

ISOLASI SENYAWA SITOTOKSIK DARI SPONS *Crella papilata*

Muhammad Nursid^{*)}, Nurrahmi Dewi Fajarningsih^{*)}, Hedi Indra Januar^{*)}, dan Ariyanti Suhita Dewi^{*)}

ABSTRAK

Penelitian isolasi senyawa sitotoksik dari spons *Crella papilata* telah dilakukan. Spons *Crella papilata* diambil dari Taman Nasional Kepulauan Seribu. Ekstraksi senyawa sitotoksik dilakukan dengan metode maserasi menggunakan metanol dan ekstrak kasar yang dihasilkan difraksinasi dengan kromatografi kolom fase balik. Pemisahan lebih lanjut dilakukan dengan kromatografi kolom fase normal dengan eluen campuran n-heksana/EtOAc (etil asetat) dan EtOAc/MeOH (etil asetat/metanol) secara gradien. Fraksi yang paling aktif diisolasi dengan kromatografi lapis tipis preparatif dan diidentifikasi dengan ¹H NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) dan LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrophotometry*). Interpretasi terhadap data spektra yang dihasilkan memperlihatkan bahwa senyawa bioaktif tersebut merupakan golongan tiol yang mengandung cincin aromatik serta alkil sebagai gugus samping dengan berat molekul sebesar 291. Uji MTT [*3-(4,5 dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromida*] menunjukkan bahwa senyawa bioaktif ini memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dan sel Skov3 dengan nilai IC₅₀ berturut-turut sebesar 14,7 ppm dan 10,9 ppm.

ABSTRACT: *Isolation of cytotoxic compound of Crella papilata sponge. By: Muhammad Nursid, Nurrahmi Dewi Fajarningsih, Hedi Indra Januar and Ariyanti Suhita Dewi*

Research on the isolation of cytotoxic compound of *Crella papilata* sponge has been conducted. The *Crella papilata* sponge was taken from Kepulauan Seribu National Park. The extraction of the bioactive compound was conducted by macerating the sponge with methanol and the resulted crude extract was fractionated by using reversed phase column chromatography. Further separation of bioactive compound was performed by means of normal phase column and gradient mixture of n-hexane/EtOAc (ethyl acetat) and EtOAc/MeOH (ethyl acetat/methanol). The most active fraction was isolated by using preparative thin layer chromatography and identified by ¹H NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) and LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrophotometry*). Interpretation of the spectra data showed that the compound is a thiol bearing aromatic rings and alkyl as side groups with molecular weight of 291. The MTT [*3-(4.5 dimethylthiazol-2yl)-2.5-diphenyl tetrazolium bromida*] assay demonstrated that the bioactive compound exhibited cytotoxic activity against HeLa and Skov3 cell lines with IC₅₀ of 14.7 ppm and 10.9 ppm, respectively.

KEYWORDS: *isolation, cytotoxic compound, Crella papilata*

PENDAHULUAN

Invertebrata laut seperti spons dan karang lunak (*soft coral*) merupakan kelompok hewan yang bersifat menetap (sesil). Kelompok invertebrata laut lainnya memiliki pergerakan yang sangat lambat (*slow moving*) misalnya moluska dan ascidian. Banyak dari hewan ini yang memiliki tubuh lunak (*soft bodies*) sehingga menjadi target mangsa bagi predator. Kelompok hewan ini secara umum tidak memiliki perlindungan diri secara fisik misalnya berupa duri, cangkang atau gerakan yang cepat. Untuk melindungi diri dari serangan predator, hewan-hewan ini umumnya mampu mensintesis senyawa toksik ataupun senyawa penahan (*deterrent compound*) (Ebada *et al.*, 2008). Kelompok hewan ini secara umum ditemukan pada ekosistem terumbu karang. Henkel

& Pawlik (2005) menyatakan bahwa ekosistem terumbu karang ditandai dengan tingginya tingkat pemangsaan dan kompetisi spasial antar anggota komunitas karena terbatasnya ruang sehingga senyawa toksik ini juga berguna sebagai sarana diri untuk berkompetisi dengan organisme lainnya.

Menurut Ebada *et al.* (2008), senyawa bioaktif dari invertebrata laut dengan mudah terencerkan segera setelah dilepas ke dalam air sehingga untuk dapat berperan sebagai senyawa *deterrent* terhadap kompetitor, senyawa ini harus memiliki efek yang kuat dalam konsentrasi yang sangat kecil. Berdasarkan hal ini ditambah dengan fakta bahwa lingkungan laut memiliki diversitas yang tinggi, maka cukup beralasan jika dikatakan bahwa lingkungan laut merupakan sumber senyawa bioaktif yang sangat potensial

^{*)} Peneliti pada Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, DKP

sebagai bahan obat. Senyawa bioaktif tersebut banyak dijadikan sebagai senyawa penuntun (*lead compound*) dan inspirasi dalam sintesis senyawa karena model dan struktur kimianya sangat unik, misalnya *discodermolide* yang saat ini digunakan sebagai senyawa penuntun dalam program pencarian obat secara kimia (Faulkner, 2000; Proksch *et al.*, 2003). Saat ini menurut Maxwell *et al.* (2005), *discodermolide* yang diisolasi dari spons *Discodermia dissolute* telah lulus uji klinis tahap I dan memiliki aktivitas melebihi Taxol®. Senyawa bioaktif lain yaitu *ecteinascidin 743* (ET-743) yang diisolasi pertama kali dari ascidia *Ecteinascidin turbinata* telah dipasarkan dengan nama Yondelis®. Yondelis sekarang ini sudah diterima di Uni Eropa untuk terapi *sarcoma* pada jaringan lunak (Sashidhara *et al.*, 2009).

Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan telah melakukan penelitian untuk mengeksplorasi kandungan senyawa bioaktif dari invertebrata laut, salah satunya adalah penelitian ekstraksi dan pengujian bioaktivitas spons *Crella papilata* yang dilakukan oleh Fajarningsih *et al.* (2006). Hasil penelitian tersebut memperlihatkan bahwa ekstrak kasar spons *C. papilata* memiliki penghambatan yang baik terhadap proliferasi sel HeLa dan Mieloma dengan IC_{50} berturut-turut sebesar 12,06 ppm dan 18,91 ppm. Namun penelitian tersebut tidak sampai kepada kegiatan fraksinasi dan isolasi senyawa bioaktif dari spons *C. papilata* sehingga belum diketahui fraksi mana yang memiliki aktivitas sitotoksik. Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi senyawa sitotoksik yang terkandung dalam spons *C. papilata*.

METODE

Fraksinasi dan Isolasi

Spons *C. papilata* diambil dari perairan Taman Nasional Kepulauan Seribu pada bulan Mei tahun 2005. Ekstraksi spons *C. papilata* dilakukan seperti yang telah dilaporkan oleh Fajarningsih *et al.* (2006).

Fraksinasi dan isolasi senyawa metabolit sekunder dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis (KLT) preparatif. Uji hayati (*bioassay*) yang digunakan sebagai pemandu isolasi adalah uji sitotoksik metode 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay (MTT assay) menurut metode Zachary (2003). Ekstrak kasar yang diperoleh difraksinasi dengan kolom kromatografi C_{18} 2 x 30 cm dan dielusi dengan metanol : air (7:3), metanol 100%, dan diklorometan (DCM) 100%, secara berturut-turut sehingga diperoleh 3 fraksi. Fraksi yang aktif kemudian difraksinasi lebih

lanjut dengan kolom kromatografi silika gel 2 x 30 cm. Elusi dimulai dari heksan : etil asetat (9:1) – etil asetat–metanol secara gradien. Fraksi yang memiliki aktivitas sitotoksik paling kuat dipurifikasi dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) preparatif dengan fase diam silika gel dan fase gerak diklorometan : metanol (5:1). Sub fraksi yang diperoleh kemudian dianalisis secara spektroskopik dengan menggunakan LC-PDA-MS (Shimadzu, kolom Shimadzu ODS, 150 x 2 mm) dan ¹H NMR (JEOL, 500 Mhz).

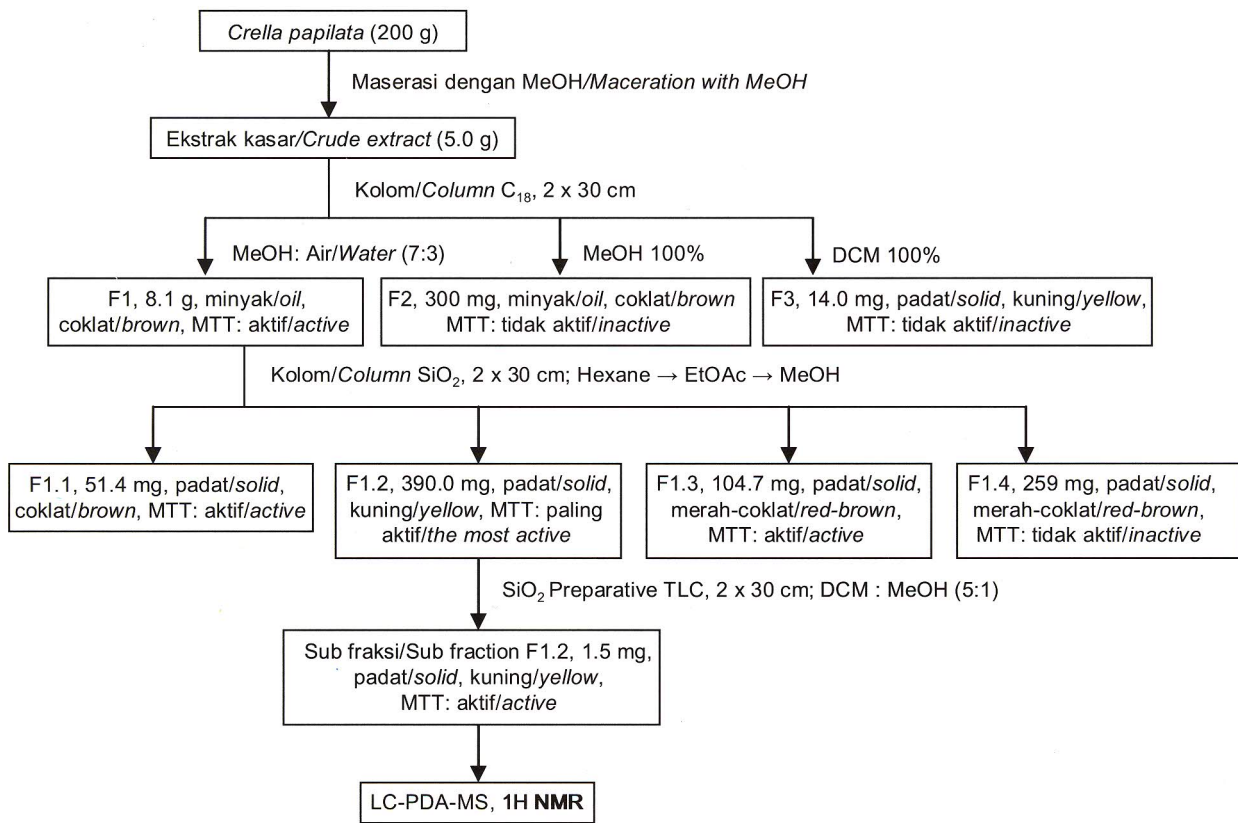
Uji Sitotoksik Metode MTT

Sel tumor yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel HeLa (kanker serviks) dan Skov3 (kanker mulut rahim). Sel-sel tersebut dikultur dalam medium *Roswell Park Memorial Institut* (RPMI) 1640 (Sigma), *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% (Gibco), fungison 0,5% (Gibco) dan penisilin-streptomisin 2% (Gibco).

Ekstrak spons *C. papilata* dibuat dengan dosis 20 µg/mL. Dosis ini digunakan secara tetap pada setiap tahapan fraksinasi untuk mengetahui fraksi-fraksi yang aktif. Setelah diperoleh isolat yang aktif maka uji sitotoksik dilakukan dengan menggunakan seri dosis 4, 8, 16, dan 32 ppm. Suspensi sel yang berjumlah $10^5/100$ µL dimasukkan ke dalam *microplate* 96 well dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C dengan aliran CO₂ 5 mL/menit. Setelah 24 jam, ekstrak spons dimasukkan ke dalam *microplate* sebanyak 100 µL. Dalam pengujian ini digunakan 3 jenis kontrol yaitu kontrol sel (100 µL sel + 100 µL media), kontrol sampel (100 µL sampel + 100 µL media), dan kontrol media (200 µL media). *Microplate* diinkubasi kembali selama 24 jam dalam inkubator CO₂. Setelah 24 jam ditambahkan MTT sebanyak 10 µL ke dalam tiap sumuran. *Microplate* diinkubasi kembali pada inkubator CO₂. Setelah 4 jam, ditambahkan 100 µL Sodium Dodesil Sulfat (SDS) 10% untuk melarutkan kristal formazan yang terbentuk. *Microplate* diinkubasi kembali selama 12 jam pada suhu kamar (28–30°C). Absorbansi tiap sumuran dibaca dengan *Dynex microplate reader* pada panjang gelombang 570 nm. Persentase penghambatan sel tumor dihitung berdasarkan rumus $(A-D)-(B-C)/(A-D) \times 100\%$ di mana A = absorbansi kontrol sel, B = absorbansi sampel, C = absorbansi kontrol sampel dan D = absorbansi kontrol media. Nilai *inhibition concentration*₅₀ (IC_{50}) dihitung dengan analisis probit.

HASIL DAN BAHASAN

Diagram isolasi senyawa sitotoksik dari spons *C. papilata* disajikan pada Gambar 1. Fraksinasi tahap awal dilakukan dengan kolom C_{18} ukuran 2 x 30 cm dengan menggunakan eluen MeOH : H₂O (7:3), MeOH 100%, dan DCM 100%. Diharapkan dengan

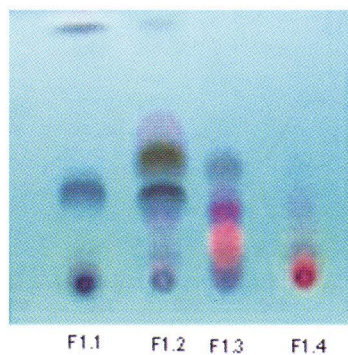


Gambar 1. Diagram isolasi senyawa sitotoksik dari spons *C. papilata*.
 Figure 1. Isolation scheme of cytotoxic compound of *C. papilata* sponge.

menggunakan tiga jenis sistem pelarut tersebut senyawa-senyawa yang terdapat pada ekstrak kasar *C. papilata* akan terelusi dari yang paling polar kemudian secara bertahap senyawa-senyawa kurang polar termasuk golongan asam-asam lemak yang akan terelusi pada fase gerak MeOH 100% dan DCM 100%.

Hasil uji sitotoksik pada dosis 20 ppm dengan menggunakan sel HeLa memperlihatkan bahwa fraksi nomor 1 (F1) merupakan fraksi yang paling aktif dengan persentase penghambatan sel HeLa sebesar 93,4% diikuti dengan fraksi MeOH (38,7 %) dan fraksi DCM (20,0%). Berdasarkan hal ini maka dapat

disimpulkan bahwa senyawa sitotoksik yang terdapat pada spons *C. papilata* merupakan golongan senyawa polar karena terelusi dengan pelarut yang sangat polar (MeOH : H₂O = 7:3). Fraksi F1 kemudian difraksinasi dengan kolom SiO₂ 2 x 30 cm dengan menggunakan eluen heksana : etil asetat (7:3) – etil asetat – metanol secara gradien. Hasil fraksinasi sebanyak 18 buah tabung kemudian digabung berdasarkan spot-spot KLT sehingga diperoleh 4 fraksi (fraksi F1.1, F1.2, F1.3 dan F1.4) (Gambar 2). Hasil uji sitotoksik menunjukkan bahwa fraksi yang paling aktif adalah fraksi F1.2.



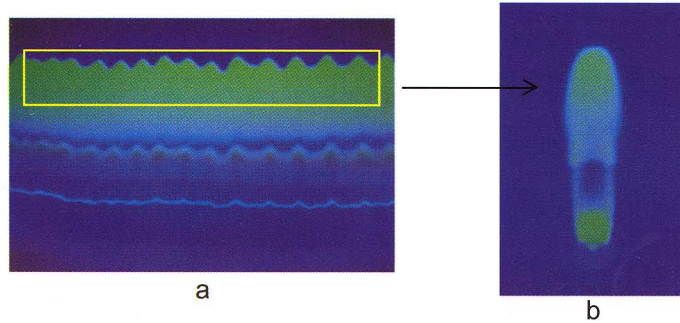
Gambar 2. Kromatogram fraksi F1 dengan fase gerak DCM : MeOH (5:1).
 Figure 2. Chromatogram of F1 fraction with mobile phase DCM : MeOH (5:1).

Senyawa sitotoksik yang terdapat pada fraksi F1.2 tersebut lalu diisolasi dengan menggunakan KLT preparatif dengan fase diam silika gel 20 x 30 cm dan fase gerak diklorometan : metanol = 5:1. Hasil KLT preparatif menunjukkan adanya spot utama berwarna kuning (Gambar 3).

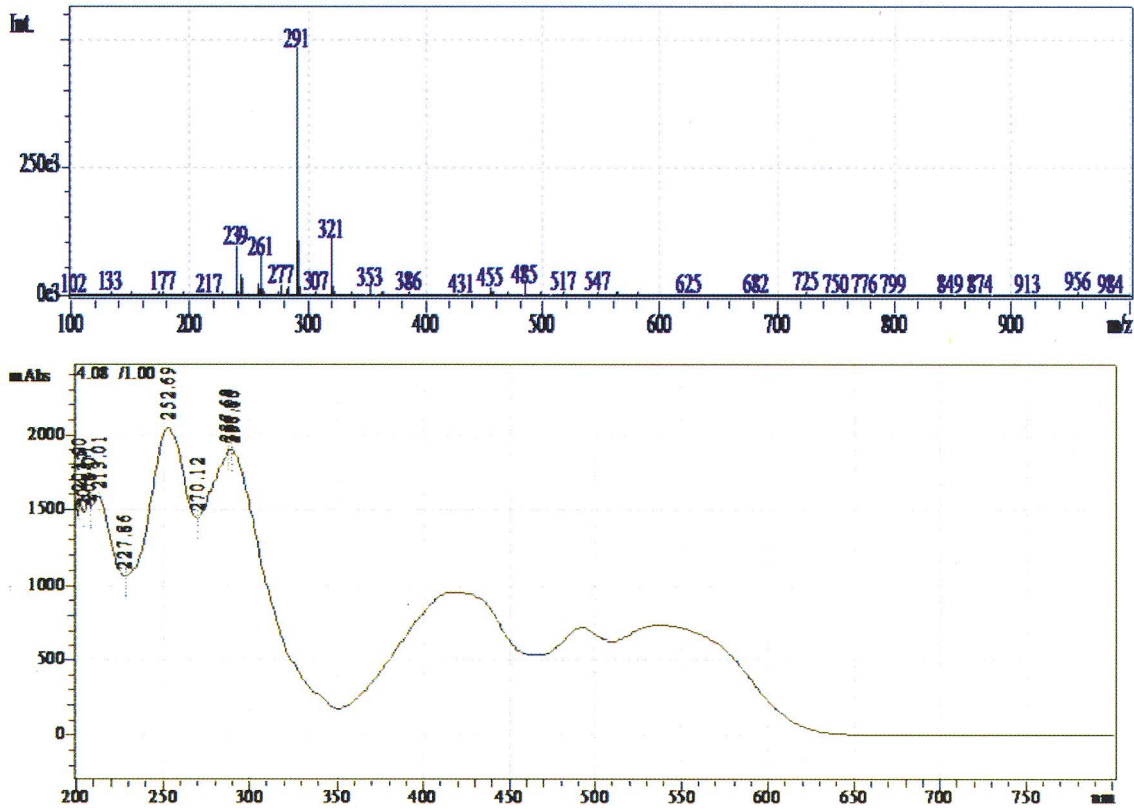
Isolat yang diperoleh kemudian dianalisis dengan LCMS dengan fase gerak 80% H₂O gradien 100% asetonitril menggunakan kolom *Shimadzu* ODS, 150 x 2 mm. Dari data spektra massa hasil analisis LCMS terhadap isolat tersebut, terdapat ion massa

m/z 291. Isolat ini memiliki serapan UV optimum pada 235 dan 375 nm (Gambar 4).

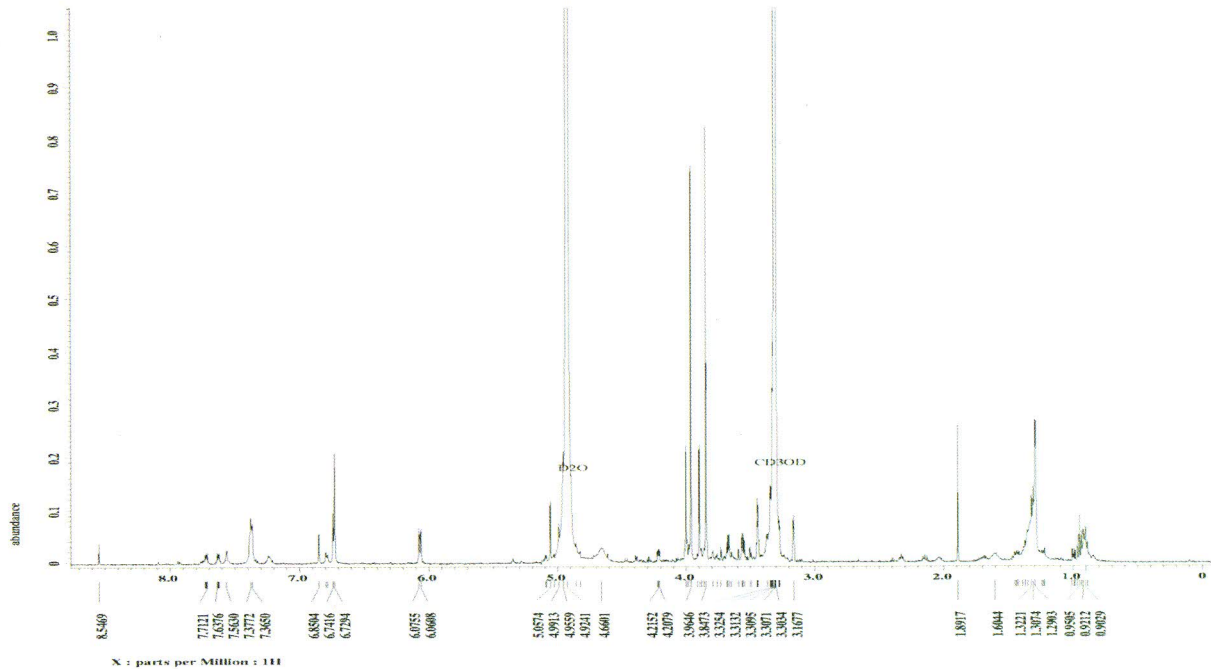
Hasil analisis NMR (Gambar 5) dari isolat yang aktif menunjukkan adanya serapan pada geseran kimia (δ) 3-5 ppm yang mengindikasikan bahwa senyawa aktif yang terkandung dalam isolat termasuk dalam golongan tiol (merkaptan). Hal ini didukung oleh data spektrofotometri UV yang menunjukkan serapan maksimal pada λ 252 nm yang berasal dari transisi $\rightarrow\sigma^*$ dari ikatan C-S. Fragmentasi pada data spektroskopi massa dari (M-H)⁺ 291 ke 259



Gambar 3. KLT preparatif fraksi F1.2 (a) dan spot isolat dari KLT preparatif (b).
Figure 3. Preparative TLC of F1.2 fraction (a) and preparative TLC spots of the isolate (b).



Gambar 4. Spektra massa (atas), dan serapan UV (bawah) senyawa aktif dalam fraksi F1.2.
Figure 4. Mass spectra (upper) and UV absorbance (lower) of active compound of F1.2 fraction.



Gambar 5. Spektra 1H NMR senyawa aktif.
Figure 5. 1H NMR spectra of active compound.

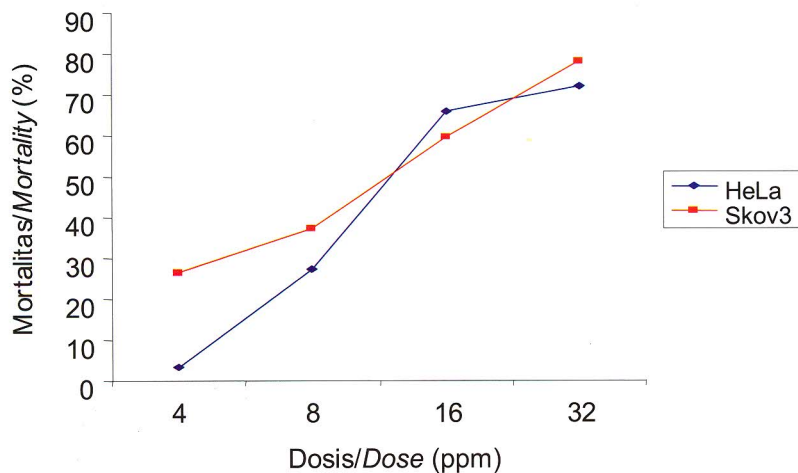
menunjukkan adanya pelepasan ion sulfur pada gugus tiol. Adanya cincin aromatis pada senyawa aktif ditunjukkan oleh serapan NMR pada δ 7-8 ppm, sedangkan serapan pada δ 1-2 ppm mengindikasikan adanya gugus samping alkil.

Hasil penelusuran pustaka menunjukkan bahwa spons *Crella* yang diambil dari perairan Vanuatu mengandung senyawa crelastatin yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel NSCLC-N6 (*lung cancer*) dengan IC_{50} sebesar 1,5 ppm (D'Auria *et al.*, 1998). Laporan lain juga menyebutkan bahwa spons dari genera yang sama mengandung senyawa sitotoksik crelastatin B – H (Zampella *et al.*, 1999).

Sementara itu spons dari jenis *Crella spinulata* yang diambil dari Great Barrier Reef, Australia, mengandung senyawa metabolit sekunder *benzylthiocrellidone* yang digunakan oleh spons tersebut untuk melindungi diri dari radiasi sinar UV (Lam *et al.*, 1999).

Uji Sitotoksik Terhadap Fraksi Aktif

Uji sitotoksik dilakukan dengan menggunakan 2 jenis sel tumor yaitu sel HeLa dan sel Skov3. Seri dosis yang digunakan untuk uji ini adalah 4, 8, 16, dan 32 ppm. Grafik penghambatan sel HeLa dan Skov3 setelah diberi perlakuan F1.2 selama 24 jam disajikan pada Gambar 6. Dari Gambar 6 dapat dilihat bahwa



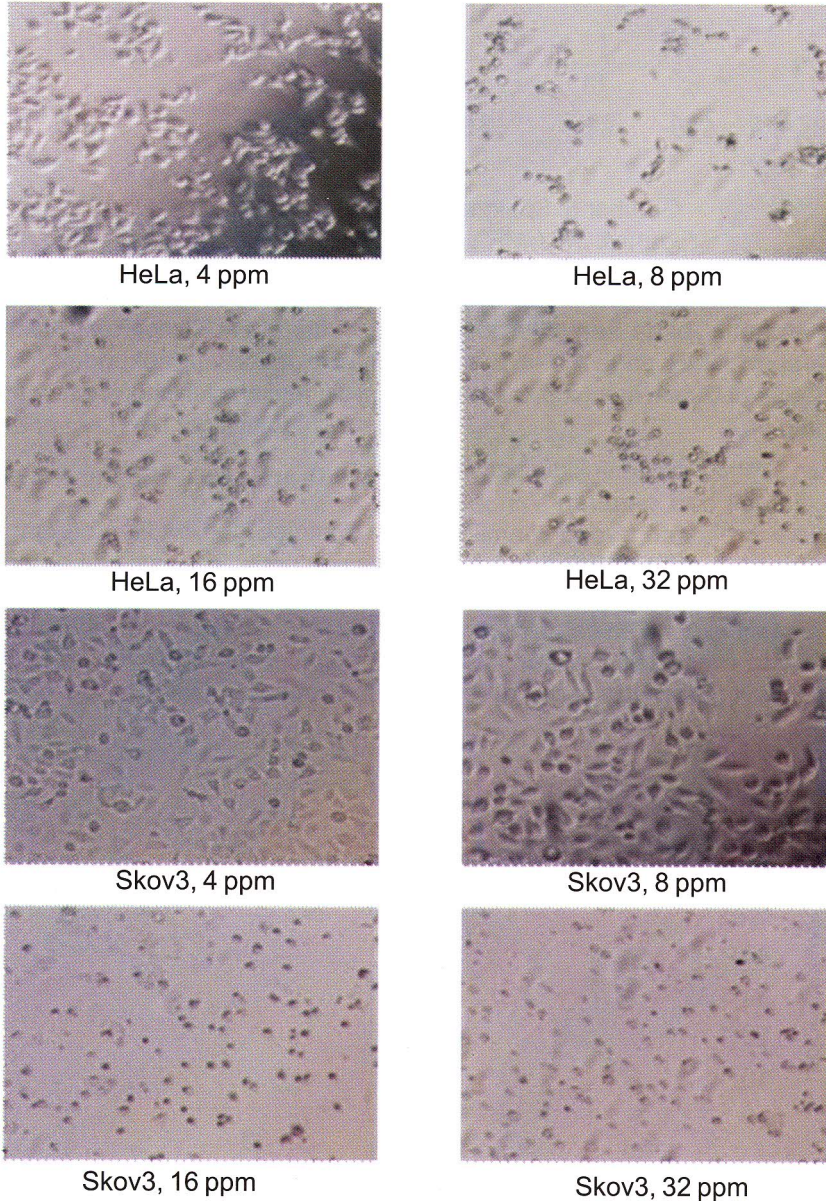
Gambar 6. Penghambatan sel HeLa dan Skov3 setelah diberi perlakuan fraksi F1.2 selama 24 jam.
Figure 6. Inhibition of HeLa and Skov3 cells after being treated with F1.2 fraction during 24 hours.

penghambatan sel HeLa dan Skov3 semakin meningkat dengan naiknya dosis fraksi F1.2 yang diberikan. Hasil analisis probit menunjukkan bahwa nilai IC_{50} sub fraksi aktif terhadap sel HeLa sebesar 14,7 ppm dan terhadap sel Skov3 sebesar 10,9 ppm.

Efek sitotoksik fraksi aktif diperkuat dengan gambaran morfologis sel HeLa dan Skov3 setelah diberi perlakuan selama 24 jam (Gambar 7). Gambar 7 memperlihatkan bahwa sel HeLa mulai mengalami perubahan morfologi dari bentuk pipih memanjang menjadi bulat pada dosis ekstrak 8 ppm, sedangkan pada sel Skov3 perubahan morfologi mulai terlihat pada dosis 16 ppm. Sel HeLa dan Skov3 terlihat sudah rusak dan berbentuk tidak utuh pada dosis 32 ppm. Dalam kondisi seperti ini, bentuk sel menjadi tidak

beraturan dan sel tidak memiliki kemampuan lagi untuk melekatkan diri pada dasar *culture flask*. Pemberian suatu bahan aktif dapat menyebabkan kematian sel. Kematian sel dapat terjadi melalui apoptosis dan nekrosis.

Apoptosis merupakan proses kematian sel secara terprogram (*programmed cell death*) (Berninghausen & Leippe, 1997). Apoptosis dapat diamati pada penampakan fisiologis berupa pengkerutan sel, kerusakan membran plasma dan kondensasi kromatin. Sel yang mati dengan proses ini tidak kehilangan kandungan internal sel dan tidak menimbulkan respon inflamasi (Baehrecke & Mehmet, 2003; Peter *et al.*, 1997 *dalam* Nurulita, 2005). Bila program apoptosis telah selesai pada sel, maka akan

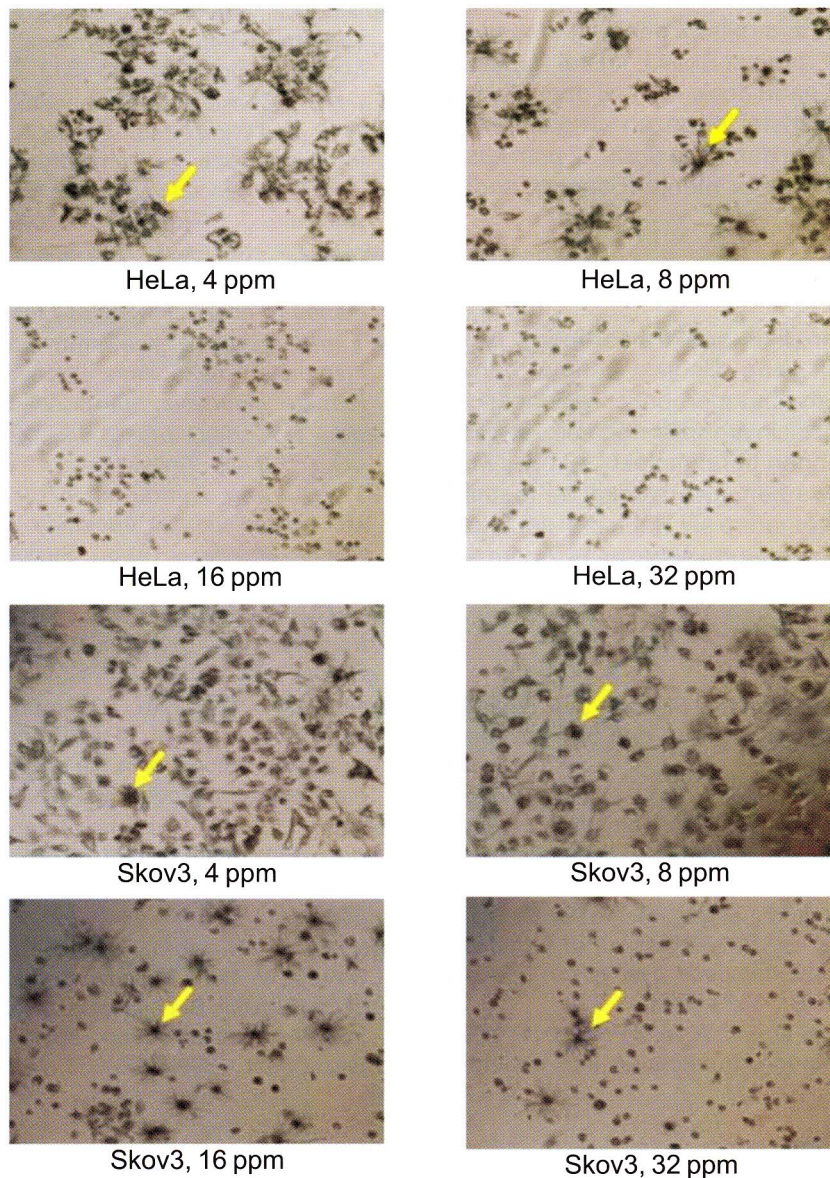


Gambar 7. Mofologi sel HeLa dan Skov3 setelah diberi perlakuan fraksi F1.2 selama 24 jam.
Figure 7. Morphology of HeLa and Skov3 cells after being treated with F1.2 fraction during 24 hours.

meninggalkan kepingan sel mati yang disebut dengan badan apoptosis yang akan segera dikenali oleh makrofag untuk difagositosis (Meiyanto, 1999). Sebaliknya, pada sel yang mengalami nekrosis, membran nukleus dan membran selnya rusak, inti sel lisis, volume sel mengembang (*swell*) dan terjadi disintegrasi pada organel-organel sel. Nekrosis biasanya diikuti dengan respon inflamasi (Baehrecke & Mehmet, 2003). Suatu bahan yang poten sebagai antikanker adalah bahan yang dapat bekerja secara selektif, dapat menginduksi apoptosis dan memiliki efek samping seminimal mungkin. Kematian sel yang disebabkan oleh pemberian fraksi F1.2 belum bisa

dipastikan apakah karena proses apoptosis atau nekrosis.

Reaksi MTT merupakan reaksi reduksi seluler yang didasarkan pada pemecahan garam tetrazolium MTT yang berwarna kuning menjadi kristal formazan yang berwarna biru keunguan. Enzim suksinat dehidrogenase pada mitokondria sel hidup mampu memecah MTT menjadi kristal formazan (Zachary, 2003). Reaksi tersebut melibatkan piridin nukleotida, kofaktor NADH dan NADPH yang hanya dikatalis oleh sel hidup, sehingga jumlah formazan yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel yang hidup (Anon., 2005). Semakin banyak sel yang hidup,



Gambar 8. Kristal formazan (tanda panah) pada sel HeLa dan Skov3 setelah diberi perlakuan fraksi F1.2 selama 24 jam

Figure 8. Formazan crystals at HeLa and Skov3 cells (arrows) after being treated with F1.2 fraction for 24 hours

semakin banyak kristal formazan yang terbentuk sehingga nilai absorbansi yang diperoleh menjadi tinggi yang menunjukkan rendahnya inhibisi terhadap sel.

Dalam penelitian ini suatu ekstrak terlihat bahwa dengan meningkatnya jumlah sel yang mati maka kristal formazan yang terbentuk semakin sedikit (Gambar 8). Berdasarkan Gambar 8 terlihat bahwa kristal formazan pada sel HeLa masih terbentuk pada dosis 4 dan 8 ppm, tetapi pada dosis 16 dan 32 ppm kristal formazan yang terbentuk sangat sedikit. Hal ini menunjukkan bahwa sel-sel HeLa pada dosis 16 dan 32 ppm sudah mengalami kematian sehingga enzim suksinat dehidrogenase yang terdapat pada mitokondrianya mengalami kerusakan. Akibatnya, MTT yang diberikan pada kultur sel pada mikroplat selama 4 jam tidak mengalami perubahan menjadi kristal formazan. Pada sel Skov3, kristal formazan masih jelas terlihat pada dosis 4 dan 8 ppm. Namun pada dosis 16 ppm kristal formazan yang terbentuk sudah mulai berkurang dan pada dosis 32 ppm kristal formazan yang terbentuk menjadi sangat sedikit (Gambar 8).

KESIMPULAN

Berdasarkan analisis spektra terhadap isolat senyawa sitotoksik yang diisolasi, terlihat bahwa senyawa bioaktif tersebut merupakan golongan tiol yang mengandung cincin aromatik serta alkil sebagai gugus samping dengan berat molekul 291. Uji MTT menunjukkan bahwa senyawa bioaktif ini memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dan sel Skov3 dengan nilai IC_{50} berturut-turut sebesar 14,7 ppm dan 10,9 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 2005. Cell quanti-MTT assay kits. Bioassay system Inc. USA. <http://www.i-dna.biz>. Accessed October 29, 2005.
- Baehrecke, E.H. and Mehmet, H. 2003. Nuclear changes in dying cells. In Hughes, D. and Mehmet, H. (eds.). *Cell Proliferation and Apoptosis*. BIOS Scientific Publisher Limited. 373 pp
- Berninghausen, O. and Leippe, M. 1997. Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*. 65(9): 3615–3620
- Ebada, S.E., Edrada, R.U., Lin, W., and Proksch, P. 2008. Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. *Nature Protocols*. 3(12): 1820–1831
- Faulkner, D.J. 2000. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 17: 7–55
- Fajarningsih, N.D., Januar, H.I., Nursid, M., dan Wikanta, T. 2006. Potensi antitumor ekstrak spons *Crella papilata* asal Taman Nasional Laut Kepulauan Seribu. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 1(1): 35–41.
- D'Auria, M.V., Giannini, C., Zampella, A, Minale, L., Debitus, C., and Roussakis, C. 1998. Crellastatin A: A cytotoxic bis-steroid sulfate from the Vanuatu marine sponge *Crella* sp. *J. Org. Chem.* 63(21): 7382–7388
- Henkel, T.P. and Pawlik, J.R. 2005. Habitat use by sponge-dwelling brittle stars. Research article. *Marine Biology*. 146: 301–313.
- Lam, H.W., Cooke, P.A., Pattenden, G., Bandaranayake, W.M., and Wickramasinghe, W.A. 1999. Structure and total synthesis of benzylthiocrellidone, a novel dimedone-based vinyl sulfide from the sponge *Crella spinulata*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*: 847–848.
- Maxwell J.R., Ehrlich, H., and Speer, L. 2005. *Medicines from the deep*. Paper on Natural Resources Council. Marine Conservation Biology Institute. March 2005.
- Meiyanto, E. 1999. Kurkumin sebagai antikanker, menelusuri mekanisme aksinya. Review, *Majalah Farmasi Indonesia*. 10(4): 224–230.
- Nurulita, N.A. 2005. *Efek Antikanker Pentagamavunon -O (PFV-O) Terhadap Sel Kanker Payudara T47D yang Diinduksi 17- β -Estradiol Melalui Mekanisme Induksi Apoptosis dan Penghambatan Angiogenesis*. Tesis. Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 92 pp.
- Proksch, P., Edrada-Ebel, R.A., and Ebel, R. 2003. Drugs from the sea – opportunities and obstacles. *Marine Drugs*. 1: 5–17.
- Sashidhara, K.V., White, K.N., and Crews, P. 2009. A selective account of effective paradigms and significant outcomes in the discovery of inspirational marine natural products. *J. Nat. Prod.* 72: 588–603.
- Zachary, I. 2003. Determination of cell number. In Hughes, D. and Mehmet, H. (eds.). *Cell Proliferation and Apoptosis*. BIOS Scientific Publisher Limited. 373 pp.
- Zampella, A., Gianini, C., Debitus, C., Rousaakis, C., and D'Auria, V. 1999. Isolation and structural elucidation of crellastatins B–H: cytotoxic bis(steroid) derivatives from the Vanuatu marine sponge *Crella* sp. *Eur. J. Org. Chem.* 1999: 949–953.