

ISOLASI ACTINOMYCETES LAUT PENGHASIL METABOLIT SEKUNDER YANG AKTIF TERHADAP SEL KANKER A549

Rofiq Sunaryanto¹⁾, Bambang Marwoto²⁾, dan Yoshihide Matsuo²⁾

ABSTRAK

Telah dilakukan isolasi *Actinomycetes* laut yang mampu menghasilkan senyawa aktif citropeptin yang memiliki efek toksik terhadap sel kanker paru-paru A549. Isolasi dilakukan dengan menggunakan medium agar *starch casein* yang ditambah dengan *cycloheximide* dan nistatin sebagai antifungi serta rifampisin dan *nalidixic acid* sebagai antibakteri. Sampel sedimen laut diperoleh dari pelabuhan Kamaishi-shi Iwate, Jepang pada kedalaman 5 meter. Dari 71 isolat yang diperoleh, hanya 9 isolat menunjukkan aktivitas terhadap sel kanker A549 pada konsentrasi 1 µg/200 µL. Hasil studi lebih lanjut menunjukkan bahwa isolat RS02-85 yang merupakan isolat terpilih adalah *Streptomyces tsukubaensis* dengan tingkat kemiripan 98%. Dari hasil identifikasi senyawa aktif, diduga senyawa tersebut adalah citropeptin dengan m/z (M+H)⁺ 1035,4 g/mol dan rumus molekul C₅₀H₈₂N₈O₁₅.

ABSTRACT: *Isolation of marine Actinomycetes producing an active secondary metabolite against A549 cancer cells. By: Rofiq Sunaryanto, Bambang Marwoto and Yoshihide Matsuo*

Isolation of marine Actinomycetes producing active secondary metabolite citropeptin, that is toxic against A549 lung cancer cells has been carried out. Isolation was carried out using starch casein agar medium added with cycloheximide and nystatin as antifungi, and also rifampicin and nalidixic acid as antibacterial. Marine sediment samples were obtained from the port of Kamaishi-shi Iwate, Japan at a depth of 5 meters. Seventy one isolates were obtained, but only 9 isolates showed activity against A549 cancer cells at concentration of 1 µg/200 µL. The further study showed that isolate RS02-85 was Streptomyces tsukubaensis (98% similarity). The identification of active compound using ESI-LCMS and ¹H NMR indicated that this compound was proposed to be citropeptin with a molecular weight of m/z (M+H)⁺ 1035.4 g/mol and molecular formula C₅₀H₈₂N₈O₁₅.

KEYWORDS: *marine Actinomycetes, citropeptin, Streptomyces tsukubaensis*

PENDAHULUAN

Penyakit kanker merupakan salah satu penyebab kematian terbesar di dunia (WHO, 2004). Di Eropa kanker paru-paru menempati urutan pertama penyebab kematian (Boyle & Ferlay, 2004). Di Indonesia penyakit kanker masuk dalam 6 urutan terbesar penyebab kematian, dan kanker paru-paru menempati urutan pertama penyebab kematian jika dibandingkan dengan penyakit kanker lainnya (DEPKES, 2006). Menurut Tjindarbumi & Mangunkusumo (2001), kasus penyakit kanker di Indonesia terus bertambah. Dari hasil penelitian, setiap 100.000 orang terdapat kasus baru penyakit kanker sebanyak 170–190 kasus.

Kebutuhan antibiotik dengan efektivitas tinggi sebagai antibakteri, antifungal, dan antikanker baru masih sangat diperlukan. Untuk mendapatkan antikanker baru, para peneliti telah banyak melakukan berbagai cara seperti eksplorasi senyawa dari bahan alam seperti mikroba, tanaman, dan hewan laut. Eksplorasi senyawa aktif dari mikroba biasanya

diisolasi dari jenis *Actinomycetes*, kapang, dan bakteri. *Actinomycetes* merupakan kelompok mikroba penghasil antibiotik dan antikanker terbanyak dibandingkan dengan kapang dan bakteri. Sekitar 70% antibiotik maupun antikanker yang telah ditemukan dihasilkan oleh *Actinomycetes*. Salah satu genus dari kelompok *Actinomycetes* yaitu *Streptomyces*, terbukti merupakan genus penghasil terbanyak antibiotik maupun antikanker (Alcamo, 1996). Hasil-hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa telah banyak senyawa aktif antikanker yang dihasilkan dari *Actinomycetes*. Sebagai contoh *actinofuranon*, antikanker kelompok poliketida yang dihasilkan oleh *Streptomyces* sp. CNQ766 (Cho *et al.*, 2006); arenamida, antikanker kelompok *non-ribosomal peptide* yang dihasilkan oleh *Salinispora arenicola* CNT-088 (Asolkar *et al.*, 2009); T-Murolol, antikanker kelompok isoprenoid yang dihasilkan oleh *Streptomyces* sp. M491 (Ding *et al.*, 2009); dan 3,6-disubstituted indoles, antikanker kelompok indol yang dihasilkan oleh *Streptomyces* sp. BL-49-58-005 (Zhang *et al.*, 2003).

¹⁾ Balai Pengkajian Bioteknologi BPPT, Kawasan PUSPIPTEK Serpong Tangerang Banten; E-mail: rofiqsn@yahoo.com

²⁾ Marine Biotechnology Institute, Heita, 026 Kamaishi-shi, Iwate, Japan

Indonesia mempunyai keragaman hayati khususnya perairan yang sangat besar, termasuk di dalamnya mikroba, tanaman maupun hewan. Kondisi wilayah Indonesia yang berbentuk kepulauan, maritim, dan iklim tropis yang mendukung, menjadikan Indonesia kaya akan keragaman hayati. Dua pertiga wilayah Indonesia merupakan daerah perairan. Menurut Kelecom (2002) biodiversitas mikroba laut jauh lebih besar dibandingkan dengan teritorial. Hal yang sama dikatakan oleh Das *et al.* (2006), bahwa populasi mikroba laut sangat bervariasi. Mikroba yang hidup di permukaan air laut, di dasar laut dalam, batu karang dasar laut, dan sedimen atau batu karang memiliki karakteristik yang bervariasi. Hal ini akan berpengaruh terhadap keragaman metabolit sekunder yang dihasilkan. Dengan demikian peluang untuk mendapatkan mikroba potensial yang mampu menghasilkan metabolit sekunder masih sangat besar.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan senyawa aktif dari *Actinomycetes* laut yang memiliki toksisitas terhadap sel kanker paru-paru A549 dan mengetahui rumus molekul dan struktur molekul senyawa aktif yang dihasilkannya.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan Sampel dan Preparasinya

Sampel berupa sedimen laut diperoleh dari pelabuhan Kamaishi-shi Iwate, Jepang pada kedalaman 5 meter. Sampel ditempatkan pada tabung *falcon* 15 mL, ditutup rapat, dan disimpan dalam ruang dingin (suhu 4°C) sebelum dilakukan proses isolasi.

Sebanyak 1 g padatan sampel dipisahkan air lautnya dengan cara didekantir. Kemudian 4 mL air demineral steril ditambahkan ke dalam sampel tersebut, diaduk selama 10 menit dan didiamkan sampai suspensi mengendap. Sebanyak 1 mL cairan sampel diambil dan diencerkan dengan air demineral steril sebanyak 4 mL, untuk dilakukan proses praperlakuan dengan cara pemanasan. Praperlakuan dengan cara panas dilakukan mengacu pada metode Pisano *et al.* (1986) yang dimodifikasi, yaitu dengan memanaskan 4 mL cairan sampel pada suhu 65°C selama 60 menit.

Cairan sampel yang telah mengalami praperlakuan selanjutnya diencerkan secara seri dari 10^{-1} sampai dengan 10^{-5} menggunakan air demineral steril. Selanjutnya 0,1 mL cairan sampel yang telah diencerkan disebarkan pada permukaan agar media isolasi. Komposisi media agar untuk isolasi adalah sebagai berikut: 10 g *soluble starch*, 2 g kasein, 4 g ekstrak yeast, dan 16 g agar dalam 1000 mL air laut. Ke dalam medium tersebut ditambahkan juga

beberapa jenis antijamur seperti 100 mg/mL *cycloheximide*, 25 mg/mL nistatin, 100 mg/mL antibakteri *nalidixic acid*, dan 5 mg/mL rifampisin yang bertujuan untuk menekan pertumbuhan bakteri dan jamur kontaminan. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 21 hari.

Persiapan Kultur Cair untuk Produksi Senyawa Aktif

Koloni yang telah dimurnikan ditumbuhkan pada medium *broth* YEME selama 2 hari pada suhu 30°C, dan ditransfer ke medium fermentasi dengan komposisi medium *bacto peptone* 15 g/L, ekstrak yeast 3 g/L, Fe(III) sitrat hidrat 0,3 g/L, air demineral 250 mL, dan air laut 750 mL, pH diatur pada 7,6. Fermentasi dilakukan selama 5 hari dengan inkubasi pada suhu 30°C. Volume kerja proses fermentasi adalah 1000 mL dalam labu 2000 mL. Volume kerja masal pada percobaan ini sebanyak 10 L.

Uji Toksisitas terhadap Sel A549 (*bioassay*)

Sel A549 yang merupakan sel kanker paru-paru manusia (*Human Lung Cancer Cell*) dikulturkan dalam medium *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) yang mengandung 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS). Sel didistribusikan ke 96-well *microplate* (4.000 sel/200 mL/sumur) dan selanjutnya diinkubasi dalam inkubator CO₂ (5% CO₂-udara, 37°C) selama 14 jam. Sampel uji (dalam pelarut metanol) dengan konsentrasi 1 µg/200 µL ditambahkan ke setiap sumur, masing-masing 5 mL kecuali blanko yang hanya ditambahkan 5 mL pelarut metanol. Sel dikulturkan selama 48 jam dalam inkubator CO₂ (Freshney, 2006). Jumlah sel yang hidup dihitung dengan metode Alamar Blue (Nasiry *et al.*, 2007).

Semua tahapan pemisahan dan purifikasi akan dipandu dengan uji toksisitas terhadap A549 untuk menentukan fraksi ataupun fase mana yang memiliki toksisitas. Fraksi aktif selanjutnya dipilih dan digunakan pada tahap berikutnya.

Pemisahan dan Pemurnian Senyawa Aktif dari *Broth* Fermentasi

Biomasa dan *broth* fermentasi dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 14000 x g selama 15 menit. Sepuluh L supernatan yang berwarna coklat tua diekstraksi menggunakan etil asetat dengan perbandingan etil asetat : air (1:1). Selanjutnya fase etil asetat dipisahkan dengan menggunakan corong pemisah dan fase air diekstraksi kembali dengan etil asetat dengan perbandingan volume yang sama. Kedua ekstrak etil asetat digabungkan dan dipekatkan dalam kondisi vakum.

Ekstrak yang sudah dipekatkan selanjutnya difraksinasi menggunakan kolom kromatografi (f 25 x 500 mm), dengan fase diam silika gel 60 (0,063-0,200mm) Merck dan fase gerak adalah campuran metanol-kloroform, dengan elusi gradien bertahap menggunakan 0–100% metanol/kloroform. Sebanyak 40 fraksi dikumpulkan dan diuji (*bioassay*) terhadap sel kanker A549 untuk menentukan fraksi mana yang memiliki toksisitas.

Fraksi aktif dimurnikan kembali menggunakan HPLC preparatif. HPLC preparatif dilakukan dengan menggunakan HPLC Waters 2695, dengan Photodiode Detector Array (PDA), Waters Column Puresil 5m C18 4,6 x 150 mm, volume injeksi 100 µL/ injeksi dengan kecepatan alir 1 mL/menit, dan tekanan kolom 1350 psi. Konsentrasi sampel yang diinjeksikan adalah sebesar 5000 µg/mL. Semua fraksi hasil pemurnian dengan HPLC preparatif dikumpulkan dan diuji (*bioassay*) terhadap sel kanker A549. Fraksi aktif murni dikumpulkan dan ditentukan bobot dan struktur molekulnya menggunakan ESI-LCMS dan ¹HNMR.

Elusidasi Struktur Kimia Senyawa Aktif

Bobot molekul dan rumus molekul senyawa aktif ditentukan dengan ESI-LCMS Jeol JMS-SX102A. Struktur molekul senyawa ditentukan dengan ¹HNMR (Varian UNITY INOVA 750).

Analisis Sekuen Gen 16S rRNA

Analisis sekuen gen 16S rRNA dilakukan di Laboratorium Teknologi Gen Marine Biotechnology

Institute (MBI) Kamaishi-shi, Jepang. Analisis *bioinformatics* pencarian kemiripan sekuen dilakukan dengan program BLASTN yang terdapat di NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

HASIL DAN BAHASAN

Pengambilan sampel pada tahap isolasi *Actinomyces* dilakukan di beberapa titik di Pelabuhan Kamaishi, Iwate, Jepang. Sampel yang telah mengalami praperlakuan dikulturkan dalam media *starch casein* agar dan diinkubasi sampai koloni *Actinomyces* tumbuh. Dari 20 sampel sedimen laut yang diambil diperoleh 71 isolat *Actinomyces*. Dari 71 isolat yang diperoleh, terdapat 9 isolat memiliki toksisitas kuat terhadap sel kanker A549. Adapun 9 isolat yang menunjukkan toksisitas yang kuat terhadap sel kanker A549 mampu membunuh sel kanker lebih dari 50%. Hasil identifikasi menggunakan 16S rRNA dan toksisitas isolat terhadap sel kanker A549 disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1 menunjukkan bahwa ada 9 isolat *Actinomyces* yang memiliki toksisitas tinggi (lebih dari 50%) terhadap sel kanker A549. Isolat RS02-085 memiliki toksisitas paling tinggi yaitu sebesar 98%, yang selanjutnya diikuti oleh isolat RS02-044, RS02-032, RS02-019, RS02-041, RS02-012, RS02-024, RS02-062, dan RS02-034. Isolat yang memiliki toksisitas terhadap sel kanker A549 sebagian besar berasal dari genus *Streptomyces*. Seperti diketahui bahwa *Streptomyces* merupakan salah satu genus dari *Actinomyces* yang paling banyak menghasilkan

Tabel 1. Isolat *Actinomyces* laut yang memiliki toksisitas terhadap sel kanker A549
Table 1. Marine *Actinomyces* isolate having toxicity activity against Cancer cell A549

Kode Isolat/ Isolates Code	Identitas/ Identity (%)	Kemiripan/ Similarity	No. Akses/ Access Number	Toksisitas Jumlah Sel Kanker A549 yang Mati (%)*/Toxicity The Number of Dead Cancer Cells A549 (%)*
RS02-085	98	<i>Streptomyces</i> <i>sukubaensis</i>	4TS2861S01S	98
RS02-062	100	<i>Streptomyces</i> <i>bacterium</i> CNQ732	4TSPMVK016	75
RS02-044	100	<i>Streptomyces</i> <i>albidoflavus</i> (DSM 46452)	4TUGWEMR01S	90
RS02-041	99	<i>Streptomyces</i> sp. BR57	4TUXJBM401S	85
RS02-034	99	<i>Streptomyces</i> sp. 1A01554	4TV4CBR401S	65
RS02-032	99	<i>Micromonospora</i> <i>halophytica</i>	4TVB30P1016	87
RS02-024	99	<i>Streptomyces</i> sp. CNQ-525	4TVCW8XT01S	76
RS02-019	99	<i>Streptomyces</i> sp. 3490	4TVEUEV501N	86
RS02-012	99	<i>Streptomyces</i> <i>cinnamomensis</i>	4TVGUDCV01N	85

Keterangan/Note: (*) = Konsentrasi sampel adalah sebesar 1 µg/200 µL setiap sumur/
Sample concentration was 1 µg/200 µL each well microplate

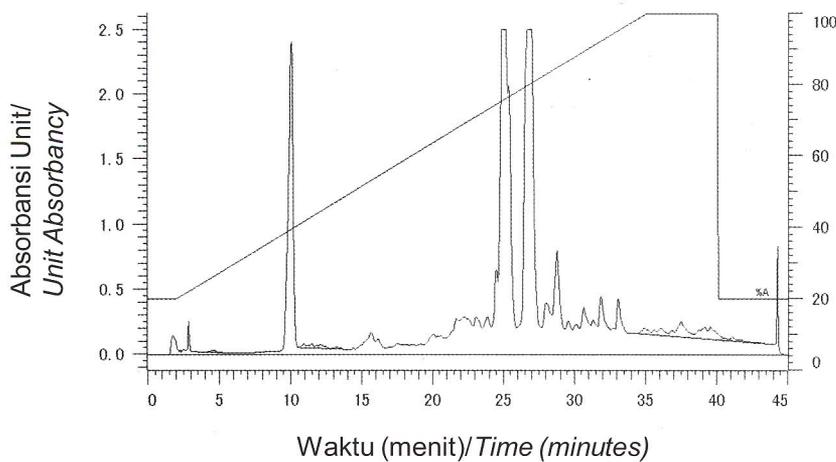
antibiotik, antikanker, maupun immunosupresan dibandingkan genus lainnya (Alcamo, 1996).

Hasil identifikasi menggunakan 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat RS02-085 memiliki kemiripan terhadap *Streptomyces tsukubaensis* sebesar 98%. *S. tsukubaensis* dikenal mampu menghasilkan senyawa aktif immunosupresan FK506 (Tanaka *et al.*, 1987).

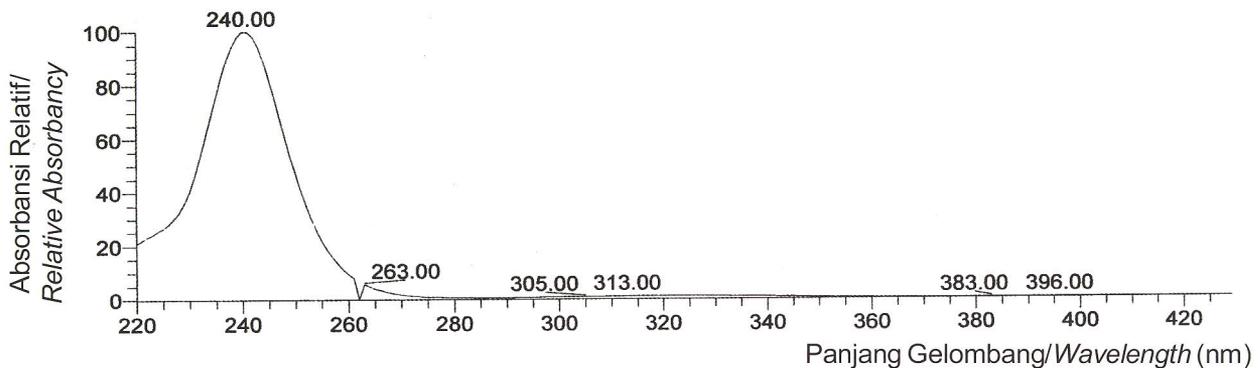
Berdasarkan hasil uji *bioassay* terhadap sel kanker A549, selanjutnya dipilih isolat yang paling kuat toksisitasnya terhadap sel kanker A549. Isolat RS02-085 yang memiliki toksisitas paling tinggi dipilih sebagai isolat untuk penelitian lebih lanjut. Hasil produksi secara kultur cair isolat RS02-085 menggunakan medium yeast-pepton menghasilkan ekstrak kering sebesar 0,35 g dan ekstrak dari sel (biomassa) sebesar 3,15 g. Namun demikian dari hasil uji aktivitas, ekstrak sel (biomassa) tidak

menunjukkan sitotoksitas, dengan demikian pemurnian lebih lanjut hanya dilakukan untuk ekstrak supernatan saja. Hasil analisis menggunakan HPLC (Gambar 1) menunjukkan bahwa ekstrak supernatan memiliki beberapa puncak yang muncul pada rentang waktu retensi 10 sampai dengan 35 menit, yaitu 3 puncak besar pada waktu retensi 10, 25, dan 27 menit, serta beberapa puncak kecil pada rentang waktu retensi 28 sampai dengan 35 menit. Dari hasil pemurnian menggunakan kromatografi kolom dan HPLC preparatif diperoleh senyawa aktif tunggal.

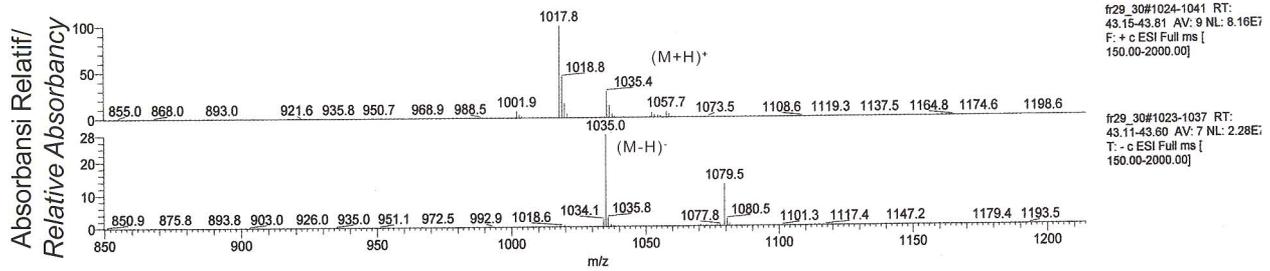
Senyawa aktif ini memiliki serapan panjang gelombang maksimum pada 240 nm seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2. Serapan pada panjang gelombang 240 nm umumnya adalah senyawa yang tidak berwarna atau berwarna putih. Hal yang sama ditunjukkan oleh senyawa aktif hasil pemurnian pada percobaan ini yang menunjukkan warna putih.



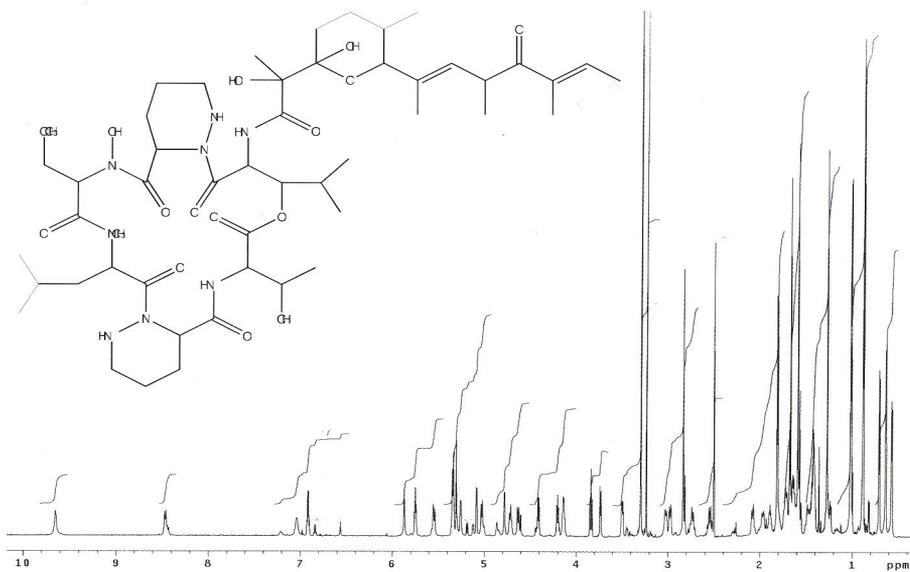
Gambar 1. Kromatogram HPLC ekstrak supernatan isolat RS02-085.
 Figure 1. HPLC chromatogram of supernatant extract of RS02-085 isolate.



Gambar 2. Serapan panjang gelombang maksimum senyawa aktif yang dihasilkan oleh isolat RS02-85.
 Figure 2. Maximum wavelength absorption of the active compound produced by RS02-85 isolate.



Gambar 3. Spektrum LC-MS senyawa aktif yang dihasilkan oleh isolat RS02-085.
Figure 3. LC-MS spectrum of active compound produced by RS02-085 isolate.



Gambar 4. Spektrum ^1H NMR senyawa aktif yang dihasilkan oleh isolat RS02-085 dan struktur molekul senyawa aktif yang dihasilkan oleh isolat RS02-085.
Figure 4. ^1H NMR Spectrum of active compound produced by RS02-085 isolate and molecular structure of active compound produced by RS02-085.

Hasil analisis menggunakan LC-MS menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki bobot molekul 1036,0 g/mol dengan rumus molekul $\text{C}_{50}\text{H}_{82}\text{N}_8\text{O}_{15}$. Spektrum LC-MS senyawa aktif yang dihasilkan oleh isolat RS02-085 disajikan dalam Gambar 3.

Hasil penelusuran referensi memberikan informasi bahwa senyawa ini mirip dengan citropeptin yang telah ditemukan sebelumnya oleh Hayakawa *et al.*, 1990. Senyawa yang ditemukan oleh Hayakawa *et al.*, 1990 dihasilkan oleh strain K3619 yang teridentifikasi sebagai *Streptomyces flavidovirens*. Isolat K3619 diperoleh dari sampel tanah di Brazil. Konformasi struktural citropeptin yang ditemukan oleh Hayakawa *et al.* (1990) diperjelas dalam Nakagawa *et al.* (1990). Menurut Hayakawa *et al.* (1990) citropeptin yang

diproduksi oleh *S. flavidovirens* memiliki aktivitas antikanker terhadap sel kanker P388 murine leukemia.

Hasil analisis menggunakan ^1H NMR menunjukkan kesamaan pola spektrum dari senyawa aktif yang dihasilkan oleh isolat RS02-085 dengan citropeptin yang ditemukan oleh Hayakawa *et al.* (1990). Spektrum ^1H NMR senyawa aktif yang dihasilkan oleh isolat RS02-085 dan struktur molekul senyawa aktif yang dihasilkan oleh isolat RS02-085 yang diduga sebagai citropeptin disajikan dalam Gambar 4.

KESIMPULAN

Telah diperoleh 9 isolat *Actinomycetes* laut yang memiliki toksisitas terhadap sel kanker paru-paru

A549. Isolat RS02-085 merupakan isolat yang paling tinggi toksisitasnya terhadap sel kanker A549. Hasil identifikasi menggunakan 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat RS02-85 memiliki kemiripan dengan *Streptomyces tsukubaensis* 98%. Hasil studi lebih lanjut menunjukkan bahwa senyawa aktif yang dihasilkan oleh isolat RS02-085 diduga adalah citropeptin dengan rumus molekul $C_{50}H_{82}N_8O_{15}$, bobot molekul sebesar 1036,0 g/mol, dengan serapan panjang gelombang maksimum sebesar 240 nm.

DAFTAR PUSTAKA

- Alcamo, E. 1996. *Fundamental of Microbiology*. 4th ed Addison Wesley Longman, Inc. California
- Asolkar, R.N., Freel, K.C., Jensen, P.R., Fenical, W., Kondratyuk, T.P., Park, E.J., and Pezzuto, J.M. 2009. Arenamides A-C, cytotoxic NFkappaB inhibitors from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *J. Nat. Prod.* 72(3): 396–402.
- Boyle, P. and Ferlay, J. 2004. Cancer incidence and mortality in Europe. *Ann. Oncol.* 16(3): 481–488.
- Cho, J.Y., Kwon, H.C., Williams, P.G., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., and Fenical, W. 2006. Actinofuranones A and B, polyketides from a marine-derived bacterium related to the genus *Streptomyces* (actinomycetales). *J. Nat. Prod.* 69(3): 425–428.
- Das, S., Lyla, P.S., and Khan, S.A. 2006. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspective. *Curr. Sci.* 90(10):1325–1335
- DEPKES. 2006. <http://www.litbang.depkes.go.id/aktual/kliping/kankerparu010306.htm>. Diakses pada tanggal 3 November 2010.
- Ding, L., Pfoh, R., Rühl, S., Qin, S., and Laatsch, H. 2009. T-muurolol sesquiterpenes from the marine *Streptomyces* sp. M491 and revision of the configuration of previously reported amorphanes. *J. Nat. Prod.* 72(1): 99–101.
- Freshney, R.I. 2006. Basic principles of cell culture. In Vunjak-Novakovic, G. and Freshney, R.I. (eds.). *Culture of Cells for Tissue Engineering*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Hayakawa, Y., Nakagawa, M., Toda, Y., and Seto, H. 1990. A new depsipeptide antibiotic, citropeptin. *Agric. Biol. Chem.* 54(4): 1007–1011.
- Kelecom, A. 2002. Secondary metabolites from marine microorganisms. *An. Acad. Bras. Cienc.* 74(1): 151–170.
- Nakagawa, M., Hayakawa, Y., Furihata, K., and Seto, H. 1990. Structural studies on new depsipeptide antibiotics, variapeptin and citropeptin. *J. Antibiot.* 43: 477–484.
- Nasiry, S.A., Geusens, N., Hanssens, M., Luyten., and Pijnenborg, R. 2007. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum. Reprod.* 10: 1–6.
- Pisano, M.A., Michael, J.S., and Madelyn, M.L. 1986. Application of pretreatments for the isolation of bioactive *Actinomycetes* from marine sediments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 285–288.
- Tanaka, H., Kuroda, A., Marusawa, H., Hatanaka, H., Kino, T., Goto, T., Hashimoto, M., and Taga, T. 1987. Structure of FK506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces*. *J. Am. Chem. Soc.* 109: 5031–5003.
- Tjindarbumi, D. and Mangunkusumo, R. 2001. Cancer in Indonesia, Present and Future. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 32: (supplement 1) s17–s21.
- WHO, 2004. Cancer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Diakses pada tanggal 3 November 2010
- Zhang, Q., Schrader, K.K., ElSohly, H.N., and Takamatsu, S. 2003. New cell-cell adhesion inhibitors from *Streptomyces* sp. UMA-044. *J. Antibiot.* 56: 673–681.