

KAJIAN PENDAHULUAN UJI TOKSISITAS EKSTRAK AIR MISELIA DAN TUBUH BUAH JAMUR SHIITAKE (*Lentinus edodes*) DENGAN METODE BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BST)

Noor Erma NS*, Tri Sundari**, Arie Ika Susanty**, Dwi Riani Octavia Palupi*, Isnaeni*, Sukardiman*

*Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

Jl. Dharmawangsa Dalam Surabaya 60286

**Kementerian Riset dan Teknologi Republik Indonesia

Jl. M. H. Thamrin No. 8 Jakarta 10340

ABSTRACT

Shiitake mushroom (Lentinus edodes) is one of the wood mushroom types that can be consumed as a food as well as for a medical purpose. Lentinan, a polysaccharide contained in shiitake, is well known for its use on cancer medication. Mycelium of Shiitake mushroom contains lentinan the same as other part of the mushroom like fruity body. Toxicity of the lentinan in mycelium compare to the fruity body has been first conducted by using Brine Shrimp Lethality Test (BST). Using Potato Dextrose Broth media with the growth rate of 3.88% did mycelium multiplications. Probit analysis showed that the toxicity of the mushroom's cap, stem, and mycelium of Shiitake mushrooms is $LC_{50} = 648.76507$ mg/ml $LC_{50} = 489.39444$ mg/ml, and $LC_{50} = 481.16941$ mg/ml respectively.

Key words: *Shiitake (Lentinus edodes)*, brine shrimp lethality test (BST), and lentinan

PENGANTAR

Indonesia sebagai negara beriklim tropis mempunyai potensi besar bagi pengembangan bahan baku obat (Leswara *et al.*, 1987). Salah satu di antaranya adalah pengembangan beberapa jenis jamur yang mempunyai khasiat sebagai obat. Spesies jamur yang tersebar di dunia diperkirakan mencapai 140.000, dan hanya 10% yang sudah dikenal. Jamur merupakan sumber kekuatan yang sangat besar, tetapi belum banyak digunakan dalam dunia pengobatan terutama pengobatan modern.

Shiitake (*Lentinus edodes*) merupakan jamur yang dapat digunakan sebagai makanan sekaligus pengobatan sejak masa Dinasti Ming (1368–1644) (Jones, 1997). Jamur ini mempunyai dua macam galur, yaitu galur dingin yang dapat menghasilkan tubuh buah pada suhu 12–18°C, dan galur tropis yang dapat menghasilkan tubuh buah pada suhu 20–22°C (Aryantha, 1998). Jamur shiitake mempunyai kandungan kolesterol rendah, dapat menghambat pertumbuhan virus dan tumor, mengatur fungsi imun dan menstimulasi produksi interferon (Suhardiman, 1998; Suzuki *et al.*, 1990).

Budidaya shiitake dapat dilakukan secara alami pada berbagai media antara lain pokok kayu, budidaya dalam kantong plastik (log), dan dalam media cair. Pertumbuhan jamur dalam media cair lebih cepat dibandingkan media lain. Jamur yang ditanam pada media padat akan tumbuh dalam waktu lebih kurang 4–5 bulan, sedangkan jamur yang ditanam pada media cair akan tumbuh dalam waktu lebih

kurang 1–2 bulan. Budidaya menggunakan media cair memiliki beberapa keuntungan antara lain pengerjaannya lebih mudah, tidak memerlukan tempat yang luas dalam penyimpanan, tidak mudah terkontaminasi, dan dapat dipindah ke dalam skala besar (Suhardiman, 1998). Media cair dibuat dengan memanfaatkan bahan lokal, misalnya apel, tomat, kentang, dan taoge. Bahan-bahan tersebut mempunyai kandungan protein, vitamin, dan mineral yang tinggi, tetapi harganya relatif murah.

Kandungan kimia jamur shiitake yang berkhasiat dalam pengobatan adalah lentinan, eritadenin, KS-2, Ac2P, dan LAPI (Suriawiria, 2001). Berdasarkan penelitian Fujii *et al.* (1978), miselia jamur shiitake juga mempunyai kandungan kimia yang dapat digunakan sebagai obat (antitumor), yaitu polisakarida yang disebut lentinan dan KS-2. Hasil penelitian di Jepang menunjukkan bahwa lentinan dapat menstimulasi sel T (suatu makrofag teraktivasi), serta dapat menstimulasi "Natural Killer" atau *NK cell* (suatu tipe sel imun yang berperan penting dalam perusakan tumor dan virus). Kedua sel tersebut mempunyai aktivitas antikanker melalui stimulasi interferon. Interaksi antara interferon dengan sel NK bermakna dalam pengertian kemampuan tubuh untuk menghambat sel kanker dan bersifat persisten terhadap virus (Jones, 1997), sedangkan KS-2 dapat menekan pertumbuhan tumor sarcoma 180 pada tikus secara oral maupun intraperitoneal (Fujii *et al.*, 1978).

Penelitian Tetsuro Ikekawa menunjukkan bahwa aktivitas antikanker yang dilakukan dengan menginjektikan

ekstrak air tubuh buah dan miselia jamur shiitake pada perut tikus yang diimplantasi secara intramuskular dengan tumor sarcoma 180 mempunyai rata-rata penghambatan terhadap tumor yang berbeda. Tubuh buah dan miselia jamur shiitake mempunyai rata-rata hambatan terhadap pertumbuhan masing-masing sebesar 80,70% dan 97,3% (Jones, 1997).

Brine Shrimp Lethality Test (BST) merupakan salah satu metode yang digunakan untuk penapisan awal senyawa-senyawa yang diduga berkhasiat sebagai antikanker. Metode ini menggunakan larva *Artemia salina*. Besarnya toksisitas diketahui berdasarkan jumlah kematian larva akibat pemberian ekstrak yang mengandung senyawa antikanker. Ekstrak bersifat toksik bila harga LC_{50} -nya < 1000 mg/ml, sedangkan untuk senyawa murni aktif bila LC_{50} -nya < 200 mg/ml (Meyer *et al.*, 1982). Metode ini mempunyai beberapa keuntungan antara lain, waktu pelaksanaan cepat, biaya relatif murah, pengerjaan sederhana, tidak memerlukan teknik aseptik, tidak memerlukan peralatan khusus, menggunakan sampel dalam jumlah relatif sedikit dan tidak memerlukan serum hewan seperti pada uji sitotoksik (Meyer *et al.*, 1982). Metode lain yang dapat digunakan antara lain uji hambatan tumor pada lempeng kentang atau *Potato Disk Crown Gall Tumour Inhibitory Assay*, uji proliferasi kuncup *Lemna* atau *Fond Proliferation Assay*, uji sitotoksik *in vitro* dan *in vivo* (Dendy, 1976).

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan toksisitas tubuh buah (tudung dan batang) dan miselia jamur Shiitake melalui uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BST).

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Bibit jamur shiitake (*Lentinus edodes*) diperoleh dari Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Negeri Surabaya, tubuh buah diperoleh dari kubung jamur Fakultas Farmasi Universitas Airlangga di Junggo, Batu dan telah dideterminasi oleh Herbarium Bogoriensis Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi LIPI Bogor, dan larva udang laut (*Artemia salina*) diperoleh dari Laboratorium Botani Farmakognosi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Bahan media tanam miselia terdiri atas glukosa teknis, agar (*food grade*), dan kentang yang diperoleh dari pasar tradisional, sedangkan media tanam tubuh buah terdiri atas serbuk gergaji, bekatul, dan $CaCO_3$. Bahan kimia yang digunakan terdiri atas etanol 96% teknis, aseton teknis, etil eter teknis, CMC 5%, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (p.a/Merck), NaCl (p.a/Merck), $NaHCO_3$ (p.a/Merck), KCl (p.a/Merck), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (p.a/ Merck), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (p.a/Riedel-de Haen).

Alat

Alat yang digunakan adalah autoklaf (*Pressure Steam Sterilizer made in China*), timbangan analitik (Sartorius BL 2105), *Direct Reading Micro Balance* (Shimadzu), oven (Venticel 222), *sentrifuge* (Hettich 2002), *disposable pipette*, mikropipet (Socorex).

Kecepatan Pertumbuhan Miselia

Pembuatan *starter* inokulum: satu \ddot{O} se bibit diinokulasikan ke dalam media PDA miring, kemudian diinkubasi selama 14 hari pada suhu kamar. Satu \ddot{O} se miselia yang tumbuh diinokulasikan ke dalam botol yang berisi 10 ml media *Potato Dextrose* cair, diinkubasi pada suhu kamar dengan pengocokan kontinu selama 14 hari. Miselia yang dihasilkan dipindahkan secara aseptis ke dalam 20 ml media *Potato Dextrose* cair dan diinkubasi selama 1 bulan (Di Lena & Sermanni, 1994). Miselia *starter* disaring aseptis dan ditimbang sebanyak 0,5 g, kemudian diinokulasikan ke dalam botol yang be risi 20 ml media *Potato Dextrose* cair. Diinkubasi pada suhu kamar dengan pengocokan kontinu sampai fase stasioner.

Uji toksisitas dilakukan dengan metode BST. Sampel terlebih dahulu ditentukan kadar air berdasarkan prosedur yang tertera dalam Farmakope Indonesia edisi IV (Anonim, 1995).

Uji Toksisitas

1. Ekstraksi

Sebanyak 100 g tubuh buah dan 100 g miselia basah masing-masing diekstraksi dengan 60 ml air, dipanaskan selama 3 jam pada suhu $100^\circ C$, kemudian disaring. Filtrat ditambah etanol 99% sebanyak 4 kali volume filtrat, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Endapan dicuci tiga kali dengan etanol 99%, kemudian aseton, dan terakhir dengan etil eter masing-masing 5 ml. Endapan dikeringkan, kemudian ditimbang.

2. Pembuatan larutan induk dan larutan uji

Larutan induk dibuat dengan menimbang 20 mg ekstrak kering, kemudian ditambah 2,0 ml air, dicampur sampai homogen, kemudian diencerkan menjadi tiga macam konsentrasi, yaitu 10, 100, dan 1000 ppm. Masing-masing konsentrasi dilakukan replikasi sebanyak tiga kali dan satu uji kontrol, kemudian pelarut masing-masing larutan dibiarkan menguap terlebih dahulu dalam oven pada suhu $50^\circ C$ selama lebih kurang dua hari (McLaughlin, 1991).

3. Persiapan larva udang laut

Air laut dimasukkan ke dalam wadah kecil yang sudah dibagi menjadi 2 bagian ruangan dengan menggunakan

sekat, dalam hal ini digunakan air laut buatan. Sejumlah tertentu telur udang laut dimasukkan ke dalam salah satu ruang, kemudian bagian ruang ini ditutup. Sisi yang lain dibiarkan terbuka atau diberi lampu untuk menarik udang yang telah menetas melalui lubang sekat, sehingga larva udang terpisahkan dari bagian telur atau kulit telur. Setelah dua hari, telur udang laut akan menetas menjadi udang laut kecil yang disebut *nauplii* dan siap digunakan untuk penelitian (McLaughlin, 1991).

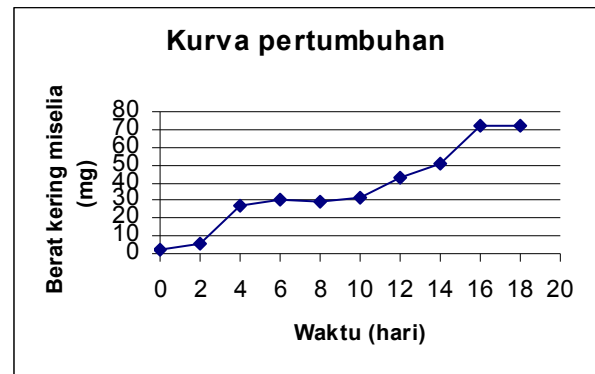
4. Uji toksisitas

Sebanyak 5 ml air laut dan 10 ekor larva udang laut dimasukkan ke dalam masing-masing botol larutan uji yang berisi ekstrak kering dalam beberapa konsentrasi. Ekstrak yang sukar larut dalam air laut, terlebih dahulu ditambahkan DMSO dengan batas penggunaan 50 ml per 5 ml air laut. Larutan kontrol terdiri atas 5 ml air laut yang berisi 10 ekor larva udang laut. Setelah 24 jam, jumlah larva udang yang mati untuk tiap-tiap konsentrasi dihitung dan dicatat. Bila dalam larutan kontrol terdapat larva udang laut yang mati, maka jumlah larva udang yang mati pada tiap-tiap konsentrasi dikurangi jumlah larva udang laut yang mati pada larutan kontrol (McLaughlin, 1991).

HASIL

Hasil penimbangan berat kering miselia jamur shiitake yang ditumbuhkan pada media *Potato Dextrose* cair dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 1.

Pengamatan pertumbuhan dilakukan setiap 2 hari sampai hari ke-18, karena pada hari ke-16 pertumbuhan miselia sudah berada pada fase stasioner. Hasil pengamatan pertumbuhan digambarkan melalui kurva pertumbuhan antara waktu pengamatan (hari) dengan berat kering miselia (mg), yang dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan miselia jamur shiitake pada media *Potato Dextrose* cair

Indeks pertumbuhan miselia diukur setiap 2 hari sesuai dengan hari pengamatan pertumbuhan miselia dengan rumus:

$$IP = \frac{\text{Berat Kering Miselia Akhir}}{\text{Berat Kering Miselia Awal}}$$

Laju pertumbuhan miselia pada media *Potato Dextrose* cair rata-rata sebesar 3,88 mg/hari dengan indeks pertumbuhan seperti tercantum pada Tabel 2.

Sebelum dilakukan uji toksisitas, dilakukan pengukuran kadar air miselia dan tubuh buah jamur shiitake menurut Farmakope Indonesia edisi IV. Hasil pengukuran kadar air ditunjukkan pada Tabel 3.

Hasil pengamatan uji toksisitas tudung, batang, dan miselia jamur shiitake dapat dilihat pada Tabel 4.

Hasil pengamatan uji toksisitas ekstrak tubuh buah (tudung dan batang) dan miselia jamur shiitake yang diperoleh, dianalisis dengan analisis probit menggunakan

Tabel 1. Hasil penimbangan berat kering miselia jamur shiitake pada media *Potato Dextrose* cair setiap 4 hari

Replikasi	Berat miselia kering (mg) pada hari ke-					
	H ₀	H ₄	H ₈	H ₁₂	H ₁₆	H ₁₈
1	2,40	15,35	41,00	43,83	77,40	87,50
2	2,70	22,25	42,05	45,95	67,70	76,00
3	1,40	18,80	17,45	40,55	*52,10	62,55
4	0,80	30,87	41,53	44,89	72,55	62,80
5	3,35	49,10	21,10	38,00	*88,25	
Rata-rata	2,13	27,27	29,46	42,64	72,55	72,21
SD	1,02	13,50	13,43	3,29	4,85	11,97

Keterangan: (*) merupakan data pengamatan yang tidak digunakan, karena tidak memenuhi syarat aturan 2,5d (Underwood and Day, 1977).

Tabel 2. Data indeks pertumbuhan miselia jamur shiitake

	Hari Pengamatan								
	H ₂	H ₄	H ₆	H ₈	H ₁₀	H ₁₂	H ₁₄	H ₁₆	H ₁₈
Berat Akhir	5,48	27,27	29,91	29,46	31,63	42,64	50,37	72,55	72,21
Berat Awal	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13
IP	2,57	12,80	14,04	13,83	14,85	20,02	23,65	34,06	33,91

Keterangan : H₂₋₁₈ = Pengamatan pada hari kedua sampai hari kedelapan belas

Tabel 3. Hasil pengukuran kadar air miselia, tudung, dan batang jamur shiitake

		Berat Basah (g)	Berat Kering (g)	Kadar Air (%)
miselia jamur shiitake	Rata-rata	0,1075	0,0108	90,3866
	SD	0,0299	3,25E10 ⁻³	0,1328
tudung jamur shiitake	Rata-rata	0,4977	0,0592	88,1200
	SD	3,5E-3	2,1E-3	0,3550
batang jamur shiitake	Rata-rata	0,4971	0,0626	87,3433
	SD	1,00E-3	0,0105	2,1796

Tabel 4 Hasil pengamatan uji toksisitas tudung, batang dan miselia jamur shiitake

Jenis	Konsentrasi (ppm)	Replikasi	Jumlah larva udang yang diuji	Jumlah larva udang yang mati setelah perlakuan
Tudung jamur shiitake	10 ppm	I	30	5
		II	30	9
		III	30	10
	100 ppm	I	30	10
		II	30	11
		III	30	15
	1000 ppm	I	30	17
		II	30	19
		III	30	17
Batang jamur shiitake	10 ppm	I	30	7
		II	30	8
		III	30	7
	100 ppm	I	30	11
		II	30	15
		III	30	12
	1000 ppm	I	30	20
		II	30	21
		III	30	21
Miselia jamur shiitake	10 ppm	I	30	11
		II	30	8
		III	30	7
	100 ppm	I	30	15
		II	30	16
		III	30	13
	1000 ppm	I	30	17
		II	30	20
		III	30	20

program SPSS untuk menentukan harga LC₅₀. Harga LC₅₀ ekstrak tubuh buah dan miselia jamur shiitake ditunjukkan pada Tabel 5.

Harga LC₅₀ antara tudung, batang, dan miselia jamur Shiitake selanjutnya dibandingkan melalui analisis variansi atau uji F dengan rancangan ambang lugas. Harga F hitung

Tabel 5 Data harga LC₅₀ ekstrak tudung, batang, dan miselia jamur shiitake

Jenis	Replikasi	Harga LC ₅₀ (ppm)
Tudung jamur shiitake	I	798,77728
	II	580,88933
	III	566,62859
Batang jamur shiitake	I	570,39607
	II	395,41528
	III	502,37197
Miselial jamur shiitake	I	518,09598
	II	402,94871
	III	522,46354

dibandingkan dengan F Tabel dengan derajat kepercayaan 95%. Analisis statistik menunjukkan bahwa harga F hitung (2,741) lebih kecil daripada F Tabel (4,46), sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara harga LC₅₀ tubuh buah (tudung dan batang) dengan miselia jamur shiitake.

PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan media *Potato Dextrose* cair sebagai media pertumbuhan miselia, karena media ini merupakan media umum untuk pertumbuhan jamur. Pengamatan pertumbuhan dilakukan setiap 2 hari sampai hari ke-18. Berdasarkan Tabel 1 dan Gambar 1, pertumbuhan miselia jamur shiitake pada media *Potato Dextrose* cair mengalami kenaikan pada hari kedua. Pada hari ke-4 sampai hari ke-10, pertumbuhan miselia tidak mengalami kenaikan yang bermakna. Pertumbuhan mengalami kenaikan kembali pada hari ke-12. Pengamatan pertumbuhan dihentikan pada hari ke-18, karena pada hari ke-16 pertumbuhan miselia sudah berada pada fase stasioner.

Ekstrak bersifat toksik apabila mempunyai harga LC₅₀ (konsentrasi yang dapat mematikan 50% larva udang laut) < 1000 mg/ml. Berdasarkan hasil perhitungan di atas, dapat disimpulkan bahwa ekstrak tubuh buah dan ekstrak miselia bersifat toksik. Hasil uji toksisitas menggunakan metode BST ini dapat diasosiasikan dengan sifat sitotoksik yang digunakan sebagai prasyarat senyawa antikanker. Sifat toksik tubuh buah dan miselia jamur shiitake dapat dijadikan pendukung ilmiah penggunaan tubuh buah dan miselia sebagai obat antikanker.

Kandungan jamur shiitake yang sudah diidentifikasi dan terbukti berkhasiat terapi antikanker adalah lentinan, meskipun masih terdapat zat aktif lain yang kemungkinan mempunyai aktivitas sebagai antikanker. Menurut Jones, kandungan lentinan pada miselia sebesar 53,5–59,3%, sedangkan pada tudung buah dan batang masing-masing sebesar 38,3–39,5% dan 48,7–51,6%.

Hasil penelitian uji toksisitas menggunakan metode BST menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan toksisitas antara tubuh buah dengan miselia. Penelitian Tetsuro Ikekawa menunjukkan bahwa tubuh buah dan miselia jamur shiitake memberikan rata-rata hambatan terhadap pertumbuhan tumor sarcoma 180 masing-masing sebesar 80,70% dan 97,3% (Jones, 1997). Apabila uji toksisitas dengan BST ini dianalogikan dengan uji aktivitas, maka ekstrak air miselia maupun tubuh buah jamur shiitake memberi harapan untuk dapat digunakan sebagai terapi anti kanker. Kandungan kimia jamur shiitake dipengaruhi oleh faktor genetik dan faktor lingkungan. Dalam hal faktor genetik, terdapat dua macam jamur shiitake, yaitu shiitake galur dingin yang dapat menghasilkan tubuh buah pada suhu 12–18° C, dan galur tropis yang dapat menghasilkan tubuh buah pada suhu 20–22° C (Aryantha, 1999). Penelitian di Jepang menggunakan jenis shiitake berasal dari daerah yang mempunyai musim dingin, sedangkan yang dilakukan di Indonesia menggunakan shiitake galur tropis. Faktor kedua adalah faktor lingkungan antara lain suhu, kelembaban, cahaya, dan nutrisi. Penelitian ini menggunakan media pertumbuhan *Potato Dextrose* cair sebagai nutrisi, sedangkan pada literatur tidak menyebutkan media yang digunakan. Perbedaan media dapat menyebabkan perbedaan keberadaan nutrisi yang dapat mempengaruhi proses biosintesis senyawa aktif yang ada pada tubuh buah maupun miselia.

Uji toksisitas menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) tidak spesifik untuk antikanker, akan tetapi dapat memberikan gambaran awal mengenai aktivitas terapi ekstrak yang diuji. Berdasarkan penelitian Meyer terhadap jenis Euphorbiaceae, dari 24 jenis yang aktif terhadap 9 PS (sel leukemia secara *in vitro*), 14 di antaranya toksik terhadap larva udang laut. Untuk memperoleh gambaran aktivitas terapi yang lebih nyata, sebaiknya dilakukan uji terhadap ekstrak air miselia dengan menggunakan metode yang lebih spesifik.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pertumbuhan miselia lebih cepat daripada tubuh buah jamur shiitake, sehingga akan menguntungkan jika miselia dapat menggantikan tubuh buah jamur shiitake sebagai obat antikanker. Tubuh buah (tudung dan batang) dan miselia jamur shiitake mempunyai toksisitas yang sama sesuai hasil uji BST.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan izin dan bantuan selama penelitian ini berlangsung, serta kepada semua pihak yang telah membantu menyelesaikan penelitian ini.

KEPUSTAKAAN

- Anonim, 1995. Farmakope Indonesia, Edisi ke-4. Departemen Kesehatan, Republik Indonesia, Jakarta, 1036.
- Aryantha INP, 1998. Pegangan dasar pelatihan budi daya jamur. PPAU Ilmu Hayati, Lembaga Penelitian ITB, Bandung, 10, 28.
- Dendy PP, 1976. Human Tumor in Short Term Culture Technique and Clinical Application, London: Academic Press.
- Di Lena G, Sermanni GG, 1994. Whey permeate as a growth medium for *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. *Letters in applied microbiology*, 19(5). Dipartimento di Agrobiologia ed Agrochimica, Università della Tuscia, Viterbo, Italy, 391–3.
- Fujii T, Maeda H, Suzuki F, Ishida N, 1978. Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *The Journal of antibiotics*, 31(11). November, Japan Antibiotics Research Association, Tokyo.
- Jones K, 1997. Shiitake the healing mushroom. Rochester: Healing Arts Press, 14, 22–3, 36, 37.
- Leswara ND, Atmadja J, Mansur U, Yenis S, Radji M, and Soemiati A, 1987. Antibacterial and brine shrimp bioassay of ethanolic extract of some Indonesian mangrove plants, In: Udomkokpol (ed). *Proceedings of UNESCO Regional Seminar On The Chemistry of Mangrove Plants*. Chulalongkorn University, Bangkok. 155.
- McLaughlin JL, 1991. Crown gall tumours on potato disc and brine shrimp lethality: Two Simple Bioassay for Higher Plant Screening and Fractionation. *Methods in plant biochemistry*, Vol. 6, Indiana: Academic Press, p. 1–30.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, and McLaughlin JL, 1982. Brine Shrimp: A Convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica*, 45: p. 31–4.
- Suhardiman P, 1998. Budi daya Jamur Shiitake. Yogyakarta: Kanisius, hal. 11, 15–7, 21, 35–6, 51, 62.
- Suriawiria U, 2001. *Budi daya Jamur Shiitake*. Jakarta: Penebar Swadaya. hal. 1, 2, 4.
- Suzuki H, Iiyama K, Yoshida O, Yamazaki S, Yamamoto N, and Toda S, 1990. Structural characterization of the immunoactive and antiviral water-solubilized lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM). *Agriculture biology chemistry*. Februari, 54(2) p. 479–87.
- Underwood AL, Day, RA, 1997. Quantitative Analysis, 3rd Ed. New Delhi, p. 56.
- <http://www.link.springer.de/link/service/journals>
<http://www.mikei.com>

Reviewer: **Dr. Ni'matuzahroh**