

Homologi Gen Seleno Metiltransferase (*smt*) pada *Geobacillus* sp. 20k dengan *smt* *Astragalus bisulcatus*

Evi Triana,¹ Imam Supardi,² Sunarjati Soedigdoadi,² Novik Nurhidayat³
¹Program Magister, Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar, ²Bagian Mikrobiologi
Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran, Bandung
³Pusat Penelitian Biologi, LIPI, Cibinong

Abstrak

Metil selenosistein (MSC) merupakan bentuk selenium yang paling efektif melawan sel kanker. Pembentukan MSC diperantarai oleh enzim seleno metiltransferase (disandi gen *smt*) sebagai mekanisme detoksifikasi selenium dengan cara metilasi selenosistein. Gen *smt* telah dikarakterisasi dari tumbuhan yang kaya selenium, *Astragalus bisulcatus*. Dilakukan penelitian eksperimental laboratorik terhadap *Geobacillus* sp. 20k di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong, Bogor, periode November 2008–Juni 2009. Gen *smt* dideteksi dengan *polymerase chain reaction* dan sekuensing. Sekuens fragmen DNA dianalisis menggunakan program *basic local alignment search tool* (BLAST). Hasil pencarian homologi menunjukkan gen *smt* dan homolognya pada umumnya terdapat pada tumbuhan pengakumulasi selenium, antara lain *A. bisulcatus*, *C. sinensis*, dan *A. thaliana* dengan kesamaan >85%. Primer yang didesain untuk amplifikasi *smt* adalah CAAGCCACCATTCAAGGTTT dan CCCTACTGATCCCGC AATTA. Hasil amplifikasi fragmen DNA didapatkan sekitar 190 *base pair*. Sekuens DNA dan translasi proteinnya teridentifikasi sebagai bagian dari enzim termofilik dan *smt* *A. bisulcatus*, dengan tingkat kesamaan 83% untuk gen *smt* dan 88–90% untuk proteinnya. Disimpulkan *Geobacillus* sp. 20k memiliki gen serupa dengan gen *smt* *A. bisulcatus* sehingga pengembangan lebih lanjut sebagai sumber selenium nontoksik untuk terapi kanker perlu dipertimbangkan. [MKB. 2010;42(3):128-34].

Kata kunci: *Geobacillus* sp. 20k, kanker, metilselenosistein, selenium nontoksik, seleno metiltransferase

Homology of Seleno Methyltransferase (*smt*) Gene from *Geobacillus* sp. 20k with That from *Astragalus bisulcatus*

Abstract

Methylselenocysteine (MSC) is the most effective form of selenium against cancer. The synthesis of MSC is catalyzed by seleno methyltransferase (*smt*) through selenium methylation as its detoxification mechanism. Gene of *smt* has been characterized in selenium rich plant, *Astragalus bisulcatus*. This experimental laboratoric study was done on *Geobacillus* sp. 20k. at Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong, Bogor, November 2008–June 2009. Target gene was detected by polymerase chain reaction and sequencing. DNA sequence was analyzed by the basic local alignment search tool (BLAST). The results showed that *smt* gene and its homolog were generally found on selenium rich plants, such as *A. bisulcatus*, *C. sinensis*, and *A. thaliana*, with similarity more than 85%. Designed primers for amplification of *smt* are CAAGCCACCATTCAAGGTTT and CCCTACTGATCCCGC AATTA. Amplification of DNA fragments obtained at approximately 190 base pair. DNA sequence and its protein translation were identified as part of the thermophilic enzyme and *smt* of *A. bisulcatus*, with 83% similarity for *smt* genes and 88–90% for protein. In conclusion, *Geobacillus* sp. 20k have *smt* genes similar with that of *A. bisulcatus*, therefore further development of this isolate as a non toxic selenium source for cancer therapy could be taken into consideration. [MKB. 2010;42(3):128-34].

Key words: Cancer, *Geobacillus* sp. 20k, non toxic selenium, methyl selenocystein, seleno methyltransferase

Korespondensi: Evi Triana, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), jalan Raya Bogor km. 46, Cibinong, Bogor, telepon 08164869409, e-mail: evitriana03@yahoo.com

Pendahuluan

Selenium memiliki nilai nutrisi yang penting bagi hampir semua makhluk hidup karena merupakan komponen kunci pada sejumlah selenoprotein fungsional yang dibutuhkan untuk kesehatan dan fungsi normal tubuh. Hal tersebut disebabkan selenium merupakan komponen inti dari banyak enzim, antara lain: glutathionin peroksidase, format dehidrogenase, dan tioredoksin reduktase.^{1,2}

Selenium memiliki potensi menguntungkan dalam bidang kesehatan, selain nilai nutrisinya yang penting.³ Beberapa penelitian mengungkap peranan protektif selenium dalam melawan kanker,⁴ tetapi saat digunakan untuk tujuan terapi, perlu kehati-hatian untuk menghindari toksisitas selenium karena toksik pada konsentrasi tinggi. Kisaran dosis terapi (*therapeutic window*), yaitu dosis yang dibutuhkan sebagai kemopreventif dengan dosis toksik selenium, sangat sempit.⁵ Dosis selenium 200 µg/hari dapat menurunkan kejadian kanker,³ sedangkan asupan selenium yang masih dapat ditoleransi sebesar 400 µg/hari.⁵ Oleh karena itu senyawa selenium yang tidak bersifat toksik sangat dibutuhkan agar terapi kanker menggunakan senyawa selenium menjadi lebih efektif.

Hasil penelitian yang terdahulu menunjukkan bahwa metil selenosistein (MSC) merupakan bentuk senyawa selenium yang paling efektif melawan sel kanker karena dapat menghambat siklus sel dan menginduksi apoptosis.⁶⁻⁸ Metil selenosistein juga dibuktikan dapat menurunkan toksisitas dan akumulasi selenium di dalam tubuh,⁹ oleh karena itu, senyawa tersebut sangat menguntungkan sebagai agen kemopreventif karena peningkatan akumulasi selenium dalam tubuh 5–10x lipat di atas level supranutrisi bersifat toksik.¹⁰

Metil selenosistein dihasilkan dari mekanisme detoksifikasi selenium, yaitu dengan cara metilasi selenosistein untuk menghindari penggabungan yang nonspesifik dengan protein. Senyawa ini merupakan bentuk selenium yang disimpan dan hanya dihasilkan oleh organisme yang kaya selenium.¹⁰ Mekanisme tersebut dibuktikan dari hasil penelitian tumbuhan yang kaya selenium, *Astragalus bisulcatus*. Tumbuhan ini mampu bertahan terhadap toksisitas selenium oleh karena memiliki enzim seleno metiltransferase (SMT) yang berperan mentransfer gugus metil dari metilmetionin kepada selenosistein membentuk

MSC.¹¹ Potensi ini dapat dimanfaatkan untuk memperoleh MSC dalam jumlah tinggi yang dapat digunakan untuk pencegahan dan terapi kanker. Untuk pengembangan MSC sebagai bahan kemoprotektif, perlu diketahui gen yang berperan dalam pembentukan senyawa selenium termetilasi tersebut.

Penelitian yang dilakukan oleh Ellis *et al.*¹ mengungkapkan bahwa enzim SMT disandi oleh gen *smt*. Gen ini sebagian besar diekspresikan oleh tumbuhan yang kaya selenium, tetapi sampai saat ini belum dilaporkan adanya gen spesifik *smt* pada genom bakteri, termasuk bakteri termofilik. Untuk mengungkapkan kemungkinan adanya gen serupa *smt* pada bakteri dilakukan penelitian ini, yaitu untuk mengkaji keberadaan dan identitas gen yang menyandi enzim SMT pada isolat bakteri termofilik *Geobacillus* sp. 20k dengan cara analisis sekuens/urutan nukleotida bakteri tersebut.

Geobacillus sp. 20k dipilih karena tahan terhadap toksisitas selenium dan ekstrak selnya menunjukkan aktivitas antioksidasi dan induksi apoptosis. Selain lebih mudah dimanipulasi dan diproduksi secara cepat dalam jumlah banyak dibandingkan dengan sumber selenium nabati, bakteri termofilik juga memiliki gen yang stabil terhadap suhu tinggi dibanding bakteri lain, sehingga lebih mudah diaplikasikan dalam bidang bioteknologi dan industri untuk dikembangkan sebagai sumber selenium nontoksik alami untuk terapi kanker.

Metode

Bakteri ditumbuhkan pada media heterotrof agar yang ditambah 100 ppm SeO₂, lalu diinkubasi pada suhu 60°C selama 3 hari. Selanjutnya bakteri ditumbuhkan kembali pada media heterotrof cair pada suhu 60°C selama 3 hari. Sel dipanen dengan cara sentrifugasi 3.000 rpm selama 5–10 menit.

DNA diekstraksi dan dipurifikasi dengan menggunakan *illustra™ bacteria genomic Prep Mini Spin Kit* dari GE Healthcare menurut prosedur dari produsen.

Primer spesifik untuk gen *smt* didesain dengan menggunakan program primer 3 berdasarkan *query* nukleotida gen *smt* *A. bisulcatus*. Urutan nukleotida tersebut (*Accession no.* AJ131433) diperoleh dari *Gene Bank* NCBI secara *online*.¹² Pasangan primer yang telah direkomendasikan

ditentukan spesifisitasnya dengan menggunakan BLAST primer.^{13,14} Sintesis primer dilakukan oleh EUROGENTECAIT, Singapore.

DNA diamplifikasi menggunakan *FastStart PCR Master, forward* dan *reverse primer*. Total volume reaksi adalah 25 µL, yang terdiri dari 3,75 µL untuk masing-masing primer (5 µM), 1 µL templat, 12,5 µL *PCR Master Mix* dan 4 µL ddH₂O. Siklus termal berlangsung sebanyak 40 siklus yang terdiri dari: denaturasi DNA pada suhu 96°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 60°C selama 30 detik, dan pemanjangan pada suhu 72°C selama 2 menit.

DNA dimurnikan menggunakan *illustra™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* menurut prosedur yang dikeluarkan oleh produsen.

Sebanyak 10 µL sampel yang telah dicampur dengan 2 µL *loading dye*, bersama dengan 2 µL *DNA ladder* (100 bp) diaplikasikan pada 0,8% gel agarose, mengandung EtBr dengan konsentrasi akhir 0,5 ppm. Pada gel yang direndam dalam bufer TAE 1x, diberikan arus listrik 100 V selama ± 60 menit, kemudian gel divisualisasi dengan pendedahan sinar UV.

Urutan nukleotida ditentukan menggunakan *Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit* oleh *Applied Biosystem 3130 Genetic Analyzer*. Total volume reaksi adalah 20 µL, yang terdiri dari 3,75 µL primer (5 µM), 1 µL templat, 8 µL *BigDye Ready Reaction Mix* dan 7,25 µL ddH₂O. Siklus termal berlangsung sebanyak 40 siklus, terdiri atas denaturasi DNA (96°C; 30"), penempelan primer (60°C; 30"), dan pemanjangan (72°C; 2').

Sekuens gen *smt* dirakit (*assamble*) dengan menggunakan perangkat lunak *ATGC sequencing analysis* versi 4.0 (ABI Prism), lalu nukleotida penyusunnya dikoreksi secara langsung.

Urutan nukleotida gen *smt* *Geobacillus* sp.

20k dirujuk ke *Gene Bank* untuk mengetahui kesamaannya dengan gen dan protein lainnya, terutama berkaitan dengan sintesis selenoprotein, menggunakan analisis BLASTn, BLASTx, dan BLASTp. Urutan nukleotida dideduksi menjadi urutan asam amino menggunakan program *Translate Tool* yang tersedia *online*, sebelum dilakukan pencarian homologi menggunakan BLASTp.¹⁵

Hasil

Identifikasi gen *smt* pada *Geobacillus* sp. 20k dimulai dengan penelusuran pada *Gene Bank* untuk mendapatkan informasi gen *smt*. Sekuens gen *smt* *A. bisulcatus* yang diperoleh dari basis data (*Accession* No. AJ131433) kemudian dikonfirmasi menggunakan program *basic local alignment search tool* (BLAST). Hasil pencarian homologi menunjukkan bahwa gen *smt* dan homolognya umumnya terdapat pada tumbuhan yang kaya selenium, antara lain: *A. bisulcatus*, teh (*Camelia chinensis*), dan *Ab. thaliana* dengan kesamaan lebih dari 85% (Tabel 1).

Pada bakteri, gen tersebut memiliki domain mirip metiltransferase hingga ±60%, misalnya dengan homosistein metiltransferase pada *Bacillus pumilus*, *Clostridium acetobutylicum*, dan *Streptococcus mutans* (Tabel 1).

Primer spesifik yang dapat berikatan serta menginisiasi amplifikasi DNA target didesain untuk amplifikasi gen *smt* pada templat DNA berdasarkan sekuens gen *smt* *A. bisulcatus*. Primer yang direkomendasikan, disarikan pada Tabel 2.

Fragmen DNA target berukuran 190 *base pair* telah berhasil diamplifikasi (Gambar 1) dengan urutan nukleotida, sebagai berikut:

CGTACATGCGTTCATCCGAGGGGTAAGAC

Tabel 1 Hasil Pencarian Homologi Gen *smt* *A. bisulcatus*

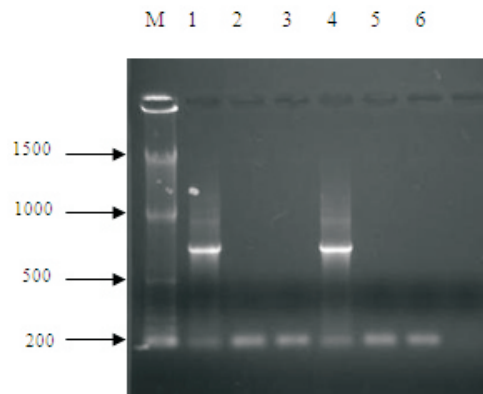
Organisme	Gen	Homologi
<i>Astragalus bisulcatus</i>	Selenosistein metiltransferase (<i>smt</i>)	100
Teh (<i>Camelia sinensis</i>)	Selenosistein metiltransferase (<i>smt</i>)	85
<i>Arabinopsis thaliana</i>	Homosistein S-metiltransferase (<i>hmt2</i>)	86
Jagung (<i>Zea mays</i>)	Homosistein S-metiltransferase (<i>hmt3</i>)	84
Padi (<i>Oryza sativa</i>)	cDNA clone:J013044M21	83
Anggur (<i>Vitis vinifera</i>)	hypothetical protein LOC100264835	84
Sawi (<i>Brassica oleracea</i>)	Homosistein S-metiltransferase (<i>hmt2</i>)	84
<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	Homosistein S-metiltransferase	64
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Possible Homosistein S-metiltransferase	68
<i>Streptococcus mutans</i> UA 159	Putative metiltransferase	63

Tabel 2 Karakteristik Primer Gen smt

OLIGO	Awal	Panjang	Melting Temperature	%GC	Sekuens
Forward Primer	271	20	59,97	45	5'CAAGCCACCATTCAAGGTTT3'
Reverse Primer	465	20	59,92	50	5'CCCTACTGATCCC GCAATTA3'

Tabel 3 Hasil Pencarian Homologi terhadap Sekuens Fragmen Gen smt *Geobacillus* sp. 20k

Protein	Organisme	Homologi (%)
Esterase/lipase/tioesterase	<i>Bacillus lichineformis</i>	100
Karboksilesterase	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061	95
Karboksilesterase	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	93
<i>Thermostable carboxylesterase Est30</i>	<i>Bacillus coahuilensis</i> m4-4	90
<i>Thermostable carboxylesterase Est30</i>	<i>Geobacillus</i> sp. G11MC16	88
<i>Thermostable carboxylesterase Est30</i>	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	88
Karboksilesterase	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	90
Seleno metiltransferase	<i>Astragalus bisulcatus</i>	83



Gambar 1 Hasil Amplifikasi Fragmen DNA yang Berukuran Sekitar 190 bp

Keterangan: M = DNA ladder, Lane 2 dan 5 = produk PCR dengan primer smt

Tabel 4 Urutan Asam Amino Hasil Translasi Sekuens DNA dan BLAST

Translasi protein	Homolog
<p><u>3'5' Frame 1</u> RFPY Stop SRNYKKFEGKTAEQID AE Met EEFKKT Met NTLKALQDL IADVREHVD Met IYSPTFVVQAR HDH Met INTHCQATIQLSTDP AI R Met HGSTLICTPR Met NACT</p>	<p>ref YP_001127089.1 karboksilesterase termostabil Est30 [<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2] (88%) dan <i>G. stearothermophilus</i> ATCC7954 (90%)</p>
<p><u>5'3' Frame 1</u> RTCVHPRGKTYERAP Met HSNCG ISR Stop TLNGGLTVRINH Met IVA RLHDKCRRIDHVVH Met LSDIGNQ ILQCFQRVHRRFFEFHLSVNLL RCLAFKFLI IAGSVGKP</p>	<p>ref YP_001181019.1 tRNA adenililtransferase [<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>] (63%)</p>

ATATGAGCGTGCTCCCATGCATTCTAATTG
 CGGGATCAGTAGATAAACCTTGAATGGTG
 GCTTGACAGTGC GTATTAATCATATGATCG
 TGGCGCGCCTGCACGACAAATGTAGGCG

AATAGATCATGTCCACATGCTCTCTGACAT
 CGGCAATCAAATCCTGCAGTGCTTTCAAC
 GTGTTTCATCGGCGTTTTTTTGAATTCTTCC
 ATCTCAGCGTCAATCTGCTCCGCTGTCTT



Gambar 2 Koloni *Geobacillus* sp. 20k pada Media yang Disuplementasi Se

GCCTTCAAATTTCTTATAATTGCGGGATCA
GTAGGGAAACCT.

Hasil pencarian homologi pada basis data menunjukkan bahwa sekuens parsial gen *smt* *Geobacillus* sp. 20k mempunyai kemiripan dengan bagian dari gen *smt* *A. bisulcatus* (83%). Fragmen tersebut juga serupa dengan bagian dari enzim esterase atau karboksilesterase yang termostabil pada bakteri termofilik, antara lain: *Geobacillus* sp, *Geobacillus thermodenitrificans*, dan *Geobacillus stearothermophilus* (Tabel 3).

Hasil tersebut dikonfirmasi oleh pencarian homologi menggunakan BLASTp yang urutan nukleotidanya terlebih dahulu dideduksi menjadi urutan asam amino penyusunnya, teridentifikasi sebagai bagian dari enzim termofilik dengan tingkat kesamaan 88–90% (Tabel 4).

Prediksi *Geobacillus* sp. 20k memiliki gen yang mirip bagian gen seleno metiltransferase, dikonfirmasi oleh hasil kultur isolat tersebut pada media yang disuplementasi selenium. Bakteri tumbuh sebagai koloni berwarna merah (Gambar 2).

Pembahasan

Gen *smt* memiliki domain mirip metiltransferase $\pm 60\%$ pada bakteri. Hal tersebut dapat disebabkan sifat kimia selenium dan sulfur serupa, sehingga toleransi selenium kemungkinan juga diatur oleh gen-gen yang terlibat dalam metabolisme sulfur.¹⁸ Bagian yang serupa diduga merupakan bagian yang bertanggung jawab untuk metiltransferase, sementara bagian yang berbeda merupakan bagian variabel dan mungkin spesifik untuk proses pengikatan selenium.

Primer spesifik yang digunakan untuk amplifikasi gen *smt* memenuhi persyaratan primer

yang baik, yaitu panjang kedua primer antara 18–25 pasang basa yaitu 20 nukleotida;⁹ perbedaan panjang kedua primer < tiga pasang basa; perbedaan Tm kedua primer kurang dari 5°C, yaitu 0,05°C; komposisi G+C antara 40– 60%, yaitu 45% dan 50%. Primer memiliki tidak lebih dari tiga pasang basa yang berkomplemen, sehingga kecil kemungkinan terbentuk dimer primer. Persyaratan yang tidak dipenuhi adalah pembentukan G-C *clump*, sedangkan basa pada ujung 3' berupa G atau C agar stabilitas ikatan basa cukup kuat, karena G-C memiliki 3 ikatan hidrogen, dibandingkan dengan A-T yang hanya dua ikatan. Selain itu, berdasarkan BLAST primer, primer bersifat spesifik karena tidak ada sekuens gen yang tingkat kesamaannya signifikan dengan primer gen *smt* (data tidak ditampilkan), sehingga fragmen DNA target yang berukuran 190 *base pair* berhasil diamplifikasi.

Koloni berwarna merah pada kultur *Geobacillus* sp. 20k ini menunjukkan bahwa bakteri dapat mereduksi senyawa selenium menjadi selenium elemental.¹⁶ Mekanisme ini merupakan indikasi bahwa *Geobacillus* sp. 20k mampu mengakumulasi dan detoksifikasi selenium.⁸ Hal tersebut sesuai hasil penelitian terdahulu yang mengungkapkan *Geobacillus* sp. 20k dapat mengakumulasi selenium dari lingkungan sebesar 1,0031 ppm.¹⁷

Selenium diduga dapat diakumulasi oleh *Geobacillus* sp. 20k dalam bentuk termetilasi, yang tidak toksik bagi bakteri, seperti pada organisme pengakumulasi selenium lainnya.¹⁸ Dugaan tersebut berdasarkan informasi bahwa tumbuhan yang kaya selenium, mengubah selenium yang berpotensi toksik menjadi tidak toksik melalui mekanisme metilasi, membentuk MSC yang sangat efektif sebagai antikanker.^{11,19} Asam amino ini hanya dihasilkan oleh organisme

yang kaya selenium, dengan perantara enzim SMT disandi oleh gen *smt*.^{1,18} Oleh karena itu, diprediksi bahwa *Geobacillus* sp. 20k memiliki gen yang homolog dengan *smt*. Prediksi ini diperkuat oleh hasil penelitian yang menunjukkan bahwa *Geobacillus* sp. 20k mampu membunuh sel kanker darah 67% dan sel kanker limfe 37%.

Ada hal menarik yang terungkap saat sekuens DNA gen *smt* *Geobacillus* sp. 20k dideduksi ke dalam urutan asam amino penyusun proteiny. Analisis BLAST terhadap hasil deduksi sekuens parsial tersebut menunjukkan bahwa protein yang terbentuk dari fragmen DNA 3' ke 5' memiliki kemiripan dengan bagian dari enzim karboksilesterase yang termotabil dari *G. thermodenitrificans* (88%) dan *G. stearothermophilus* (90%). Fragmen DNA 5' ke 3' memiliki kemiripan (63%) dengan tRNA adenililtransferase–Se bakteri termofilik *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (Tabel 4). Informasi tersebut memberi gambaran bahwa dari fragmen DNA yang diamplifikasi dari isolat bakteri termofilik *Geobacillus* 20k, diperoleh peluang adanya gen dan protein yang serupa dengan gen *smt* dan enzim SMT *A. bisulcatus*. Hal ini berdasarkan setidaknya dari teridentifikasi fragmen DNA untuk domain enzim karboksilesterase yang termotabil dan enzim adenililtransferase–selenium, yang mirip dengan gen *smt* *A. bisulcatus* yang berkaitan dengan metabolisme selenium.

Hasil analisis sekuens parsial gen *smt* *Geobacillus* sp. 20k, bersama dengan kemampuan *Geobacillus* sp. 20k melawan sel kanker, dan mengakumulasi selenium,¹⁷ yang dikonfirmasi oleh tumbuhnya koloni bakteri berwarna merah pada medium disuplementasi selenium, membuka peluang untuk memanfaatkan *Geobacillus* sp. 20k sebagai sumber selenium nontoksik untuk terapi kanker.

Penelitian ini dapat disimpulkan bahwa *Geobacillus* sp. 20k memiliki bagian dari gen seleno metiltransferase (*smt*) *A. bisulcatus* yang berukuran 190 *base pair*. Sekuen DNA fragmen gen *smt* pada *Geobacillus* sp. 20k memiliki kesamaan dengan bagian gen *smt* *A. bisulcatus* (83%), karboksilesterase (~90%), dan tRNA adenililtransferase (63%).

Hasil penelitian ini dapat dimanfaatkan untuk memberdayakan enzim SMT yang disandi oleh gen *smt* pada *Geobacillus* sp. 20k sebagai upaya untuk memproduksi MSC, yang merupakan senyawa selenium nontoksik untuk terapi kanker.

Daftar Pustaka

1. Ellis DR, Sors TG, Brunk DG, Albrecht C, Orser C, Lahner B, *et al.* Production of S-methylselenocystein in transgenic plants expressing selenocysteine methyltransferase. *BMC Plant Biol.* 2004 Jan;4(1):1-11.
2. Kiefer D. Getting serious about selenium. *Life Extension Magazine Report.* 2004. [diunduh 15 Januari]. Tersedia dari: <http://www.lef.org/>.
3. Johansson L, Gafvelin G, Arner ESJ. Selenocysteine in protein properties and biotechnological use. *Biochim. Biophys Acta.* 2005;XX:1-13.
4. El-Bayoumy K, Sinha R. Molecular chemopreventive by selenium: a genomic approach. *Mutation Research [Online Journal]* 2005 [diunduh 15 Januari 2008]. Tersedia dari www.sciencedirect.com.
5. Institute of Medicine, Food & Nutrition Board. *Dietary reference intake: vitamin C, selenium, and carotenoids.* Washington D.C: National Academy Press: 2000.
6. Lobinski R, Edmonds JS, Suzuki KT, Uden PC. Species-species determination of selenium compounds in biological material. *Pure Appl Chem.* 2000;72(3):447-61.
7. Dong Y, Ganther HE, Stewart C, Ip C. Identification of molecular target associated with selenium-induced growth inhibition in human breast cells using cDNA microarrays. *Cancer Res.* 2002;62:708-14.
8. Whanger PD. Selenium and its relationship to cancer. *Br J Nutr.* 2004;91:11-28.
9. Finley JW, Ip C, Lisk DJ, Davis CD, Hiunzte KJ, Whanger PD. Cancer-protective properties of high selenium broccoli. *J Agric Food Chem.* 2001; 49:2679-83.
10. Lyi SM, Heller LI, Rutzke M, Welch RM, Kochian LV, Li L. Molecular and biochemical characterization of the selenocysteine Se-methyltransferase gene and Se-methylselenocysteine synthesis in Broccoli. *Plant Physiol.* 2005;138(1):409-20.
11. Neuhierl B, Thanbichler M, Lottspeich F, Montana A, Boock. A family of S-methylmethionine-dependent thiol/selenol methyltransferases: role in selenium tolerance and evolutionary relation. *J Biol Chem.* 1999;274(9):5407-14.
12. NCBI. National Center for Biotechnology Information HomePage. [diunduh 8 Agustus 2008]. Tersedia dari: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
13. Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Dalam: Krawetz S, Misener S, penyunting. *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology.* Totowa: Humana Press: 2000. hlm. 365-86.

14. NCBI. National Center for Biotechnology Information HomePage. [diunduh 8 Agustus 2008]. Tersedia dari: <http://biotools.umassmed.edu/cgi-bin/primer3plus/>.
15. Swiss Institute of Bioinformatics (SIB). ExPASy Proteomics Server. [diunduh 12 Mei 2009]. Tersedia dari: <http://us.expasy.org/>.
16. Zhang LH, Abdel-Ghany SE, Freeman JL, Ackley AR, Schiavon M, Pilon-Smits EAH. Investigation of selenium tolerance mechanisms in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant*. 2006; 128:212-23.
17. Handayani. Penurunan ekspresi gen *pho85* sel apoptosis *Saccharomyces cerevisiae* oleh eks-trak air daun ciplukan 33NHR dan *Geobacillus* sp. 22a [Skripsi]. Bogor: IPB; 2006.
18. Pickering IJ, Wright C, Bubner B, Ellis D, Persans MW, Yu EY, *et al*. Chemical form and distribution of selenium and sulfur in the selenium hyperaccumulator *Astragalus bisulcatus*. *Plant Physiol*. 2003;131:1457-60.
19. Rayman MP. The Importance of selenium to human health. *Lancet*. 2000;356:233-41.