

**POTENSI EKSTRAK N-HEKSAN, DIKLOROMETANA, ETIL
ASETAT, DAN ETANOL 70% JAMUR DEWA (*Agaricus blazei*
Murill) TERHADAP SEL MCF-7**

Misgiati¹

¹Akademi Analisis Farmasi dan Makanan Putra Indonesia Malang

Email Korespondensi : faiz219@yahoo.co.id

ABSTRAK

Jamur dewa merupakan pangan fungsional. yang mempunyai aktivitas farmakologi, Kandungan metabolit sekunder mempunyai aktivitas sebagai antikanker. Tujuan penelitian ini untuk uji pendahuluan untuk mendapatkan bahan aktif yang mampu mempunyai aktivitas antikanker sel MCF-7. Tahapan penelitiannya ekstraksi bertingkat dengan beberapa pelarut. Ekstraksi menggunakan metode maserasi. Ekstrak yang dihasilkan diidentifikasi dan diuji aktivitas antikanker sel MCF-7. Identifikasi menggunakan metode KLT. Fase diam dengan silica GF254, fase geraknya n-heksana:etilasetat. Uji aktivitas antikanker menggunakan metode MTT. Hasil identifikasi masing masing ekstrak mengandung metabolit sekunder terpenoid. Aktivitas antikanker sel MCF-7 dengan IC_{50} ekstrak n-heksana 15.0923 $\mu\text{g/ml}$, ekstrak diklorometana 17.4213 $\mu\text{g/ml}$, ekstrak etil asetat 10.9132 $\mu\text{g/ml}$ dengan kriteria *strong cytotoxicity* sedangkan untuk ekstrak etanol IC_{50} 675, 1236 $\mu\text{g/ml}$.

Kata kunci : Jamur dewa, ekstraksi bertingkat, sel MCF-7

POTENTIAL EXTRACTS OF N-HEXANE, DICHLOROMETHANE, ETHYL ACETATE, AND 70% ETHANOL OF DEWA MUSHROOMS (*Agaricus blazei* Murill) ON MCF-7 CELLS

ABSTRACT

God mushroom is a functional food. It has pharmacological activity. This content has activity as an anticancer. The purpose of this study was to conduct a preliminary test to obtain an active ingredient capable of having anticancer activity on MCF-7 cells. The stages of the research are stratified extraction with several solvents. Extraction using maceration. The resulting extract was identified and tested for the anticancer activity of MCF-7 cells. The test uses the TLC method. The stationary phase with silica GF254, the mobile phase is n-hexane: ethyl acetate. Anticancer activity test using the MTT method. The results of the identification of each extract contained terpenoid secondary metabolites. Anticancer activity of MCF-7 cells with IC50 extract of n-hexane 15.0923 $\mu\text{g/ml}$, dichloromethane extract 17.4213 $\mu\text{g/ml}$, ethyl acetate extract 10.9132 $\mu\text{g/ml}$ with strong cytotoxicity criteria, while for ethanol extract IC50 675, 1236 $\mu\text{g/ml}$.

Keywords: *Jamur Dewa, extraction levels, MCF-7 cells*

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan jenis kanker kedua terbanyak pada wanita di seluruh dunia dan di Indonesia. Kanker payudara paling sering ditemukan setelah kanker mulut rahim. Data terbaru dari *American Cancer Society* selama tahun 2021 terdapat 284.200 kasus kanker payudara pada wanita dan pria. Sedangkan data pada tahun 2018 kejadian kanker

tertinggi untuk perempuan adalah kanker payudara yaitu sebesar 42,1 per 100.000 penduduk dengan rata-rata kematian 17 per 100.000 penduduk (Depkes RI, 2019). Pengobatan konvensional yang umum dilakukan dengan pembedahan, kemoterapi dan radioterapi. Pengobatan kanker secara pembedahan tidak dapat dilakukan khususnya pada sel kanker yang telah

menyebarkan (*metastasis*). Sementara pengobatan kemoterapi dan radiasi dapat menimbulkan efek samping, yaitu dapat membunuh sel selain sel kanker. Usaha pencarian obat antikanker dari bahan alam yang mempunyai target molekuler yang spesifik, selektifitas yang tinggi, dan efek samping minimum, amat diperlukan dalam pengobatan penyakit kanker.

Jamur dewa (*Agaricus blazei* Murill) merupakan jamur makroskopis dapat digunakan sebagai pangan fungsional dan mempunyai aktivitas sebagai antikanker, antihipertensi, antikolesterol, antivirus, antidiabetik, antioksidan, antibakteri, dan imunostimulan (Shimizu et al., 2016)(Misgiati M & Corebima AD, 2015)(Misgiati et al., 2021). Aktivitas tersebut berdasarkan penelitian secara *in vitro* maupun *in vivo*. Penelitian jamur dewa sebagai antikanker secara *in vitro* sudah banyak dilakukan, yaitu terhadap sel darah putih U937, MOLT4, HL-60, dan K-562 dengan IC_{50} 2.7; 9.4; 13.0; dan 16.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Akiyama & et al, 2011), sel tulang (HOS *cell line*) dengan IC_{50} 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Wu et al., 2012), sel prostat DU145 dan PC3 IC_{50} 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Yu et al., 2009). Jamur dewa mempunyai aktivitas

sebagai antikanker mengandung α -(1-6)-; α -(1-4)-glukan, β -(1-6)-; β -(1-3)-glukan, β -(1-6)-; α -(1-3)-glukan (Firenzuoli et al., 2008), ergosterol (Takaku et al., 2001)(Misgiati et al., 2021), blazein (Itoh et al., 2008), blazeispirol B, C, E dan F, ergostane (Hirotsu et al., 2002), agaritine (Akiyama et al., 2011). Penentuan aktivitas terhadap sel MCF-7 pada jamur dewa berdasarkan *Bioactivity guided fractionation* masih belum ditemukan. Sebagai pengujian pendahuluan untuk mendapatkan bahan aktif yang mempunyai aktivitas antikanker sel MCF-7 dilakukan pengujian terhadap beberapa pelarut untuk mengekstraksi bahan aktif yang terdapat pada jamur dewa. Pelarut yang digunakan adalah n-heksana, diklorometana, etilasetat, etanol 70%. Pelarut ini mewakili pelarut nonpolar, semipolar, dan polar. Tujuan penelitian ini untuk uji pendahuluan untuk mendapatkan bahan aktif yang mampu mempunyai aktivitas antikaner sel MCF-7.

METODE PENELITIAN

MATERIAL

Bahan uji/ simplisia yang digunakan adalah semua bagian jamur dewa kering

<https://doi.org/10.33759/jrki.v4i1.231>

diperoleh dari Industri Obat Tradisional Agaricus Sido Makmur, Lawang Malang dengan Surat Keterangan No 592/SKet/ASM/XII/2020. Adapun klasifikasi *Agaricus blazei* Murill menurut Peck C.H (1893) sebagai berikut:

Devisi : Basidio
Sub devisi : Eumycetes
Kelas : Agaromycetes
Sub Kelas : Holobasidiomycetes
Bangsa : Agaricales
Famili : Agaricaceae
Genus : Agaricus
Spesies/jenis : *Agaricus blazei* Murill
Sinonim *Agaricus blazei* Murill adalah *Agaricus subrufescens*, *Agaricus brasiliensis* (Kerrigan, W.R., 2008), Jamur dewa, dan Jamur ABM

Alat Dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat maserasi, evaporator, penyemprot noda, pipa kapiler, TLC visualizer (camag), cawan kultur, inkubator CO₂, laminar air flow, sentrifuge, vortex, botol, mikroplate, conical tube, autoklaf, vacuum flash, adaptor, hemositometer, mikroskop, ELISA reader panjang gelombang 580 nm

Bahan yang digunakan lempeng silika GF254, anisaldehyd, etilasetat, n-

heksana, diklorometana, etanol 70%, sel MCF-7, DMSO (Dimeti sulfoksida), PBS (Phospat Buffer Saline), Media M199, MTT (3-(4, 5-dimetiltiazole-2-il)-2, 5-difeniltetrazolium bromide).

Rancangan Penelitian

Ekstraksi

2 kg jamur dewa kering halus direndam dengan pelarut n-heksan selama 24 jam sambil diaduk, selanjutnya disaring. Filtrat ditampung, residu ditambah pelarut n-heksan direndam selama 24 jam, disaring. Perendaman akan dihentikan jika filtrat sudah tidak berwarna. Filtrat diuapkan dengan evaporasi sampai diperoleh ekstrak kental. Residu ekstrak n-heksana dilakukan maserasi dengan pelarut diklorometana. Begitu juga untuk residu diklorometana dilakukan maserasi pelarut etilasetat, serta residu etilasetat dilakukan maserasi dengan pelarut etanol 70%

Identifikasi

Terhadap ekstrak n-heksana, diklorometana, etilasetat, dan etanol 70% yang dihasilkan dilakukan kromatografi lapis tipis dengan menggunakan fase diam lempeng silika gel F254, fase gerak n-heksan:etil asetat (4:1). Profil KLT diamati dengan lampu

UV 254 nm, 366 nm, penampakan noda anisaldehyd/ asam sulfat 10%.

Aktifitas Antikanker

Berdasarkan CCRC (2013) metode pengujian aktifitas antikanker adalah sebagai berikut: Sel kanker MCF-7 ditanam pada mikrotiter 96 sumuran sebanyak $5 \cdot 10^3$ sel/ sumuran diinkubasi selama 48 jam pada media RPMI. Ditambahkan ekstrak (0 $\mu\text{g/ml}$; 3,375 $\mu\text{g/ml}$; 6,750 $\mu\text{g/ml}$; 12,500 $\mu\text{g/ml}$; 25 $\mu\text{g/ml}$; 50 $\mu\text{g/ml}$) dengan *co-solvent* DMSO (dimetil sulfoksida), selanjutnya diinkubasikan pada 37°C dalam inkubator CO₂ 5% selama 48 jam. Media RPMI dan ekstrak dibuang kemudian sel dicuci dengan PBS

(phospat buffer solution). Pada masing-masing sumuran, ditambahkan 10 μl preaksi MTT 5 mg/ml. Sel diinkubasikan selama 4-6 jam dalam inkubator CO₂ 5% 37°C. Reaksi MTT dihentikan dengan reagen asam isopropanol (HCl 4N dan isopropanol; 1:4), digoyang di atas shaker selama 10 menit. Serapan dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 550 nm.

Perhitungan IC₅₀

Perhitungan IC₅₀ (sitotoksik) adalah data absorbansi yang diperoleh dari uji sitotoksik dikonversi ke dalam persen sel hidup. Persen sel hidup dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{\text{Absorbansi sel dengan perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media sel}}{\text{Absorbansi kontrol media sel} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Dari data % sel hidup, dapat dihitung harga IC₅₀ dengan menggunakan persamaan regresi linier yang merupakan hubungan antara % sel hidup dengan kadar ekstrak/fraksi.

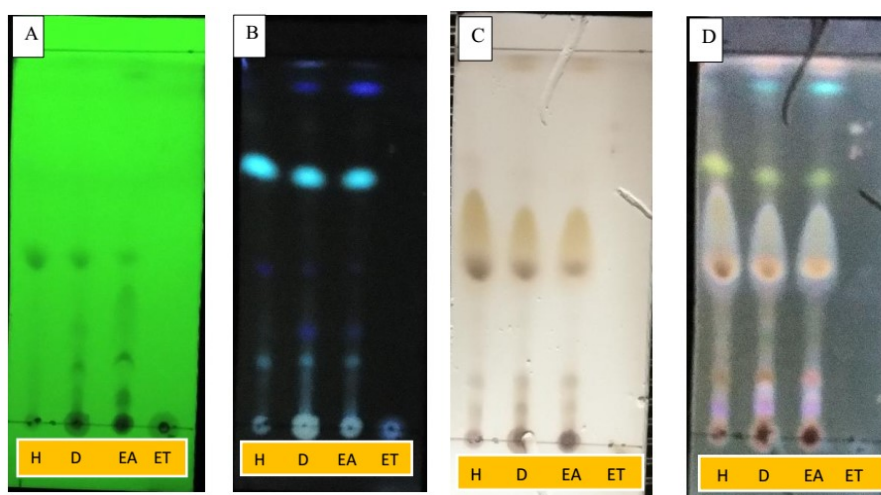
HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak yang dihasilkan berdasarkan ekstraksi bertingkat dari beberapa pelarut didapatkan berat ekstrak terdapat pada tabel 1

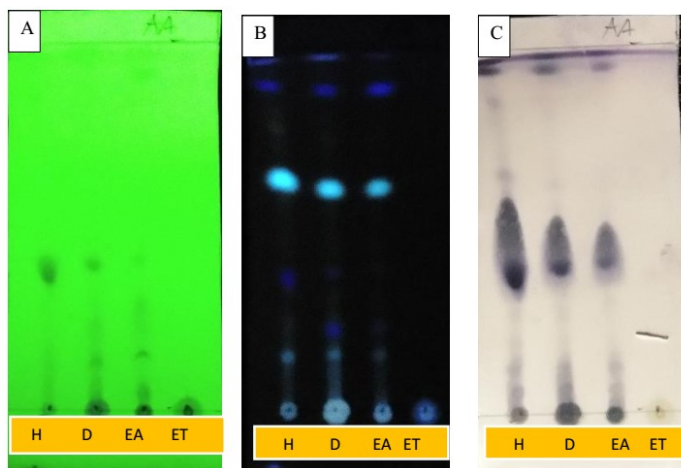
Berat ABM	Ekstrak	Berat Fraksi (Gram)	% Rendemen
2 kg	N-heksan/ H	19,6234	0,9812%
	Diklorometana/D	17,5765	0,8783%
	Etilasetat/ EA	19,9512	0,9972%.
	Etanol/ ET	249,9723	12,4981%

Berdasarkan ekstrak yang dihasilkan di atas dilakukan identifikasi dengan plat KLT silika GF254 dan eluen n-

heksana:etilasetat (4:1). Hasilnya terdapat pada gambar 1 dan 2 di bawah ini



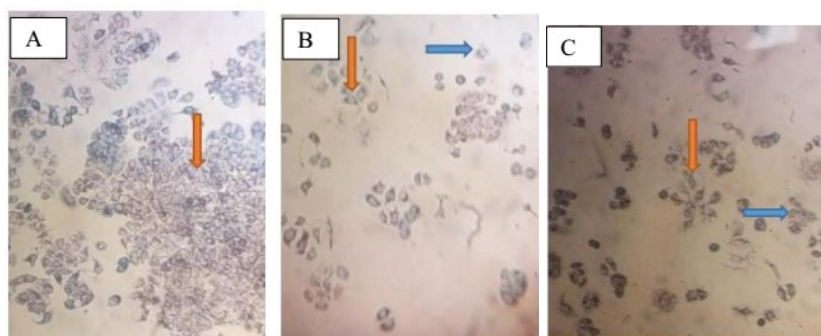
Gambar 1 Kromatogram hasil KLT Ekstrak n-heksan (H), diklorometana (D), etilasetat (EA), dan etanol (ET). Fase diam silika gel F₂₅₄ dan fase gerak n-heksan:etilasetat (4:1), dan setelah dieluasi dan dilihat dibawah lampu UV 254 nm (a); di bawah UV 366 (b); setelah disemprot dengan penampak noda H₂SO₄ 10% dan dipanaskan pada 105°C (c); setelah disemprot dan dipanaskan dilihat di bawah lampu UV 366 (d)

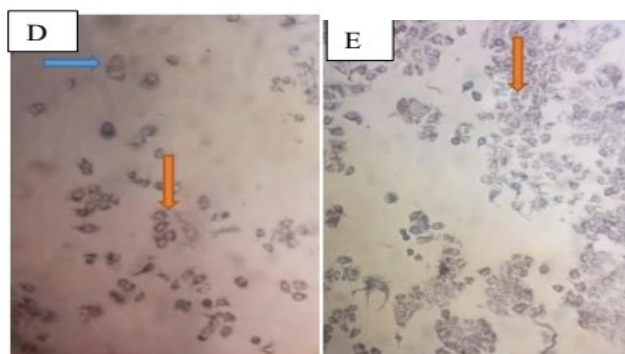


Gambar 2 Kromatogram hasil KLT ekstrak n-heksan (H), diklorometana (D), etil asetat (EA), dan etanol (ET). Fase diam silika GF₂₅₄ dan fase gerak n-heksan:etilasetat (4:1), dan setelah dieluasi dan dilihat dibawah lampu UV 254 nm (a); di bawah UV 366 (b); setelah disemprot dengan penampak noda anisaldehyda-asam sulfat dan dipanaskan pada 105°C (c)

Hasil KLT di atas menunjukkan adanya metabolit skunder terpenoid, ditunjukkan adanya warna ungu kehitaman setelah di berikan penampak noda anisaldehyd, dan coklat kehitaman dengan penampak noda Asam sulfat

10%. Ekstrak yang dihasilkan dilakukan pengujian aktivitas antikanker sel MCF-7. Morfologi sel MCF-7 akibat perlakuan ekstrak tersebut terdapat pada gambar 3 di bawah ini





Gambar 3 Hasil aktivitas antikanker karena perlakuan kontrol(A), ekstrak n-heksan (B), ekstrak diklorometana/DCM (C), ekstrak etil asetat (D), dan ekstrak etanol 70%(E) pada sel kanker MCF-7 dengan metode reduksi MTT. Pada perlakuan ekstrak dengan kematian sel ditandai memudarnya warna MTT (), sedangkan sel yang tidak mati ditandai dengan menguatnya warna MTT dan di sekitar sel terdapat serabut-serabut ().

Berdasarkan gambar 3 menunjukkan bahwa perlakuan ekstrak n-heksan, ekstrak diklorometana, dan ekstrak etilasetat menyebabkan perubahan morfologi pada sel MCF-7. Pada kontrol sel MCF-7 terjadi sel bergerombol dengan warna MTT intensif serta di sekitar sel terdapat serabut-serabut. Setelah perlakuan ekstrak n-heksan, ekstrak DCM, dan

ekstrak etil setat sebagian sel terlepas dan warna MTT pudar. Sedangkan untuk ekstrak etanol terdapat menguatnya warna MTT yang lebih banyak. Hasil aktivitas antikanker ekstrak n-heksan, ekstrak diklorometana, ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol yang ditunjukkan nilai IC_{50} , terdapat pada tabel 2 di bawah ini

Tabel 2: Data Hasil Aktivitas Antikanker (IC_{50}) Sel MCF-7 Ekstrak n-Heksan, Ekstrak Diklorometana (DCM), Ekstrak Etilasetat (EA),

Ekstrak	IC_{50}
N-heksan/ H	15.0923 $\mu\text{g/ml} \pm 0,50$
Diklorometana/ D	17.4213 $\mu\text{g/ml} \pm 2,23$
Etilasetat/ EA	10.9132 $\mu\text{g/ml} \pm 0,14$

Etanol/ ET

675, 1236 $\mu\text{g/ml} \pm 10,3$

Uji aktivitas antikanker dilakukan secara *in-vitro* terhadap sel kanker MCF-7. Karakteristik sel kanker MCF-7 adalah mengekspresikan reseptor estrogen (ER+), *overekspresi* Bcl-2 (Amundson et al., 2000), resisten terhadap agen kemoterapi (Aouali et al., 2003). Hal ini disebabkan karena terjadi *over ekspresi* PgP (P-glikoprotein), sel MCF-7 membutuhkan ATP untuk mendorong obat keluar sel, sehingga konsentrasi obat kemoterapi dalam sel akan turun dapat menurunkan efektifitas kemoterapi. Sel MCF-7 termasuk *cell line adherent* yang mengekspresikan reseptor estrogen alfa (ER- α), dan tidak mengekspresikan caspase-3 (Onuki et al., 2003).

Metode yang digunakan pengujian aktivitas antikanker adalah metode MTT. Prinsipnya adalah terjadinya reaksi reduksi garam tetrazolium MTT (3-(4, 5-dimetilthiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazolium bromide) oleh enzim reduktase dalam mitokondria sel hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu yang tidak larut air. Penambahan larutan *stopper* (Sodium Dodecyl

Sulfate) yang akan melarutkan kristal formazan, selanjutnya diukur absorbansinya dengan menggunakan ELISA *reader*. Intensitas warna ungu menunjukkan jumlah sel yang hidup, sehingga intensitas warna ungu semakin kuat, jumlah sel yang hidup semakin banyak. Untuk mengetahui nilai IC₅₀ dari masing-masing bahan uji berdasarkan % sel yang hidup, selanjutnya dihitung dengan analisa probit. Nilai IC₅₀ ini menunjukkan besarnya konsentrasi masing-masing bahan uji yang dapat menghambat 50% pertumbuhan sel kanker. Menurut Weerapreeyakul et al. (2012) bahan dinyatakan memiliki aktivitas antikanker apabila memiliki nilai IC₅₀ < 10 $\mu\text{g/ml}$ (*very strong cytotoxicity*), IC₅₀ 10-100 $\mu\text{g/ml}$ (*strong cytotoxicity*), dan IC₅₀ 100-500 $\mu\text{g/ml}$ (*moderat cytotoxicity*)

Pencarian senyawa aktif antikanker diawali dengan melakukan ekstraksi bertingkat dari beberapa pelarut terhadap jamur dewa kering yang diserbuk. Pelarut pertama yang digunakan n-heksan, selanjutnya residu di ekstraksi berturut-turut dengan

pelarut diklormetan, etilasetat, dan etanol 70%. Ekstraksi yang dilakukan dengan metode maserasi. Hasil identifikasi fitokimia masing-masing ekstrak dengan KLT menunjukkan adanya senyawa golongan terpenoid dengan munculnya spot biru keunguan yang menonjol setelah disemprotkan anisaldehyd. Pengujian aktivitas antikanker terhadap keempat ekstrak tersebut nilai IC_{50} seperti yang terdapat pada tabel 2 dari ketiga ekstrak (ekstrak n-heksan, ekstrak diklorometana, dan ekstrak etil asetat) berdasarkan analisa statistik uji F diperoleh nilai sig 0.07 ($p > 0.05$), artinya bahwa perlakuan ekstrak tersebut untuk nilai IC_{50} tidak ada perbedaan (H_0 diterima), mempunyai aktivitas antikanker *strong cytotoxicity*, nilai IC_{50} pada 10-100 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini juga ditunjukkan profil KLT pada ketiga ekstrak tersebut mempunyai kemiripan spot. Sedangkan pada ekstrak etanol 70% IC_{50} diatas 500 $\mu\text{g/ml}$, tidak mempunyai aktivitas antikanker pada sel MCF-7. Kandungan ergosterol (Takaku et al., 2001; Misgiati et al., 2021), blazein (Itoh et al., 2008), blazeispirol B, C, E dan F, ergostane (Hirotani et al., 2002) senyawa-senyawa ini yang mempunyai aktivitas sebagai antikanker.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil di atas adapat disimpulkan

1. bahwa ekstrak n-heksna, diklorometana, etilasetat jamur dewa (*Agaricus blazei* Murill) mengandung senyawa metabolit skunder golongan terpenoid
2. bahwa ekstrak n-heksna, diklorometana, etilasetat jamur dewa (*Agaricus blazei* Murill) mempunyai aktivitas antikanker sel MCF-7 dengan nilai IC_{50} 15.0923 $\mu\text{g/ml}$, 17.4213 $\mu\text{g/ml}$, 10.9132 $\mu\text{g/ml}$ dengan kriteria *strong cytotoxicity* sedangkan untuk ekstrak etanol IC_{50} 675, 1236 $\mu\text{g/ml}$.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada Industri Obat Tradisional Agaricus Sido Makmur Sentosa Lawang yang telah memberikan sampel Jamur dewa kering

DAFTAR PUSTAKA

Akiyama, H., Endo, M., Matsui, T., Katsuda, I., Emi, N., Kawamoto, Y., Koike, T., & Beppu, H. (2011). Agaritine from *Agaricus blazei* Murrill induces apoptosis in the <https://doi.org/10.33759/jrki.v4i1.231>

- leukemic cell line U937. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1810(5), 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.02.010>
- Akiyamaa, & Al, E. (2011). No Title. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1810(5), 519–525. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304416511000493?via%3Dihub>
- American cancer society. (2021). Breast cancer: key statistic of breast cancer. Available at: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-key-statistics> diakses pada tanggal 21 Desember 2021
- Amundson, S. A., Myers, T. G., Scudiero, D., Kitada, S., Reed, J. C., & Fornace, A. J. J. (2000). An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer Research*, 60(21), 6101–6110.
- Aouali, N., Morjani, H., Trussardi, A., Soma, E., Giroux, B., & Manfait, M. (2003). Enhanced cytotoxicity and nuclear accumulation of doxorubicin-loaded nanospheres in human breast cancer MCF-7 cells expressing MRP1. *Int J Oncol*, 23(4), 1195–1201. <https://doi.org/10.3892/ijo.23.4.1195>
- CCRC (Cancer Chemoprevention Research Center). MTT Method Cytotoxic Test Protocol. Yogyakarta: Faculty of Pharmacy, Gadjah Mada University, 2013
- Departemen Kesehatan RI., 2019. Hari Kanker Sedunia 2019. Diakses dari <https://www.kemkes.go.id/article/view/19020100003/hari-kanker-sedunia-2019.html>, pada tanggal 23 November 2020
- Firenzuoli, F., Gori, L., & Lombardo, G. (2008). The Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murrill: Review of Literature and Pharmaco-Toxicological Problems. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 5(1), 3–15. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem007>
- <https://doi.org/10.33759/jrki.v4i1.231>

- Hirotsu, M., Sai, K., Hirotsu, S., & Yoshikawa, T. (2002). Blazispirols B, C, E, and F, des-A-ergostane-type compounds, from the cultured mycelia of the fungus *Agaricus blazei*. *Phytochemistry*, 59(5), 571–577. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(01\)00445-9](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(01)00445-9)
- Itoh, H., Ito, H., & Hibasami, H. (2008). Blazin of a new steroid isolated from *Agaricus blazei* Murrill (himematsutake) induces cell death and morphological change indicative of apoptotic chromatin condensation in human lung cancer LU99 and stomach cancer KATO III cells. *Oncology Reports*, 20(6), 1359–1361. https://doi.org/10.3892/or_00000152
- Kerrigan, R.W., Callac, P., dan Parra, L.A. 2008. New and Rare Taxa in *Agaricus* section *Bivalares* (Duploannulati). *Mycologia*, 100: 876–892
- Misgiati, M., Widyawaruyanti, A., Sukardiman, & Raharjo, S. J. (2021). Ergosterol isolated from *Agaricus blazei* Murill n-hexane extracts as potential anticancer MCF-7 activity. *Pharmacognosy Journal*, 13(2), 418–426. <https://doi.org/10.5530/pj.2021.13.53>
- Misgiati M, & Corebima AD. (2015). *Agaricus blazei* Murill on the hematological parameter, random blood sugar, total cholesterol, and uric acid of Wistar rats (Sprague Dawley). *Journal of Scientific Research and Studies*, 2(2), 56–62. <http://www.modernrespub.org/jrsr/index.htm>
- Onuki, R., Kawasaki, H., Baba, T., & Taira, K. (2003). Analysis of a mitochondrial apoptotic pathway using Bid-targeted ribozymes in human MCF-7 cells in the absence of a caspase-3-dependent. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 13(2), 75–82. <https://doi.org/10.1089/108729003321629629>

- Peck, C.H. 1893. Report of the Botanist 1892. Annual Report on the New York State Museum of Natural History. 46: 85–149
- Shimizu, T., Kawai, J., Ouchi, K., Kikuchi, H., Osima, Y., & Hidemi, R. (2016). Agarol, an ergosterol derivative from *Agaricus blazei*, induces caspase-independent apoptosis in human cancer cells. *International Journal of Oncology*, 48(4), 1670–1678. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3391>
- Takaku, T., Kimura, Y., & Okuda, H. (2001). Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 131(5), 1409–1413. <https://doi.org/10.1093/jn/131.5.1409>
- Weerapreeyakul, N., Nonpunya, A., Barusrux, S., Thitimetharoch, T., & Sripanidkulchai, B. (2012). Evaluation of the anticancer potential of six herbs against a hepatoma cell line. *Chinese Medicine (United Kingdom)*, 7. <https://doi.org/10.1186/1749-8546-7-15>
- Wu, B., Cui, J., Zhang, C., & Li, Z. (2012). A polysaccharide from *Agaricus blazei* inhibits proliferation and promotes apoptosis of osteosarcoma cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(4), 1116–1120. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.02.023>
- Yu, C.-H., Kan, S.-F., Shu, C.-H., Lu, T.-J., Sun-Hwang, L., & Wang, P. S. (2009). Inhibitory mechanisms of *Agaricus blazei* Murill on the growth of prostate cancer in vitro and in vivo. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(10), 753–764. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.07.004>