karena itu, sintesis secara kombinatorial merupakan jalan keluar yang paling tepat bagi pemecahan masalah tersebut.

## 2. Bahan dan Metode

### 2.1. Alat dan Bahan

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah lampu UV 254/366 nm (Camag®), alat penentu titik leleh *Fisher Johns* (SMP 11-Stuart®), HPLC fase terbalik (UFLC Prominance-Shimadzu®, detektor UV SPD 20AD), spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S®), spektrofotometer FTIR (Shimadzu, IR Prestige-21), spektrometer NMR (Agilent 500 MHz), HRMS (Water LCT premier XE mode positif), *microplate reader 96 well* (Berthold LB-941), indikator universal, peralatan sintesis, uji antioksidan yang biasa digunakan di Laboratorium Sintesis Organik.

Bahan-bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah 2'-hidroksiasetofenon (Aldrich), 3,4-dimetoksi benzaldehid, larutan KOH 3N, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, larutan HCl 3N, DPPH, MTS, aquades dan berbagai pelarut organik seperti etil asetat, *n*-heksana, kloroform, metanol, etanol dan dimetilsulfoksida (DMSO).

### 2.2. Sintesis Senyawa 3',4'-Dimetoksi Flavonol

Sintesis senyawa 3',4'-dimetoksi flavonol dilakukan berdasarkan modifikasi metode yang telah digunakan oleh Britton (2012)<sup>[3]</sup>. 0,5 mmol 3,4-dimetoksi-2'-hidroksikalkon dilarutkan dalam 5 mL etanol dan ditambahkan KOH 3 N sebanyak 1 mL. Campuran kemudian didinginkan dalam mangkuk berisi es di dalam *Freezer* hingga suhu 0°C kemudian sebanyak 0,25 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% ditambahkan ke dalam campuran reaksi dan diaduk selama 3 jam pada temperatur kamar. Kemudian ke dalam larutan ditambahkan HCl 3N sampai terbentuk padatan. Padatan yang diperoleh kemudian dimurnikan dengan rekristalisasi dengan menggunakan pelarut metanol.

### 2.3. Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan *microplate reader, two fold dilution* dengan metode DPPH (1,1- *diphenyl-2-picryl hydrazyl*)<sup>[5]</sup>, pada panjang gelombang 520 nm. Sebanyak 2 mg sampel dilarutkan dalam 2 mL metanol. Baris A dimasukkan sampel sebanyak 100 µL (*plate* terdiri dari baris A-F masing-masing berjumlah 12 sumur). Sebanyak 50 µL metanol dimasukkan ke masing-masing sumur pada baris B-F. Baris A dipipet sebanyak 50 µL dan dimasukkan ke baris B, baris B dipipet 50 µL dimasukkan ke baris C dan dilakukan sampai baris D, baris D dipipet 50 µL lalu dibuang, sehingga diperoleh konsentrasi larutan uji 1000 µg/mL (baris A), 500 µg/mL (baris B), 250 µg/mL (baris C), dan 125 µg/mL (baris D). Baris E-F diisi dengan 50 µL metanol. Baris A-E ditambahkan DPPH sebanyak 80 µL dengan konsentrasi 100 µg/mL, kemudian diinkubasi selama 30 menit. Aktivitas penangkapan radikal diukur sebagai penurunan absorbansi DPPH dengan *microplate reader* dan olah data. Kontrol positif yang digunakan sebagai pembanding yaitu vitamin C. Nilai % inhibisi dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Hambatan} = \frac{(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}})}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

Keterangan :     A<sub>kontrol</sub> = Absorbansi tidak mengandung sampel  
                      A<sub>sampel</sub> = Absorbansi sampel

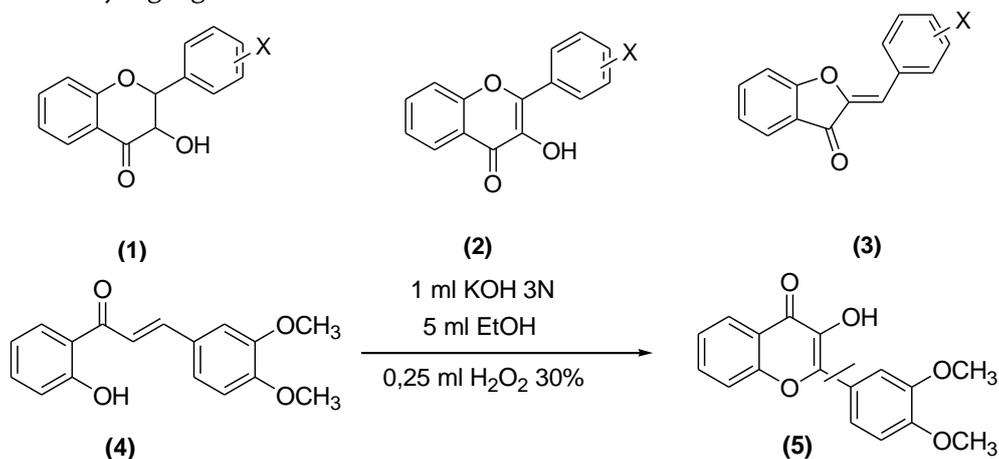
## 2.4. Uji Aktivitas Antikanker

Senyawa Flavonol hasil sintesis diuji aktivitas anti kankernya terhadap terhadap sel MCF-7 menggunakan metode MTS (3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). Sel MCF-7 yang sebelumnya disimpan dalam tangki nitrogen disubkultur pada media kultur hingga siap digunakan untuk uji. Sejumlah  $1 \times 10^4$  sel dimasukkan ke dalam sumuran pada 96 well plate dan diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% bersuhu 37 °C selama semalam. Ekstrak uji yang sudah dilarutkan dalam *co-solvent* DMSO ditambahkan ke dalam sumuran dengan delapan seri konsentrasi yaitu: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63 dan 7,81 µg/mL selama 48 jam. Pada akhir inkubasi, media dan ekstrak dibuang kemudian sel dicuci dengan PBS. Pada masing-masing sumuran lalu ditambahkan 100 µL media kultur dan 10µL MTS konsenrasi 5 mg/mL. Sel diinkubasi kembali selama 4-6 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% bersuhu 37 °C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTS membentuk warna ungu. Reaksi MTS dihentikan dengan *reagen stopper* yaitu SDS 10% dalam HCl 0,01 N, lalu diinkubasi semalam pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 570 dan 600 nm kemudian ditentukan selisih serapan dari kedua panjang gelombang tersebut.

## 3. Hasil dan Pembahasan

### 3.1 Sintesis Flavonol

Analog flavonol dihasilkan dari reaksi antara 3,4-dimetoksi-2'-hidroksikalkon dengan hidrogen peroksida dalam suasana basa, melalui reaksi Flynn-Algar-Oyamada (FAO) [3]. Skema reaksi pembentukan senyawa flavonol dari 3,4-dimetoksi-2'-hidroksikalkon dapat dilihat pada Gambar 1. Reaksi diawali dengan oksidasi ikatan rangkap  $\alpha,\beta$  pada molekul 3,4-dimetoksi-2'-hidroksikalkon oleh hidrogen peroksida dalam suasana basa membentuk intermediet epoksida (*oxirane*). Bersamaan dengan itu, basa merebut hidrogen fenolik pada 3,4-dimetoksi-2'-hidroksikalkon sehingga terbentuk ion fenoksida. Selanjutnya, ion fenoksida akan menyerang cincin oksirana sehingga terjadi pemutusan ikatan C-O oksirana. Atom oksigen oksirana digantikan oleh atom oksigen fenoksida melalui penyerangan pada karbon  $\beta$  oksirana menghasilkan flavanonol (**1**). Flavanonol tersebut kemudian akan teroksidasi menjadi flavonol (**2**) oleh hidrogen peroksida. Jika penyerangan ion fenoksida terjadi pada karbon  $\alpha$  oksirana, maka akan dihasilkan auron (**3**) [6]. Proporsi produk yang dihasilkan tergantung pada struktur analog 3,4-dimetoksi-2'-hidroksikalkon dan juga metode yang digunakan [7].



Gambar 1. Skema reaksi senyawa flavonol

Senyawa hasil sintesis (**5**) diperoleh berupa padatan kuning dengan berat 0,1179 g (83,03 %). Kemurnian senyawa hasil sintesis ini ditentukan melalui uji KLT, uji titik leleh, dan analisis HPLC. Sifat fisik senyawa hasil sintesis (**5**) dapat dilihat pada Tabel 1.

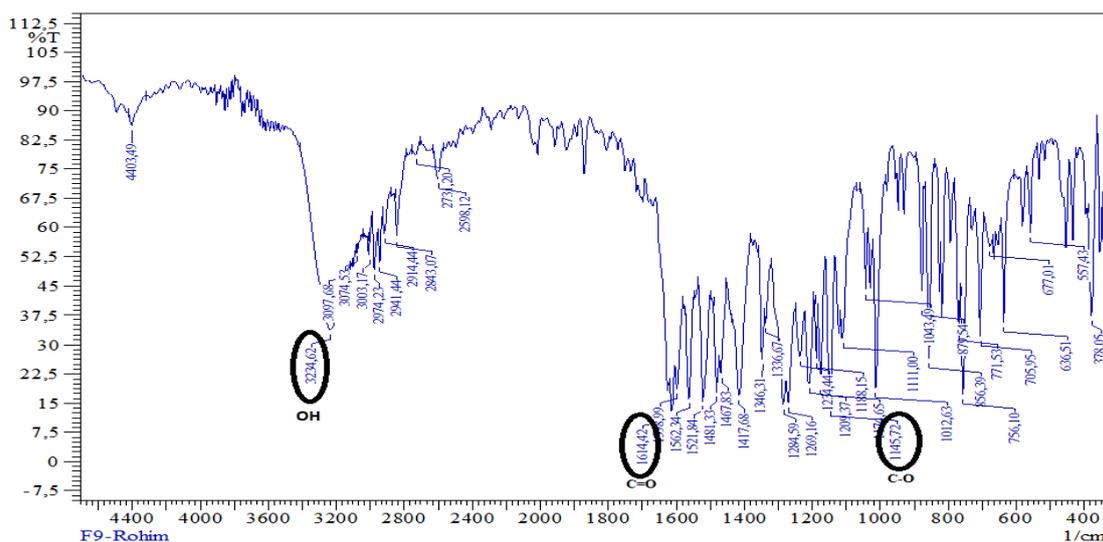
Tabel 1. Sifat fisik senyawa hasil sintesis (5)

Rendemen (%)	Warna	Titik Leleh ( $^{\circ}\text{C}$ )
83,03	Kuning	129-130

Hasil uji KLT dengan menggunakan eluen *n*-heksana:etil asetat 9:1 menunjukkan satu noda, kromatogram HPLC fase terbalik menggunakan eluen air:metanol pada laju alir 1 ml/menit menunjukkan satu puncak pada waktu retensi 11,25 menit menandakan senyawa hasil sintesis yang diperoleh sudah murni.

### 3.2. Karakterisasi Senyawa Hasil Sintesis (5)

Massa molekul senyawa hasil sintesis (5) adalah 298, yang ditunjukkan oleh ion pseudomolekuler pada  $m/z = 299,079$   $[\text{M}+\text{H}]^1$  dan berkesesuaian dengan rumus molekul  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_5$ . Spektrum UV senyawa hasil sintesis (**5**) menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 217, 240 dan 355 nm. Serapan-serapan tersebut memperlihatkan serapan-serapan khas untuk senyawa flavonol yang menunjukkan adanya ikatan rangkap terkonjugasi pada senyawa tersebut. Spektrum FTIR senyawa ini ditampilkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Spektrum FTIR senyawa flavonol

Spektrum FTIR senyawa hasil sintesis (**5**) memperlihatkan serapan pada bilangan gelombang 3200-3300  $\text{cm}^{-1}$  yang menunjukkan vibrasi dari ikatan O-H yang terikat pada C-3 cincin kroman. Serapan pada bilangan gelombang 3010-3074 menunjukkan vibrasi dari ikatan C-H aromatik. Serapan pada bilangan gelombang 1610-1645 menunjukkan vibrasi dari ikatan C=O yang terkonjugasi dengan ikatan rangkap  $\alpha,\beta$  tak jenuh. Serapan pada bilangan gelombang 1562-1571

menunjukkan vibrasi dari ikatan C=C aromatik. Serapan pada bilangan gelombang 1132-1199 menunjukkan vibrasi dari ikatan C-O yang mengindikasikan adanya gugus OH pada atom C-3 cincin kroman.

Spektrum  $^1\text{H}$  NMR senyawa hasil sintesis (**5**) menunjukkan pergeseran kimia yang khas pada daerah aromatik (Tabel 2). Ini menunjukkan bahwa OH aril pada senyawa 3,4-dimetoksi-2'-hidroksikalkon telah mengalami reaksi siklisasi membentuk cincin heterosiklik kroman. Puncak *singlet* muncul pada  $\delta$  7,03 ppm (1H) menunjukkan proton dari gugus OH yang terikat pada karbon C-3 cincin heterosiklik kroman. Ini menandakan bahwa pada cincin heterosiklik kroman tersebut terdapat gugus OH yang menjadi ciri khas senyawa flavonol. Proton aromatik pada senyawa hasil sintesis (**5**) dapat diamati pada pergeseran kimia  $\delta$  8,25 ppm yang menunjukkan pergeseran kimia dari proton H-5 dengan puncak *doublet of doublet* ( $J_1 = 8,1$  Hz dan  $J_2 = 1,6$  Hz). Konstanta *coupling* sebesar 8,1 Hz merupakan *ortho coupling*, menunjukkan korelasi antara proton H-5 dengan proton H-6, sedangkan konstanta *coupling* sebesar 1,6 Hz merupakan *meta coupling*, menunjukkan korelasi antara proton H-5 dengan proton H-7. Sinyal proton pada  $\delta$  7,70 ppm menunjukkan pergeseran kimia proton H-7 dengan puncak *doublet of doublet of doublet* ( $J_1 = 8,7$  Hz,  $J_2 = 7$  Hz dan  $J_3 = 1,7$  Hz). Konstanta *coupling* sebesar 7,8 Hz dan 7 Hz merupakan *ortho coupling*, menunjukkan korelasi antara proton H-7 dengan proton H-6 dan H-8, sedangkan konstanta *coupling* sebesar 1,7 Hz merupakan *meta coupling*, menunjukkan korelasi antara proton H-7 dengan proton H-5. Sinyal proton pada  $\delta$  7,59 ppm merupakan proton H-8 dengan puncak *doublet* ( $J_1 = 8,4$  Hz). Konstanta *coupling* sebesar 8,4 Hz merupakan *ortho coupling*, yang menunjukkan korelasi antara proton H-8 dengan proton H-7. Sinyal proton pada  $\delta$  7,42 ppm menunjukkan pergeseran kimia proton H-6 dengan puncak *triplet* ( $J_1 = 7,5$  Hz). Konstanta *coupling* sebesar 7,5 Hz merupakan *ortho coupling*, yang menunjukkan korelasi antara proton H-6 dengan proton H-5. Sinyal proton pada  $\delta$  7,03 ppm merupakan proton H-6' dengan puncak *doublet* ( $J_1 = 8,6$  Hz). Konstanta *coupling* sebesar 8,6 Hz merupakan *ortho coupling*, menunjukkan korelasi antara proton H-6' dengan proton H-5'. Pergeseran kimia pada  $\delta$  4,00-3,98 ppm menunjukkan pergeseran kimia dari proton  $\text{OCH}_3$  dengan puncak *singlet*.

Tabel 2. Interpretasi data  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) senyawa hasil sintesis (**5**)

Posisi	Senyawa hasil sintesis ( <b>5</b> ) $\delta_{\text{H}}$ (ppm), $J$ (Hz)	Posisi	Senyawa hasil sintesis ( <b>5</b> ) $\delta_{\text{H}}$ (ppm), $J$ (Hz)
1	-	1'	7,87 (d, 1H, $J = 2,0$ )
2	-	2'	-
3	7,03(br, 1H, OH)	3'	-
4	-	4'	-
5	8,25 (dd, 1H, $J = 8,1; 1,6$ )	5'	7,03(d, 1H, $J = 8,6$ )
6	7,45 (t, 1H, $J = 7,5$ )	6'	7,90 (dd, 1H, $J = 8,5; 2,1$ )
7	7,70(ddd, 1H, $J = 8,7; 7; 1,7$ )		
8	7,59 (d, 1H, $J = 8,4$ )		
9	-		
10	-		

Berdasarkan data UV, IR, MS dan  $^1\text{H}$  NMR, struktur senyawa hasil sintesis ditentukan sebagai 3',4'-dimethoxy flavonol yang sesuai dengan struktur molekul target.

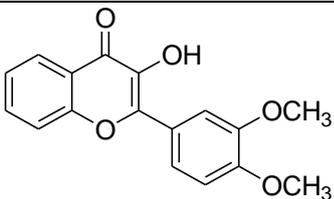
### 3.3. Uji Antioksidan Senyawa Flavonol

Uji aktivitas antioksidan flavonol (Tabel 3) terhadap DPPH dilakukan dengan menggunakan alat *Microplate Reader 96 Well* pada panjang gelombang 520 nm. DPPH (*difenil pikril hidrazil*) menghasilkan radikal bebas aktif bila dilarutkan dalam metanol. Absorbansi radikal DPPH tersebut akan berkurang ketika dihambat oleh antioksidan melalui donor hidrogen untuk membentuk DPPH stabil. Reaksi tersebut menyebabkan terjadinya perubahan warna dari ungu menjadi kuning<sup>[8]</sup>. Berdasarkan hasil uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH senyawa flavonol hasil sintesis memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Hal ini dikarenakan senyawa flavonol tersebut memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar 35,58  $\mu\text{g/mL}$ , lebih baik dibandingkan vitamin C sebagai kontrol positif ( $IC_{50}$  sebesar 42,03  $\mu\text{g/mL}$ ) dalam menghambat radikal DPPH.

### 3.4. Uji Antikanker Senyawa Flavonol

Uji aktivitas antikanker flavonol (Tabel 3) terhadap sel kanker MCF-7 dilakukan melalui metoda MTS dengan menggunakan alat *Microplate Reader 96 Well* pada panjang gelombang 570 dan 600 nm. MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl) -2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, *inner salt*) merupakan *reagen electron coupling* dalam reaksinya sering dikombinasikan dengan PMS (*phenazine methosulfate*). Jika MTS ditambahkan kedalam kultur sel kanker yang sudah di tambahkan PMS kemudian diinkubasi maka MTS akan direduksi oleh enzim *dehydrogenase* menjadi produk formazan yang larut dalam medium kultur. Enzim *dehydrogenase* hanya terdapat pada sel hidup dengan aktivitas metabolik yang tinggi. Produk formazan, yang merupakan indikasi proses reduksi MTS, berwarna ungu dan absorbansinya dapat diukur pada  $\lambda$  diatas 490 nm dengan alat multiplate reader. Jumlah produk formazan yang terukur melalui absorbansi  $\lambda$  490 nm sebanding dengan jumlah sel hidup dalam kultur<sup>[9],[10]</sup>. Berdasarkan hasil uji aktivitas antikanker menggunakan metode MTS senyawa flavonol hasil sintesis (5) berpotensi sebagai antikanker dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 981,3  $\mu\text{g/mL}$ , yang mendekati nilai  $IC_{50}$  Cisplatin sebagai kontrol positif ( $IC_{50}$  sebesar 461,15  $\mu\text{g/mL}$ ).

Tabel 3. Hasil uji aktivitas antioksidan dan antikanker senyawa Flavonol hasil sintesis.

No	Senyawa	Struktur Senyawa	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) Antioksidan	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) Antikanker
1	3',4'-dimetoksi flavonol		35,58	981,3

## 4. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diambil kesimpulan bahwa sintesis senyawa 3',4'-dimetoksi flavonol dengan menggunakan modifikasi metode yang telah digunakan oleh Britton *et al.*, (2012)<sup>[3]</sup>. Kemudian karakterisasi menggunakan spektroskopi UV, FTIR, 1H NMR, HRMS dan kromatogram HPLC menunjukkan bahwa struktur molekul senyawa hasil sintesis sesuai dengan struktur molekul target. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH

menunjukkan bahwa senyawa 3',4'-dimetoksi flavonol bersifat aktif sebagai antioksidan dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 35,58 µg/mL dan berpotensi sebagai antikanker dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 981,3 µg/mL.

### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terimakasih kepada Riska Prasetyawati M. Farm., Apt., yang telah membantu dalam analisa spektroskopi HRMS.

### Daftar Pustaka

- [1] Dias, T.A., Duarte, C.L., Lima, C.F., Proenca, M.F. & Pereira-Wilson, C. 2013. Superior Anticancer Activity of Halogenated Chalcones and Flavonols Over the Natural Flavonol Quercetin. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 65: 500-510.
- [2] Burmistrova, O., Marrero, M.T., Estevez, S., Welsch, I., Brouard, I., Quintana, J. & Estevez, F. 2014. Synthesis and Effects on Cell Viability of Flavonols and 3-Methyl Ether Derivatives on Human Leukemia Cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 84: 30-41.
- [3] Britton, R.G., Horner-Glister, E., Pomenya, O.A., Smith, E.E., Denton, R., Jenkins, P.R., Steward, W.P., Brown, K., Gescher, A. & Sale, S. 2012. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Flavonols as Potential Anti-Prostate Cancer Agent. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 54: 952-958.
- [4] Jadhav, S.B., Bagul, K.R., Bagul, P.R. & Gaikwad, K.V. 2008. Synthesis of Some Novel Flavonol Derivatives and Its Antimicrobial Activity. *Oriental Journal of Chemistry*, 24(2): 583-588.
- [5] Zhang, Q., Zhang, J., Shen, J., Silva, A., Dennis, D.A. & Barrow, C.J. 2006. A Simple 96-Well Microplate Method for Estimation of Total Polyphenol Content in Seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 18: 445-450.
- [6] Bennett, M., Burke, J.A. & O'Sullivan, W.I. 1996. Aspects of the Algar-Flynn-Oyamada (AFO) Reaction. *Tetrahedron*, 52(20): 7163-7178.
- [7] Gormley, T.R. & O'Sullivan W.I. 1973. Flavanoid Epoxides-XIII<sup>1</sup> Acid and Base Catalysed Reactions of 2'-toxyloxychalcone epoxides. Mechanism of the Algar-Flynn-Oyamada Reaction. *Tetrahedron*, 29(2): 369-373.
- [8] Molyneux, P. 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Journals Songklanakarin Science Technology*, 26: 212-219.
- [9] Riss, T.L., R.A. Moravec, A.L. Niles, H.A. Benink, T.J. Worzella, & L.Minor. 2004. Cell viability assays. *Assay Guidance Manual* : 1-23.
- [10] Huang, K.T., Y.H. Chen, and A.M. Walker. 2004. Inaccuracies in MTS assays: major distorting effects of medium, serum albumin, and fatty acids. *BioTechniques* 37: 406-412