

SINTESIS DAN UJI TOKSISITAS SENYAWA ANALOG KALKON TERSUBSTITUSI METOKSI

Rahma Dona*, Adel Zamri, Jasril

Bidang Kimia Organik, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Riau

Email : rdona1985@yahoo.com

ABSTRAK

Kalkon merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid yang terdapat pada beberapa jenis tumbuhan dalam jumlah yang relatif sedikit. Senyawa ini merupakan prekursor untuk biosintesis flavonoid dan isoflavonoid. Senyawa kalkon telah dilaporkan memiliki berbagai aktivitas biologis yang menarik seperti antimikrob, antitumor, antioksidan, antiinflamasi, antimalaria, dan antikanker. Aktivitas senyawa kalkon dipengaruhi oleh gugus α, β -tak jenuh dan substituen yang terdapat pada cincin aromatik. Pada penelitian ini, tiga analog kalkon tersubstitusi mono-metoksi pada cincin A aromatik dan cincin B aromatik telah disintesis menggunakan metode iradiasi *microwave* dengan katalis KOH dan pelarut etanol. Struktur setiap produk dikarakterisasi dengan spektroskopi UV-Vis, FTIR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, dan HRMS. Uji toksisitas dilakukan menggunakan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Berdasarkan hasil uji BSLT, ketiga senyawa tersebut berpotensi sebagai senyawa antikanker dengan nilai $\text{LC}_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$.

Kata kunci: kalkon, uji toksisitas, *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

1. PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyebab kematian kedua terbesar di dunia setelah penyakit jantung (Safavi *et al.*, 2012). Berbagai macam senyawa telah dikembangkan untuk mengatasi kanker, akan tetapi tidak satupun jenis senyawa-senyawa tersebut menghasilkan efek yang memuaskan dan tanpa efek samping yang merugikan. Obat antikanker yang telah ada selain memiliki khasiat sebagai antikanker juga dapat merusak sel-sel normal. Oleh karena itu, hingga saat ini penelitian yang berhubungan dengan penemuan obat antikanker baru yang ampuh, aman dan selektif masih terus dilakukan oleh para peneliti.

Kalkon merupakan senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid yang dapat ditemukan pada beberapa jenis tumbuhan. Senyawa kalkon dan turunannya dikenal memiliki beragam aktivitas biologis yang menarik, seperti antiviral, anti-inflamasi, antimikroba, antitumor, sitotoksik, analgesik, antijamur, antioksidan, antikanker dan antimalaria (Sarda *et al.*, 2009). Koketsu *et al.* (2010), berhasil mensintesis senyawa 1,3-bis (4-klorofenil) – 3 -fenilsulfonil propan-1-on yang berpotensi sebagai antibakteri. Selain itu, Yan-Fang *et al.* (2012), telah berhasil

mengisolasi senyawa 3-hidroksi-4-metoksilonkorkarpin yang berkhasiat sebagai antitumor dari tumbuhan *Millettia pachycarpa*.

Senyawa kalkon merupakan prekursor untuk biosintesis flavonoid dan isoflavonoid. Dalam bidang sintesis, senyawa kalkon telah banyak digunakan untuk membuat berbagai macam senyawa heterosiklik (Tiwari *et al.*, 2010) seperti isoksazol, quinolinon, tiadiazin, benzodiazepin, flavon (Jayapal *et al.*, 2010), ketimin α, β tak jenuh (Lonkar *et al.*, 2011), pirazolin dan turunannya (Sharshira & Hamada, 2011; Sing *et al.*, 2009), flavonol (Britton *et al.*, 2012; Jadhav *et al.*, 2008), flavanonol (Patil, 2012) flavanon (Kulkarni, 2012) dan senyawa turunan lainnya yang juga memiliki aktivitas biologis yang menarik. Oleh karena itu, senyawa-senyawa analog kalkon dan turunannya banyak dijadikan sebagai molekul target untuk keperluan pencarian senyawa-senyawa aktif sebagai kandidat obat, salah satunya adalah sebagai obat antikanker.

Aktivitas biologis kalkon, selain disebabkan oleh gugus karbonil α, β tak jenuh, juga dipengaruhi oleh substituen yang terikat pada kedua cincin aromatik (Kamble *et al.*, 2011). Oleh karena itu, variasi substituen pada cincin

aromatik akan menghasilkan kalkon dengan struktur aktivitas yang beragam.

Pada umumnya, sintesis senyawa kalkon dilakukan melalui reaksi kondensasi Claisen Schmidt menggunakan turunan benzaldehid dan asetofenon. Reaksi pembentukan senyawa kalkon dapat dipercepat dengan penambahan katalis asam atau basa. Sintesis dapat dilakukan dengan metode pengadukan, pemanasan, refluks, dan iradiasi *microwave*. Namun beberapa tahun terakhir ini penggunaan energi *microwave* dalam reaksi organik sangat populer karena lebih aman, ramah lingkungan (*green chemistry*), cepat dan menghasilkan produk yang lebih banyak dibandingkan metode konvensional.

Senyawa hasil sintesis dikarakterisasi berdasarkan interpretasi data spektroskopi UV-Vis, FTIR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, dan HRMS kemudian diuji sifat toksiknya dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Uji BSLT merupakan salah satu teknik pendahuluan untuk menentukan letalitas atau toksisitas suatu senyawa. Uji ini merupakan uji pendahuluan untuk menentukan aktivitas antikanker dari suatu senyawa. Hal ini didasarkan pada pemikiran bahwa sebagian besar senyawa antikanker adalah bersifat toksik. Pengujian letalitas sederhana ini tidak spesifik untuk antikanker, tetapi merupakan indikator sitotoksik yang baik (Meyer *et al.*, 1982). Berdasarkan metode BSLT, suatu tanaman atau hasil isolasi dianggap menunjukkan aktivitas sitotoksik bila mempunyai nilai LC_{50} kecil dari 1000 ppm, sedangkan untuk senyawa murni dianggap menunjukkan aktivitas sitotoksik bila mempunyai nilai LC_{50} kecil dari 200 ppm (Anderson *et al.*, 1991).

2. METODOLOGI PENELITIAN

Bahan dan Peralatan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2'-metoksi asetofenon (Merck), 3'-metoksi asetofenon (Merck), 4'-metoksi asetofenon (Merck), -metoksibenzaldehid (Merck), 3-metoksibenzaldehid (Merck), 4-metoksibenzaldehid (Merck), etanol (Merck), dimetilsulfoksida (Merck), kalium hidroksida (Merck), asam klorida 1 N, telur udang (*Artemia*

salina Leach), air laut dan pelarut-pelarut organik yang umum digunakan.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat pengukur titik leleh (Fisher John), HPLC (Shimadzu LCsolution, jenis kolom *Shim-Pack* VP-ODS dengan panjang dan diameternya 150 x 4,6 mm), spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S UV-VIS v4.002 2L9N175013), spektrofotometer FTIR (Shimadzu, IR Prestige-21), spektroskopi ^1H NMR dan ^{13}C NMR (Agilent 500 MHz) di Institut Teknologi Bandung, spektroskopi massa (MS water LCT premier XE positive mode) di Institut Teknologi Bandung, alat-alat untuk sintesis dan uji toksisitas yang umum digunakan di laboratorium.

Prosedur Kerja Sintesis

Turunan asetofenon (5 mmol) dan turunan benzaldehid (5 mmol) dilarutkan dalam 5 mL etanol dan ditambahkan 15 mmol KOH. Kemudian campuran diiradiasi menggunakan *microwave* dengan daya 180 Watt selama 8-15 menit. Tahapan reaksi diamati dengan KLT. Setelah proses reaksi selesai, campuran ditambahkan asam klorida 1N dan akuades dingin hingga pH menjadi netral yang ditentukan dengan pH indikator. Endapan yang dihasilkan selanjutnya disaring dengan corong *Buchner*, dicuci dengan *n*-heksana dan akuades dingin, kemudian divakum hingga kering. Senyawa kalkon yang tidak murni direkristalisasi menggunakan etilasetat panas. Analisis kemurnian dilakukan melalui KLT, uji titik leleh, dan HPLC.

Uji Toksisitas dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Uji toksisitas dengan metode BSLT dilakukan berdasarkan metode yang telah dilakukan oleh Meyer *et al.* (1982). Kista udang *A. salina* ditetaskan dalam wadah pembiakan yang berisi air laut, dan digunakan setelah aerasi selama 48 jam (setelah terbentuk larva). Vial uji dikalibrasi dengan 5 mL aquades. Uji aktivitas toksisitas senyawa analog kalkon dilakukan pada konsentrasi 10, 1 dan 0,1 $\mu\text{g/mL}$. Sampel sebanyak 20 mg dilarutkan dalam 2 mL metanol (larutan induk konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$),

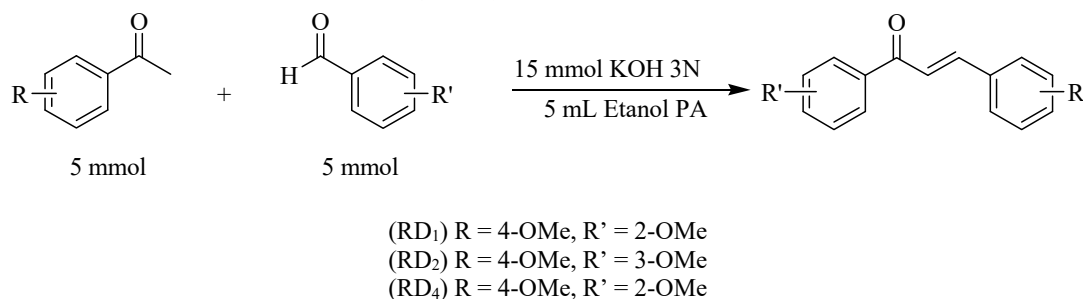
kemudian dari larutan induk dibuat larutan dengan konsentrasi berbeda yaitu 10 µg/mL, 1 µg/mL, dan 0,1 µg/mL dengan cara pengenceran bertingkat. Disiapkan vial yang sudah dikalibrasi 5 mL untuk masing-masing konsentrasi. Sampel dipipet ke dalam masing-masing vial, lalu diuapkan hingga mengering. Selanjutnya, kedalam masing-masing vial ditambahkan 50 µL DMSO dan sedikit air laut. Sebanyak 10 ekor larva udang yang sudah disiapkan dimasukkan kedalam vial tersebut dan ditambahkan air laut hingga batas kalibrasi 5 mL. Tingkat toksisitas senyawa analog kalkon diukur dengan cara menghitung jumlah larva udang yang mati dalam selang waktu 24 jam. Pengujian dilakukan dengan 3 kali pengulangan dan data dianalisis untuk menentukan nilai LC_{50} dengan metode kurva menggunakan tabel analisis probit.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Senyawa analog kalkon (RD_1)-(RD_3) diperoleh melalui reaksi kondensasi keton aromatik dan aldehid aromatik tersubstitusi mono-metoksi. Proses sintesis dipercepat dengan penambahan larutan KOH_3N sebagai katalis dibawah kondisi iradiasi *microwave* dengan daya

180 Watt selama 8-15 menit. Skema reaksi sintesis senyawa analog kalkon (RD_1)-(RD_3) tersebut dapat dilihat pada **Gambar 7**.

Senyawa analog kalkon (RD_1)-(RD_3) hasil sintesis berupa serbuk berwarna kuning. Rendemen senyawa murni yang dihasilkan cukup baik (51-63%). Analisis kemurnian senyawa analog kalkon hasil sintesis ditentukan melalui KLT, titik leleh, dan HPLC. Analisis kemurnian dengan KLT dilakukan menggunakan eluen *n*-heksana: etil asetat (7:3) dan menunjukkan satu noda. Hasil analisis kemurnian dengan titik leleh diketahui bahwa jarak leleh senyawa analog kalkon secara teori dan hasil penelitian $\leq 2^\circ C$. Analisis kemurnian dengan HPLC menghasilkan kromatogram dengan satu puncak dominan pada $t_R = 10,8$ menit untuk senyawa (1), $t_R = 11,2$ menit untuk senyawa (2), dan $t_R = 10,6$ menit untuk senyawa (3). Data tersebut menunjukkan bahwa senyawa analog kalkon (RD_1)-(RD_3) yang dihasilkan telah murni. Senyawa analog kalkon (RD_1)-(RD_3) dikarakterisasi menggunakan spektroskopi UV, IR, 1H -NMR dan HRMS. Sifat Fisik senyawa (RD_1)-(RD_3) dapat dilihat pada **Tabel 2**.



Gambar. 7. Reaksi sintesis senyawa analog kalkon RD_1 - RD_3

Tabel. 2. Sifat fisik senyawa analog kalkon RD_1 - RD_3

Senyawa	Rumus Molekul	Berat Molekul	Rendemen (%)	Warna	Titik leleh ($^\circ C$)	R_f (n-heksan:EtOAc)
(1)	$C_{17}H_{16}O_3$	269,1173	51,14	Kuning	96-98	0,78 (7:3)
(2)	$C_{17}H_{16}O_3$	269,1180	62,07	Kuning	46-48	0,82 (7:3)
(3)	$C_{17}H_{16}O_3$	269,1176	63,91	Kuning	62-64	0,74 (7:3)

Spektrum UV senyawa RD₁-RD₃ dalam pelarut metanol (MeOH) berturut-turut memperlihatkan adanya serapan maksimum pada λ 205 nm, 236 nm, dan 346 nm untuk senyawa (1), serapan maksimum pada λ 207 nm, 223 nm, dan 343 nm untuk senyawa (2), serapan maksimum pada λ 206 nm, 221 nm, dan 334 nm untuk senyawa (3) menunjukkan adanya ikatan rangkap terkonjugasi yang merupakan ciri khas dari senyawa kalkon.

Spektrum FTIR senyawa RD₁-RD₃ memperlihatkan adanya serapan pada bilangan gelombang (cm⁻¹) 1660-1667 mengindikasikan adanya gugus C=O terkonjugasi dengan ikatan rangkap α,β tak jenuh. Serapan pada bilangan gelombang 1564-1606 mengindikasikan

adanya ikatan C=C alkena yang terkonjugasi dengan karbonil dan cincin aromatik. Serapan pada bilangan gelombang 3070-3080 mengindikasikan adanya ikatan C-H aromatik. Serapan pada bilangan gelombang 1166-1178 mengindikasikan adanya ikatan C-OMe.

Spektrum ¹H-NMR senyawa analog kalkon RD₁-RD₉ menunjukkan pergeseran yang khas pada proton gugus metoksi. Proton tersebut terdapat pada pergeseran kimia δ 3,00-4,00 ppm dengan puncak *singlet* dan integritas 3H. Proton yang terdapat pada C _{α} dan C _{β} memiliki nilai tetapan kopling (*J*) 15-16 Hz dengan puncak *doublet*. Nilai tetapan kopling tersebut menunjukkan bahwa ikatan rangkap pada C _{α} dan C _{β} mempunyai konfigurasi trans.

Tabel. 3. Interpretasi data ¹H NMR senyawa analog kalkon RD₁, RD₂, dan RD₃

Nomor Atom	Senyawa RD ₁ δ_H (ppm)	Senyawa RD ₂ δ_H (ppm)	Senyawa RD ₃ δ_H (ppm)
1	-	-	-
2	7,60 (d; 2H; <i>J</i> =8,5 Hz)	7,60 (d; 2H; <i>J</i> =8,5 Hz)	7,53 (d; 2H; <i>J</i> =8,5 Hz)
3	6,94 (d; 2H; <i>J</i> =9 Hz)	6,93 (d; 2H; <i>J</i> =9 Hz)	6,91 (d; 2H; <i>J</i> =9 Hz)
4	3,85 (s, 3H, -OCH ₃)	3,85 (s, 3H, -OCH ₃)	3,84 (s, 3H, -OCH ₃)

Nomor Atom	Senyawa RD1 δ_H (ppm)	Senyawa RD2 δ_H (ppm)	Senyawa RD3 δ_H (ppm)
5	6,94 (d; 2H; <i>J</i> =9 Hz)	6,93 (d; 2H; <i>J</i> =9 Hz)	6,91 (d; 2H; <i>J</i> =9 Hz)
6	7,60 (d; 2H; <i>J</i> =8,5 Hz)	7,60 (d; 2H; <i>J</i> =8,5 Hz)	7,53 (d; 2H; <i>J</i> =8,5 Hz)
C _{α}	7,43 (d; 1H _{α} ; <i>J</i> =15,5 Hz)	7,39 (d; 1H _{α} ; <i>J</i> =15,5 Hz)	7,23 (d; 1H _{α} ; <i>J</i> =16 Hz)
C _{β}	7,78 (d; 1H _{β} ; <i>J</i> =15,5 Hz)	7,78 (d; 1H _{β} ; <i>J</i> =16 Hz)	7,54 (d; 1H _{β} ; <i>J</i> =15,5 Hz)
1'	-	-	-
2'	8,03 (d; 2H; <i>J</i> =8,5 H)	7,53 (t; 1H; <i>J</i> =2 Hz)	3,89 (s, 3H, -OCH ₃)
3'	6,98 (d; 2H; <i>J</i> =9 Hz)	3,88 (s, 3H, -OCH ₃)	6,99 (d; 2H; <i>J</i> =8,5 Hz)
4'	3,89 (s, 3H, -OCH ₃)	7,11 (dd; 1H; <i>J</i> _{a} =2,5 Hz dan <i>J</i> _{b} =10,5 Hz)	7,46 (t; 1H, <i>J</i> =7,5 Hz)
5'	6,98 (d; 2H; <i>J</i> =9 Hz)	7,40 (t; 1H; <i>J</i> =8 Hz)	7,03 (d; 1H; <i>J</i> =7,5 Hz)
6'	8,03 (d; 2H; <i>J</i> =8,5 H)	7,59 (d; 1H; <i>J</i> =6 Hz)	7,59 (dd; 1H; <i>J</i> _{a} =3 Hz dan <i>J</i> _{b} =4,5 Hz)

Berat molekul senyawa-senyawa hasil sintesis dikonfirmasi melalui spektroskopi massa (HRMS). Berat molekul senyawa RD₁ ditunjukkan oleh spektrum massa yang dihitung sebagai C₁₇H₁₆O₃ [M+H]⁺ dengan puncak ion molekul m/z 269,1178 dan ditemukan pada spektrum massa dengan puncak ion molekul m/z 269,1173, selisih massa molekul tersebut 0,0005. Berat molekul senyawa RD₂ ditunjukkan oleh spektrum massa yang dihitung sebagai C₁₇H₁₆O₃ [M+H]⁺ dengan puncak ion molekul m/z 269,1178 dan ditemukan pada spektrum massa dengan puncak ion molekul m/z 269,1180, selisih massa molekul tersebut 0,0002. Berat molekul senyawa RD₃ ditunjukkan oleh spektrum massa yang dihitung sebagai C₁₇H₁₆O₃ [M+H]⁺ dengan puncak ion molekul m/z 269,1178 dan ditemukan pada spektrum massa dengan puncak ion molekul m/z 269,1176, selisih massa molekul tersebut 0,0002.. Selisih massa berdasarkan spektrum massa dengan massa perhitungan menunjukkan perbedaan yang sangat kecil antara senyawa yang diharapkan dengan senyawa kalkon yang diperoleh dan dapat dikatakan bahwa senyawa kalkon tersebut sangat murni. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa senyawa kalkon tersebut mempunyai struktur sesuai dengan yang diharapkan.

Uji toksisitas terhadap senyawa kalkon RD₁-RD₃ dilakukan menggunakan metode BSLT. Hasil uji toksisitas terhadap senyawa kalkon tersebut dapat dilihat pada **Tabel 4**.

Tabel. 4. Hasil uji toksisitas

Senyawa	Nilai LC ₅₀ (µg/mL)
RD ₁	1,045
RD ₂	2,008
RD ₃	0,617

Berdasarkan uji BSLT yang telah dilakukan, dapat dikatakan bahwa senyawa-senyawa kalkon turunan 2'-hidroksiasetofenon tersebut berpotensi aktif sebagai senyawa antikanker yang dibuktikan dengan nilai LC₅₀<200 µg/mL.

4. KESIMPULAN DAN SARAN

Melalui penelitian ini telah dihasilkan tiga analog kalkon tersubstitusi mono-metoksi

dikedua cincin aromatik dengan rendemen yang cukup baik (51-63%). Sintesis dilakukan melalui reaksi kondensasi Claisen-Schmidt menggunakan metode iradiasi *microwave* dengan katalis KOH dan menggunakan etanol sebagai pelarut. Hasil karakterisasi melalui spektroskopi UV-Vis, FTIR, ¹H NMR, ¹³C NMR, dan HRMS menunjukkan bahwa ketiga senyawa hasil sintesis memiliki struktur sesuai dengan yang diharapkan. Berdasarkan hasil uji pendahuluan menggunakan metode BSLT dapat disimpulkan bahwa ketiga senyawa hasil sintesis berpotensi aktif sebagai senyawa antikanker yang dibuktikan dengan nilai LC₅₀<200 µg/mL.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, J.E. Goetz, C.M., dan McLaughlin, J.L. 1991. A Blind Comparison of Simple Bench Top Bioassay and Human Tumor Cell Cytotoxicity as Antitumor Prescreens. *Pytochemical Analysis*. 2(3): 107-111.
- Britton, R.G., Horner-Glister, E., Pomenya, O.A., Smith, E.E., Denton, R., Jenkins, P.R., Steward, W.P., Brown, K., Gescher, A., dan Sale, S. 2012. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Flavonols as Potential Anti-Prostate Cancer Agent. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 54: 952-958.
- Jadhav, S.B., Bagul, K.R., Bagul, P.R., dan Gaikwad, K.V. 2008. Synthesis of Some Novel Flavonol Derivatives and Its Antimicrobial Activity. *Oriental Journal of Chemistry*. 24(2): 583-588.
- Jayapal, M.R., Prasad, K.S., dan Sreedhar, N.Y. 2010. Synthesis and Characterization of 2,6-dihydroxy Substituted Chalcones Using PEG-400 as a Recyclable Solvent. *J. Pharm. Sci & Res*. 2(8):450-458.
- Kamble, V.M., Hatnapure, G.D., Keche, A.P., Birajdar, S., Patil, S.G., Tale, R.H., Rodge, A.H., Turkar, S.S., dan Gour, K. 2011. Sintesis and Biological Evaluation of a Novel Series of Methoxylated Chalcones as Antioxidant and Anti-microbial agents. *J. Chem. Pharm. Res*. 3(6):639-648.
- Kulkarni, P., Wagh, P., dan Zubaidha, P. 2012. An Improved and Eco-Friendly Method for

- The Synthesis of Flavanone by The Cyclization of 2'-Hydroxy Chalcone using Methane Sulphonic Acid as Catalyst. *Chemistry Journal*. 2(3): 106-110.
- Lonkar, S.M., Mokle, S.S., Vibhute, A.Y., dan Vibhute, Y.B. 2011. Green Approach for The Synthesis of Some New α,β -Unsaturated Ketimines under Water Suspension. *Orbital Elec. J. Chem.* 3(4):197-203.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacosen, L.B., Nichols D.E., dan McLaughlin, J.L. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Journal of Medicinal Plant Research Planta Medica*. 45: 31-34.
- Patil, V.J. 2012. Synthesis and In Vitro Antiplatelet Activity of Chalcone, Flavonol and Flavonol Derivatives. *IJPSR*. 3(12): 5006-5014.
- Safavi, M., Esmati, N., Ardestani, S. K., Emami, S., Ajdari, S., Davoodi, J., Shafiee, B., & Foroumadi, A. 2012. Halogenated flavanones as potential apoptosis-including agent: Synthesis and biological activity evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 58:573-580.
- Sarda, S.R., Bhusare, S.R., Dake, S.A., Jadhav, W.N., dan Pawar, R.P. 2009. Solvent-free NaOH-Al₂O₃ supported synthesis of 1,3-diaryl-2-propene-1-ones. *International Journal of ChemTech Research*. 1(2): 265-269.
- Sharshira, E.M. dan Hamada, N.M.M. 2011. Synthesis and In Vitro Antimicrobial Activity of Some Pyrazolyl-1-carboxamide Derivatives. *Molecules*. 16: 7736-7745.
- Sing, P., Negi, J.S., Pant, G.J.N., Rawat, M.S.M. & Budakoti, A. 2009. Synthesis and Characterization of a Novel 2-Pyrazoline. *Molbank*, 613: 1-4.
- Tiwari, B., Pratapwar, A.S., Tapas, A.R., Butle, S.R., dan Vatar, B.S. 2010. Synthesis and Antimicrobial Activity of some chalcone derivatives. *International Journal of ChemTech Research*. 2(1): 499-503.
- Yang-Fang, L., Bing, L., Cong-Ying, L., Xue-Hui, S., Yu-Jiao, Z., dan Zhi-Peng, Y. 2012. A new prenylated chalcone from the seeds of *Millettia pachycarpa*. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 10(3): 222-225 dan *Beberapa Kriteria Kualitas Sayuran Daun Spinacia*, Universitas Padjajaran, Bandung.
- I. Kohar, P. H. Hardjo, L. Wijaya, 2005. *Jurnal Ilmiah Sains & Teknologi I. Vol.2*.
- Rumajar, A.T.B. 2010. *Skripsi* "Penjajakan Kadar Logam Berat Pb Pada Tanaman Kangkung Darat (*Ipomoea reptans* Poir) Asal Kecamatan Medan Deli Dan Kangkung Air (*Ipomoea aquatica* Forsk) Asal Kecamatan Sunggal Kota Medan", USU, Medan
- Sunarjono. H, 2013, *Bertanam 36 Jenis Sayur*, Jakarta, Penebar Swadaya.
- Suparwoko, 2008, *Puring paling Top Serap Timbal*, artikel majalah Trubus Online, <http://www.trubus-online.co.id/mod.php?mod=publisher&op=viewarticle&cid=1&artid=1414> edisi Jumat, Agustus 2008, diakses Februari 2013.
- Suharto, 2005, *Dampak Pencemaran Logam Timbal (Pb) terhadap tubuh. Efek Toksik Logam*. Yogyakarta.
- Tafajani. H, 2011, *Panduan Komplit Bertanam Sayur dan Buah-buahan*, Yogyakarta, Cahaya Atma.
- Widiningrum, Miskiyah dan Suismono, 2007, *Jurnal pertanian*. Ahaya Kontaminasi Logam Berat Dalam Sayuran dan Alternatif Pencegahan Cemarannya, Vol.3, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pasca Panen Pertanian, Jakarta.
- Widowati, 2008. Pencemaran Logam Berat Terhadap Sayuran. *Jurnal Sains*. Jakarta.
- Widowati. H. 2011. Pengaruh Logam Berat Cd, Pb Terhadap Perubahan Warna Batang dan Daun Sayuran. *Jurnal Sains*. Vol. 1, No. 4.