

ANALISIS TRANSKONJUGASI Tn916 PADA
CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM
DAN KERENTANANNYA TERHADAP ANTIBIOTIK

Felix Melchizedech Mesak dan Donna Pasaribu

Abstract

*Medical potency in **Chromobacterium violaceum** (Cv) is not well recognised and not widely published. The only medical potencies which have reknowned yet are as follows : production of some antibiotics, antitumor substances and septicaemia effect in laboratory animals and human subjects as well.*

*This basic research has been done to understand further these medical potencies using molecular biology method, by means of **in vivo** mutagenesis system, for detecting the behaviour of related genes. for the first step, optimizing **in vivo** mutagenesis on Cv by using transconjugated element of Tn916, was performed. And this is the objective of this study.*

Resistancy against certain antibiotics is used as genetic marker. Cv is still sensitive to various antibiotics, except ampicilin. A spontaneous mutation was generated to produce Cvfr' strain and this strain is used to be conjugated with rifamfisin selection marker.

Tranconjugation frequency of Tn916 into genom is 2.5×10^{-5} . But as the recipient selection marker which was used is ampicilin, a strong suspect is being made that real number is higher. This was caused by the non-expressive effect of violet pigment by Cv in DNA-electrophoresis. Donor colonies was diffiucult to be differentiated, and the condition will be worsened, if ampicilin is furtherly degraded by Cv, which can caused the development of donors.

In this study, isolation of plasmid for the purposed of plasmid typing was done. And one of the result is Cv has no plasmid as clearly shown in electrophoresis method.

Pendahuluan

Chromobacterium violaceum (Cv) dipergunakan oleh mahasiswa kedokteran Ukrida dalam praktikum mata kuliah Mikrobiologi Kedokteran untuk mempelajari teknik penggoresan kuadran pada media agar, sehingga menghasilkan koloni-koloni tunggal yang terpisah dengan baik dari biakan campuran. Sebagai pembanding terhadap koloni-koloni Cv yang berwarna ungu, digunakan bakteri *Escherichia coli* yang memiliki koloni putih keruh. Dengan demikian mahasiswa yang menguasai teknik ini akan memperoleh dua jenis koloni-koloni putih dan ungu yang saling terpisah dengan baik.

Spesies Cv merupakan sebagian kecil flora normal air dan tanah, dan berperan penting di daerah rizosfer. Cv umumnya ditemukan di daerah-daerah tropis dan subtropis. Cv juga tidak ditemukan sebagai bagian dari flora normal manusia dan hewan. Cv merupakan bakteri Gram negatif, motil dengan flagella polar tunggal dan empat flagella lateral yang berbeda secara struktural dan antigenik, anaerobik fakultatif dengan kisaran suhu pertumbuhan 15 - 40 °C. Cv secara unik menghasilkan pigmen ungu *violacein* yang mewarnai koloninya pada media agar nutritif. Cv dapat mereduksi nitrat menjadi nitrit dan memfermentasi karbohidrat. Berbagai jenis asam diproduksi oleh Cv dari metabolisme glukosa, trehalosa, N-asetil glukosamin dan glukonat. Cv menggunakan laktat, menghidrolisis kasein, dan dekarboksilasi arginin. Persentase GC DNA Cv ialah 65-68.

Ternyata Cv memiliki potensi medis yang amat besar. Cv menimbulkan septikemia pada manusia (Ti, *et al.*, 1993) dan hewan. Potensi medis penting lainnya ialah dengan ditemukannya sejumlah senyawa yang berperan dalam peningkatan sistem kekebalan tubuh, antitumor *depsipeptida bisiklik FR901228* (Ueda, *et al.*, 1994), antibiotik-antibiotik *violacein* melawan amuba tanah dan trypanosoma (Duran, *et al.*, 1989), *aerocyanidin* melawan bakteri Gram positif (Parker, *et al.*, 1988), *aerocavin* melawan bakteri Gram negatif dan Gram positif (Singh, *et al.*, 1988), dan senyawa yang bekerja secara sinergis dengan antibiotik beta-laktam (Copper, *et al.*, 1985).

Namun demikian, melalui penelusuran internet diketahui bahwa publikasi ilmiah Cv relatif sedikit. Bahkan penelitian dengan menggunakan pendekatan biologi molekuler untuk lebih memahami potensi medis secara mendasar sangat jarang. Secara umum kehidupan Cv belum digali secara mendalam, padahal bila diperhatikan Cv memiliki karakter yang luar biasa, rentang suhu hidupnya saja cukup lebar mulai dari 15-40°C, selain itu Cv merupakan flora normal tanah yang mampu menimbulkan penyakit pada manusia dan hewan atau memiliki daya adaptasi tinggi terhadap lingkungan yang sangat berbeda, dan mempunyai persentase kandungan

ANALISIS TRANSKONJUGASI

molekul GC DNA genom yang cukup tinggi, yaitu 65-68% dibandingkan kisaran normal $\pm 50\%$.

Untuk mengidentifikasi gen-gen yang sangat potensial, yang memiliki nilai medis dan industri, langkah awal yang dapat dikerjakan di FK Ukrida ialah merancang sistem untuk mutasi Cv, sehingga tidak lagi memiliki sifat asal yang kita inginkan, dapat dideteksi karena pembandingan tipe liarnya telah dimiliki yaitu mutan. Proses mutasi ini akan dilakukan secara biologis dengan memanfaatkan elemen loncat. Dengan demikian proses mutagenesis ini terjadi secara *in vivo*. Elemen loncat atau *transposon* yang akan dimanfaatkan dan telah diperoleh Bagian Mikrobiologi FKUI ialah Tn916.

Tn916 merupakan *transposon* konjugatif sebesar 18 kb, yaitu mampu berpindah ke sel bakteri lainnya melalui kontak antar (membran) sel dan meloncat secara acak ke dalam genom resipiennya (proses transkonjugasi). Tn916 pertama kali diidentifikasi dari *Enterococcus faecalis* dan membawa gen *tetM* yang menyandikan resistensi terhadap antibiotik tetrasiklin (Taylor and Churchward, 1997).

Sebelum mendeteksi mutan-mutan yang dihasilkan, sangat penting untuk mengoptimasi metode transkonjugasi yang dilakukan. Optimasi ini akan tercermin dari nilai frekuensi transkonjugasinya. Karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi dan memperoleh nilai frekuensi transkonjugasi Tn916 ke dalam genom Cv.

Metode Penelitian

Galur bakteri, Plasmid, *Transposon* dan Pemeliharaannya

Galur-galur bakteri yang digunakan ialah Cv koleksi Laboratorium Mikrobiologi FK Ukrida, *E. coli* CG110 (pAM120::Tn916) dan *E. faecalis* CG120.

Kultivasi dan pemeliharaan Cv dan *E. coli* dilakukan dengan menumbuhkan pada media padat Agar Nutrien 1.5% (Merk) dengan penambahan antibiotik ampisilin 100 ug/mL dan tetrasiklin 20 g/mL. Sementara media pertumbuhan *E. faecalis* menggunakan *Trypticase Soy Agar* 1.5% (BBL) dengan tetrasiklin 10 g/mL dan rifampisin 25 g/mL, dan sedang diuji pertumbuhannya menggunakan media *Thio Glycolate Agar* 1.5% (Merk) yang ada di Laboratorium Mikrobiologi FK Ukrida.

Baik *E. coli* maupun *E. faecalis* ditumbuhkan pada suhu 37°C dalam inkubator selama 24-48 jam. Sementara untuk menumbuhkan Cv digunakan wadah plastik atau piring kaca yang dialasi oleh kapas basah, sehingga suhu pertumbuhannya

diperkirakan berkisar antara 22-27°C selama 48 jam. Metode penumbuhan Cv merupakan modifikasi untuk penyesuaian terhadap kondisi laboratorium.

Pemeliharaan jangka panjang dilakukan dengan melarutkan koloni bakteri ke dalam gliserol 25% dalam tabung Eppendorf dan disimpan pada suhu -20°C.

Uji Resistensi Cv terhadap Antibiotik

Dalam melakukan konjugasi akan digunakan penanda genetik resistensi terhadap antibiotik. Karena itu galur Cv yang telah dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi FK perlu diketahui dulu resistensinya terhadap antibiotik. Antibiotik yang digunakan ialah: ampisilin 100 µg/mL dan 250 µg/mL, kloramfenikol 50 µg/mL, eritromisin 50 µg/mL, kanamisin 25 µg/mL, rifampisin 25 µg/mL, spektinomisin 50 µg/mL, streptomisin 50 µg/mL, tetrasiklin 10 µg/mL dan trimetropim 100 µg/mL.

Mutasi Spontan Cv

Mutasi spontan dilakukan untuk memperoleh galur Cv yang resisten terhadap antibiotik rifampisin 25 µg/mL. Antibiotik-antibiotik ini akan menjadi faktor penyeleksi transkonjugan.

Sejumlah besar koloni Cv diambil dengan ose dan disebar atau digores pada medium agar nutrien yang ditambahkan rifampisin 25 µg/mL. Inkubasi dilakukan sampai hari ke empat.

Konjugasi

E. coli CG 110 ditumbuhkan pada media agar nutrien yang ditambahkan antibiotik tetrasiklin 20 µg/mL pada suhu 37°C selama 24 jam. Sementara itu Cv yang resisten terhadap rifampisin (Rf) ditumbuhkan pada media agar nutrien yang ditambahkan antibiotik rifampisin 25 µg/mL pada suhu ruang (22-27°C) selama 48 jam. Masing-masing koloni sel-sel diambil menggunakan ose dan dilarutkan ke dalam 30 µL kaldu nutrien tanpa antibiotik dalam tabung Eppendorf. Ambil masing-masing 10 µL biakan *E. coli* dan Cv kemudian campurkan ke dalam tabung Eppendorf baru yang telah berisi 500 µL media agar nutrien 1.5%. Sebagai kontrol donor (*E. coli*) dan resipien (Cv) diinkubasikan dalam tabung Eppendorf terpisah yang mengandung pula agar nutrien 1.5%. Inkubasi dilakukan antara 4-8 jam pada suhu ruang atau sekitar 28°C. Setelah inkubasi selesai dilakukan pengenceran 10^{-5} - 10^{-7} dan disebar pada media nutrien yang mengandung 10 µg

ANALISIS TRANSKONJUGASI

/mL dan rifampisin 25 µg/mL. Kontrol donor dan resipien, tanpa diencerkan, disebar juga pada media yang sama. Inkubasi dilakukan sesuai dengan prosedur kultivasi Cv selama 48 jam. Frekuensi transkonjugasi dihitung berdasarkan jumlah koloni yang tumbuh dibandingkan dengan donornya (kontrol positif). Prosedur yang sama dilakukan untuk konjugasi dengan donor *E. faecalis* CG 120::Tn916.

Isolasi Plasmid

Kultur sel *E. coli* yang telah ditumbuhkan pada suhu 37°C semalam secara aerobik, dimasukkan ke dalam 1.5 mL tabung Eppendorf. Sel-sel bakteri dikumpulkan melalui sentrifugasi 5000 rpm selama 2 menit. Supernatannya kemudian dibuang dan pelet yang tertinggal di resuspensi dalam 110 µL larutan A (1.8 g glukosa, 4 mL 0.5 EDTA dan 5 mL 1 M Tris-Cl pH 8.0 dalam 200 mL akuabides). Campuran ini didiamkan pada suhu ruang selama 5-10 menit. Sementara menunggu, larutan B dibuat dalam tabung reaksi steril dengan mencampurkan 4.25 mL akuabides steril, 0.5 mL 10% SDS dan 0.25 mL 4 N NaOH. Setelah inkubasi dalam larutan A, tabung mikro tersebut ditambahkan 200 µL larutan B dan disuspensikan secara perlahan sampai terjadi lisis (larutan menjadi bening dan kental) dengan membalik-balikkan tabung. Kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 0°C di atas es selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan larutan C dingin (600 mL 5 M KCl, 11.5 mL Hac glasial dan 28.5 mL akuabides steril) sebanyak 150 µL, lalu divorteks selama 10 detik dan diinkubasi pada suhu 0°C di atas es selama 5-10 menit. Larutan kemudian disentrifugasi 5000 rpm selama 3 menit dan supernatan dipindahkan pada tabung Eppendorf steril lainnya. Lalu ditambahkan 0.5 mL campuran fenol : kloroform : isoamialkohol (25 : 24 : 1) dan divorteks sebentar sampai terbentuk suspensi, lalu disentrifugasi 500 rpm selama 5 menit. Supernatan (fase cair sebelah atas) dipindahkan kembali pada tabung Eppendorf steril yang baru. Diusahakan untuk mengambil sebanyak mungkin supernatan tanpa terkontaminasi fenol pada lapisan interfase. Kemudian ditambahkan 1 mL etanol absolut dingin, dicampurkan dan diinkubasi pada suhu -20°C paling sedikit 10 menit. Sesudah itu disentrifugasi pada 5000 rpm selama 5 menit. Supernatannya dibuang dan pelet yang berisi DNA, RNA stabil dan sedikit protein kontaminan, dibilas dengan menambahkan 700 µL 70% etanol dingin. Setelah 70% etanol dibuang, pelet dikeringudarkan atau dengan menggunakan pompa vakum. Pelet kemudian disuspensikan dalam 60 µL 1 x TE pH 8.0 dan disimpan pada suhu -20°C.

Pemotongan DNA Plasmid dengan Enzim Restriksi *EcoRI*

Komponen-komponen sebagai berikut dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril:

DNA (μL)	10x Bufer (μL)	Enzim Restriksi/ 5 unit (μL)	Akuabides streil (μL)	Total Volume (μL)
Plasmid (5)	2	0	13	20
Plasmid (5)	2	1	12	20

Proses pencampuran komponen-komponen tersebut dilakukan di atas es. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C atau sesuai dengan suhu optimumnya selama minimum 2 jam. Setelah inkubasi ditambahkan $5 \mu\text{L}$ blue juice dan dipanaskan dalam penangas air pada suhu 65°C selama 5 menit, atau langsung dipanaskan selama 30 menit pada suhu 65°C .

Elektroforesis Gel Mini dan Visualisasi DNA

Gel agarose 0.8% dibuat dalam larutan 1x TAE steril. Satu liter 1x TEA dibuat dari 88 mL stock 50x TAE (242 g Tris, 37.2 g Na₂EDTA dan 56.1 mL asam asetat glasial dalam 1 L akuabides). Agarose dilarutkan dengan penangas dan didinginkan hingga 50°C sebelum dituang dalam cetakan gel mini dilengkapi serupa sisir untuk membuat sumur tempat DNA contoh. Setelah agarose membeku, lalu diletakkan dalam wadah elektroforesis dan digenangi dengan bufer 1x TAE. DNA contoh dimasukkan ke dalam sumur-sumur cetakan. Penanda berat molekul DNA yang digunakan adalah DNA marker II atau λ - Hind III (Boehringer - Mannheim). Sementara sebagai kontrol ialah DNA plasmid pJL 1703 yang didigesti dengan *EcoRI*. Elektroforesis dilakukan pada 100-110 mA selama lebih kurang 1-3 jam. Gel kemudian dicelupkan ke dalam wadah berisi akuabides yang telah dicampurkan Etidium Bromida $3 \mu\text{g/mL}$ selama 5-10 menit dan dibilas sekitar 5 menit dalam akuabides. Selanjutnya pita-pita DNA diamati melalui transiluminator UV. Foto gel dilakukan dengan kamera polaroid.

Hasil Penelitian

Resisten Cv terhadap Antibiotik

Hasil uji resistensi Cv terhadap antibiotik terdapat pada Tabel I.

Tabel I. Resistensi Cv terhadap Antibiotik

Antibiotik	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Koloni yang tumbuh
1. Ampisilin	100	+
	250	+
2. Kloramfenikol	50	-
3. Eritromisin	50	-
4. Kanamisin	25	-
5. Rifampisin	25	-
6. Spektinomisin	50	-
7. Streptomisin	50	-
8. Tetrasiklin	10	-
9. Trimetoprim	100	-

Cv Rf

Sejumlah 3 koloni yang resisten terhadap rifampisin 25 g/mL diperoleh pada hari ketiga dan hari selanjutnya digores ulang pada media yang sama.

Frekuensi Transkonjugasi Tn916 ke dalam Genom Cv

Nilai frekuensi transkonjugasi yang diperoleh hanyalah dari hasil *mating* antara *E. coli* CG110 (pAM120::Tn916) dan *C. violaceum*, yaitu 2.5×10^{-5} . Sementara konjugasi antara *E. faecalis* CG 120:Tn916 dan *C. violaceum* dengan penanda resistensi antibiotik Rf tidak memperlihatkan hasil.

Isolasi Plasmid dari Cv

Usaha mengisolasi plasmid dari Cv dilakukan dua kali dengan menggunakan kit dan metode lisis alkali secara konvensional (lihat Metode Penelitian). Keduanya memperlihatkan bahwa Cv tidak mempunyai plasmid, paling tidak dengan ukuran kurang dari 50 Kb.

Pembahasan

Cv sensitif terhadap hampir semua antibiotik yang diuji kecuali ampisilin. Kemungkinan hal ini disebabkan belum pernah terpaparnya galur Cv ini terhadap berbagai antibiotik. Sementara itu ketahanannya terhadap ampisilin dengan konsentrasi tinggi mungkin terjadi secara alamiah, karena Copper, *et al.* (1985) telah mengindikasikan adanya senyawa yang bekerja secara sinergis dengan antibiotik beta-laktam, salah satunya adalah ampisilin. Penelitian ini juga mengindikasikan bahwa ampisilin digunakan untuk proses kehidupannya atau ketidakmampuan sel-selnya melakukan pembelahan akibat tidak disuplainya komponen dinding sel, seperti yang terlihat dari penampilan morfologi koloni Cv yang lebih besar, mengkilat dan "segar" pada konsentrasi ampisilin yang lebih tinggi (200 $\mu\text{g/mL}$). Dengan demikian mungkin enzim beta-laktamase yang dihasilkan tidak semata-mata bekerja memotong/merusak ampisilin, tetapi berperan dalam metabolisme lain yang belum diketahui, bila ampisilin tetap bekerja menghalangi sintesis komponen peptidoglikan.

Mutan spontan terhadap rifampisin diharapkan mampu menjadi penanda konjugasi. Karena mekanisme penghambatan rifampisin terhadap RNA polimerase, maka diharapkan rifampisin mampu menjadi selektor kuat terhadap donor. Ternyata tidak mudah memperoleh mutan spontan terhadap rifampisin, yang diperlihatkan dari hanya 3 koloni yang diperoleh setelah berulang kali dilakukan penggoresan dan penyebaran sel-sel Cv konsentrasi tinggi pada media tumbuh. Kendala yang dihadapi dalam penelitian ini ialah pemeliharaan Cv yang dilakukan dengan cara mensubkultur biakan berulang-ulang pada agar miring dalam tabung reaksi, sehingga viabilitasnya menjadi berkurang dan secara genetik stabilitasnya tidak dapat dicapai. Akibat yang nampak ialah frekuensi transkonjugasi pada galur Cv yang resisten terhadap rifampisin tidak dapat dikalkulasikan, karena koloni pada media pengenceran hasil *mating* resipien tidak ada yang tumbuh. Dari dua kali ulangan dengan menggunakan galur tahan rifampisin tidak memberikan hasil. Sementara satu-satunya yang dapat dihitung frekuensi transkonjugasinya ialah *mating* antara *E. coli* dengan Cv dengan penanda ketahanan terhadap antibiotik ampisilin 250 $\mu\text{g/mL}$, yaitu sebesar 2.5 transkonjugan setiap 100.000 sel resipien. Namun fenomena yang menarik diperlihatkan oleh tidak terespresinya pigmen ungu. Mulanya diharapkan pigmen ungu, *violacein*, yang diproduksi Cv diharapkan menjadi penanda seleksi terhadap transkonjugan, karena telah diketahui bahwa frekuensi mutan spontan *E. coli* terhadap ampisilin cukup tinggi. Akibatnya ialah terjadi kesulitan pengamatan antara koloni *E. coli* dan koloni Cv tanpa pigmen yang mirip satu sama lain. Dari pewarnaan Gram hasil transkonjugasi ternyata tidak banyak diinterpretasikan dengan jelas yang mana sel-sel *E. coli* dan Cv, namun dugaan adanya campuran sel-sel

ANALISIS TRANSKONJUGASI

kedua bakteri semakin kuat. Kemungkinan lain sehingga donor dapat tumbuh pada media dengan konsentrasi ampisilin tinggi ialah karena ampisilin telah lebih dulu didegradasi oleh Cv, sehingga sel-sel *E. coli* yang semula statis (tidak mati atau rusak) mampu bertahan dan bahkan tumbuh. Karena itu diperkirakan frekuensi transposisi Tn916 ke dalam genom Cv lebih kecil dari 2.5×10^{-5} .

Sebagai langkah alternatif diupayakan untuk melakukan *plasmid typing* untuk menentukan bahwa transkonjugasi ialah Cv. Sebelumnya tidak ditemukan laporan mengenai terisolasinya plasmid dari Cv, karena itu dilakukan upaya mengisolasi plasmid Cv. Ternyata dari hasil elektroforesis memperlihatkan bahwa Cv tidak memiliki plasmid. Namun hasil elektroforesis yang divisualisasi dengan etidium bromida memperlihatkan adanya fragmen DNA Cv yang masih berada dalam sumur tempat awal elektroforesis. Kemungkinan besar fragmen DNA itu ialah fragmen kromosom yang ikut terambil saat isolasi plasmid, atau mega plasmid/plasmid berukuran raksasa yang karena ukurannya tidak dapat dipisahkan dengan metode elektroforesis yang digunakan. Mega plasmid dapat diisolasi dengan menggunakan cara tersendiri.

Kesimpulan

Galur Cv yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi FK Ukrida ternyata tahan terhadap antibiotik ampisilin bahkan hingga konsentrasi $250 \mu\text{g/mL}$. Sehingga ketahanannya terhadap ampisilin dapat digunakan untuk penanda seleksi terhadap konjugasi. Selain itu mutasi spontan terhadap rifampisin juga berhasil memperoleh tiga koloni, sehingga antibiotik rifampisin dapat dijadikan penanda untuk konjugasi pada mutan Cv ini. Nilai frekuensi transkonjugasi Tn916 yang diperoleh dari percobaan ini ialah 2.5×10^{-5} . Sementara upaya untuk mengisolasi plasmid malah memperlihatkan bahwa Cv tidak memiliki plasmid.

Saran

Pemeliharaan kultur bakteri di Laboratorium Mikrobiologi FK Ukrida perlu ditingkatkan dengan pertimbangan untuk memelihara stabilitas materi genetik galur-galur bakteri yang dikoleksi. Penelitian selanjutnya ialah menguji (verifikasi) apakah benar Tn916 telah menyisip ke dalam genom Cv dan bagaimana pola atau perilaku penyisipannya? Setiap transkonjugan yang diperoleh dari hasil mutagenesis *in vivo* ini dapat diseleksi terhadap gen yang kita inginkan, termasuk gen-gen yang potensial untuk kepentingan terapi medis dan industri farmasi ataupun industri kimia

lainnya. Sementara ini untuk mengetahui apakah Cv benar memiliki plasmid berukuran raksasa, maka perlu dilakukan isolasi megaplasmid dengan cara yang berbeda dari teknik umum isolasi plasmid berukuran kurang dari 50 Kb.

Kepustakaan

1. Cooper, R., et al., *Novel potentiators of beta-lactam antibiotics. Isolation of SQ28,504 and SQ28,546 from Chromobacterium violaceum*, J. Antibiot. (Tokyo) 38 (4):449-454, 1985.
2. Duran, N., et al., *Bacterial chemistry-III: preliminary studies on trypanosomal activities of Chromobacterium violaceum products*, An. Acad. Bras. Cienc. 61(1):31-36, 1989.
3. Parker, W.L., et al., *Aerocyanidin, a new antibiotic produced by Chromobacterium violaceum*, J. Antibiot. (Tokyo) 41(4):454-460, 1988.
4. Singh, P.D., et al., *Aerocavin, a new antibiotic produced by Chromobacterium violaceum*, J. Antibiot. (Tokyo) 41(4):446-453, 1988.
5. Taylor, K.L. and G. Churchward., *Specific DNA cleavage mediated by the integrase of conjunctive transposon Tn916*, J. Bacteriol, 179(4):1117-1125, 1997.
6. Ti, T.Y., et al., *Nonfatal and fatal infections caused by Chromobacterium violaceum*, Clin. Infect. Dis, 17(3):505-507, 1993.
7. Ueda, H., et al., *Action of FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by Chromobacterium violaceum no. 968, on Ha-ras transformed NIH3T3 cells*, Biosci. Biotechnol, Biochem, 58(9):1579-1583, 1994.