

PENGARUH POLISAKARIDA KRESTIN DARI EKSTRAK JAMUR *Coriolus versicolor* TERHADAP PROFIL PROTEIN TESTIKULER DAN KADAR TESTOSTERON *Mus musculus*

Sri Puji Astuti Wahyuningsih*, Virid Gibson, Alfiah Hayati

Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga

Email : sri-p-a-w@fst.unair.ac.id

ABSTRACT

The purpose of this research was to determine the effect of polysaccharide krestin (PSK) on the testicular protein profiles and testosterone levels of Mus musculus with variety of dosages. This research used a completely randomized design. It were devide into four treatment group i.e. control group, PSK treatment at a dose of 15, 30, 60 mg/kgBW. Each group had six replications. Testicular proteins were isolated by flushing technique and analized by SDS-PAGE. Testosterone levels were analized using ELISA technique at wavelength 450 nm. Protein bands analysis showed that there were no diversification between four treatments. Molecular weight of protein bands were 87, 63, 57, 35, and 30 kDa. The results of research showed that the testosterone levels at dosage 60 mg/kgBW had signifcantly different with control, PSK treatment of 15 and 30 mg/kgBW. PSK treatment of 60 mg/kgBW had lowest level at dosage, i.e. 25946.8 pg/mL. It can be concluded that giving variety of dosages of polysaccharide krestin did not affect to testicular protein profiles but giving effect to testosterone levels of Mus musculus.

Keywords: *Coriolus versicolor, Mus musculus, polysaccharide krestin, testicular protein, testosterone*

PENDAHULUAN

Di negara-negara Asia, jamur telah lama digunakan sebagai obat tradisional. Beberapa negara yang menggunakan jamur sebagai bahan pengobatan antara lain Jepang, Cina, Korea dan daerah Asia lainnya sejak berabad-abad lalu (Ooi and Liu, 1999). Menurut Cui and Chisti (2003), klinik modern yang berada di negara-negara Asia sudah menggunakan obat dari jamur, salah satunya adalah *Coriolus versicolor*.

Coriolus versicolor merupakan jamur yang digunakan dalam obat herbal tradisional Asia. Dua zat yang diekstrak dari jamur yaitu polisakarida krestin (PSK) dan polisakarida-peptida (PSP) yang sedang dipelajari sebagai pengobatan kanker (Cui and Chisti, 2003) Polisakarida krestin telah banyak digunakan sebagai obat penyakit berbahaya di Jepang (Ooi and Liu, 1999). Berbentuk bubuk terang atau coklat gelap yang larut dalam air panas. Polisakarida krestin ini diperoleh dari tubuh atau miselium jamur. Polisakarida krestin mempunyai komponen utama berupa β -Glukan dengan rantai utama β -1,4 serta rantai samping β -1,3 dan β -1,6 yang terikat pada protein membran (Cui and Chisti, 2003).

Namun belakangan diketahui berdasarkan hasil penelitian Wahyuningsih dan

Darmanto (2010), menunjukkan bahwa PSK dari ekstrak jamur *C. versicolor* memiliki potensi toksik (LD50) pada mencit betina strain Balb/C pada dosis 231,8 mg/kgBB. Polisakarida krestin diatas dosis tersebut menimbulkan gejala-gejala toksik berupa aktivitas lokomotor turun, perilaku mengumpul, tremor, pupil mengecil, nafsu makan turun dan kematian. Pada dosis tersebut juga menimbulkan kerusakan organ terutama lambung dan usus bengkak serta limpa rusak. Berdasarkan kategori ketoksikan dari Loomis and Hayes (1996), hasil tersebut menunjukkan cukup toksik.

Pada organ reproduksi jantan, dosis PSK yang tinggi dan jangka waktu penggunaan yang lama dapat memicu tingginya kadar *Reactive Oxygen Species* (ROS). Kadar ROS yang tinggi berpotensi menimbulkan efek toksis, sehingga dapat berpengaruh pada kualitas dan fungsi spermatozoa (Hayati, 2011). Tingginya kadar ROS dapat meningkatkan jumlah sel leukosit. Sel leukosit mempunyai peranan dalam pertahanan seluler dan humoral organisme terhadap zat-zat asing. Meningkatnya jumlah leukosit dapat meningkatkan kadar ROS hingga 100 kali lipat (Agarwal *et al.*, 2003; Lavranos *et al.*, 2012).

Reactive Oxygen Species dapat menyebabkan stress oksidatif walaupun disisi lain juga berperan dalam membantu reaksi biokimia tubuh. Sehingga dapat dikatakan ROS akan bermanfaat apabila ada dalam jumlah yang kecil namun dapat merusak apabila jumlahnya meningkat (Aitken and Bennetts, 2006).

Diemer *et al.* (2003) mengatakan bahwa ROS dapat menghambat steroidogenesis dalam sel leydig dengan mentarget transfer kolesterol pada mitokondria sel leydig. Gangguan transfer kolesterol dalam mitokondria sel leydig dapat menghambat sintesis pregnenolon yang membentuk testosteron. Hamada *et al.* (2011) mengatakan bahwa efek ROS pada *Blood Testis Barrier* (BTB) yang terbentuk karena adanya *tight junction* antar sel sertoli adalah dapat merusak *tight junction* antar membran plasma sel tersebut. Selain itu, efek ROS dapat merusak sitoskeleton yang menyebabkan sel menjadi rapuh, terjadinya dislokasi nukleus sel sertoli, rusaknya membran plasma sel sertoli, dan rusaknya DNA sel sertoli yang berakhir pada apoptosis.

Blood testis barrier merupakan penghalang fisik yang memisahkan pembuluh darah dari tubulus seminiferus. Secara histologis, BTB terbentuk dari ikatan *tight junction* antara sel sertoli. Fungsi utama BTB adalah untuk melindungi sel-sel spermatogenik dari sistem imun tubuh. Adanya ROS dalam testis akan merusak sel leydig. Sel terjadi apoptosis yang dapat mengganggu sintesis testosteron yang akibatnya terjadi penurunan kadar testosteron. Sedangkan dalam sel sertoli, ROS akan merusak kompleks *junction* antar sel sertoli, merusak sitoskeleton sel sertoli, menyebabkan dislokasi nukleus dan merusak membran plasma sel sertoli akibatnya dapat mengganggu proses spermatogenesis (Hamada *et al.*, 2011).

Penelitian ini menggunakan berbagai variasi dosis untuk mengetahui dosis PSK yang tepat untuk dikonsumsi sebagai obat. Penelitian ini menggunakan mencit. Waktu perlakuan sesuai dengan proses spermatogenesis pada mencit yang memerlukan waktu selama 36 hari setelah menempuh 4 kali daur epitel seminiferus. Johnson and Everitt (1990) menyatakan bahwa lama satu daur epitel seminiferus pada mencit adalah 207 ± 6 jam. Berdasarkan latar belakang diatas, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas polisakarida krestin

dari ekstrak *Coriolus versicolor* pada profil protein spermatozoa testikuler dan kadar hormon testosteron mencit (*Mus musculus*).

BAHAN DAN CARA KERJA

Hewan coba

Hewan coba yang Instalasi Kandang Hewan Percobaan (IKHP) Pusvetma Surabaya. digunakan dalam penelitian ini adalah 40 ekor mencit jantan dewasa strain Balb/C yang berumur 4-8 minggu dengan berat 25-30 g.

Koleksi dan Pembuatan Serbuk Jamur *Coriolus versicolor*

Jamur *Coriolus versicolor* dikoleksi dari daerah Surabaya, Tulungagung, Tuban, dan Kediri untuk selanjutnya diidentifikasi, kemudian jamur dikering anginkan dan dihaluskan sehingga diperoleh serbuk kasar jamur.

Isolasi dan Dosis PSK

Isolasi PSK menggunakan metode Cui and Chisti (2003) yang dimodifikasi oleh Wahyuningsih dan Darmanto (2009). Penentuan kadar PSK menggunakan metode *phenol-sulphuric acid* assay. Dosis PSK yang digunakan adalah 0 (K), 15 (P1), 30 (P2), dan 60 (P3) mg/kgBB. Pemberian PSK dilakukan selama 35 hari dengan dosis berulang secara peroral.

Isolasi Protein Testikuler dan Isolasi Serum

Protein testikuler diisolasi dari testis menurut metode Hinsch *et al.* (1992), dilakukan dengan cara *flushing* dalam media PBS. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Pelet dilisiskan dengan buffer lisis dan di vortex. Selanjutnya sentrifugasi kembali. Supernatan ditambahkan ammonium sulfat dan disentrifugasi. Selanjutnya pelet yang merupakan protein diresuspensi dengan PBS dan dilakukan elektroforesis.

Darah diambil dari jantung sebanyak 1 mL didiamkan dalam lemari pendingin hingga terdapat serum berwarna kuning. Darah disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit. Kemudian serum dipisahkan dari pelet dan dikoleksi untuk dilakukan pengukuran kadar testosteron.

Sodium Dodecyl Sulphate – Poliacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Sampel protein hasil isolasi sebanyak 20 µL ditambahkan dengan *Reducing Sample Buffer* (RSB) 10 µL dan dipanaskan 100°C selama 5 menit, kemudian didinginkan dalam suhu kamar. Larutan sampel dimasukkan sumuran sebanyak 15 µL. Marker protein dimasukkan dalam salah satu sumuran. Kemudian dituangkan *buffer running*. Selanjutnya dihubungkan dengan arus listrik 48 mA dengan tegangan 120 V.

Setelah 1 jam dan terbentuk pita protein dalam gel dilakukan pewarnaan dengan menggunakan *Comassie Brilliant Blue*. Pewarnaan dilakukan selama semalam dalam shaker dan dilanjutkan dengan proses *destaining* dengan larutan metanol 50% dan asam asetat glasial 10%.

Enzyme-Like Immunosorbent Assay (ELISA)

Larutan standart atau sampel protein dimasukkan dalam sumuran yang terlebih dahulu sudah diisi dengan *diluent standart reference* dan diinkubasi selama 1 malam. Selanjutnya dicuci 3x dengan *wash buffer*. Kemudian ditambahkan *biotinylated detetion Ab* dan didiamkan selama 1 jam pada suhu 37°C. *Plate* ditutup dengan *plate sealer*. Selanjutnya dilakukan *washing*, masing-masing sumuran diaspirasi dan dicuci 3 kali dengan *wash buffer*. Setelah semua tercuci, kontaminan dihilangkan dengan aspirasi atau dekantasi. Sumuran dibalik dan ditepuk diatas kertas tissue. Langkah selanjutnya adalah menambahkan *HRP working solution* pada tiap sumuran. Sumuran ditutup *plate sealer* dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C. Kemudian dilakukan tahap pencucian seperti sebelumnya. *TMB substrate solution* dimasukkan dalam sumuran dan ditutup dengan *plate sealer* dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Reaksi dihentikan jika sudah muncul gradien warna. Penghentian reaksi dilakukan dengan memasukkan *stop solution* yaitu asam sulfat hingga warna larutan pada masing-masing sumuran berwarna kuning. Selanjutnya diukur *Optical Density* (OD) dengan panjang gelombang 450 nm.

Analisis Data

Profil protein dianalisis secara deskriptif. Kadar hormon testosteron diuji secara statistik dengan uji Kolmogorov-Smirnov dan uji

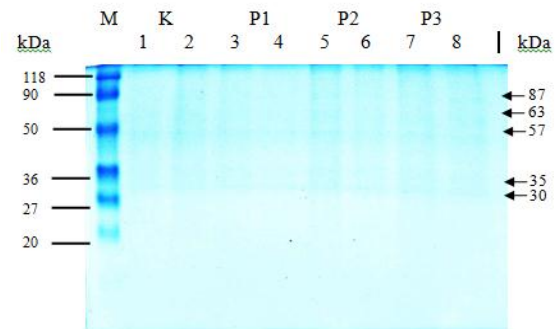
Levene's, dan dilanjutkan dengan Anova satu arah dan Duncan ($\alpha = 0.05$).

HASIL

Elektroforesis Protein

Protein penanda pada penelitian ini menggunakan *Prestained Protein Molecular Weight Marker* yang memiliki berat molekul (BM) 118, 90, 50, 36, 27, dan 20 kDa dengan jarak migrasinya sebesar 0,2; 0,6; 1,3; 2,2; 2,8; dan 3,5 cm. Hasil yang diperoleh dari perhitungan berat protein antara keempat jenis perlakuan memiliki pita protein dengan berat molekul (BM) yang sama. Berat molekul protein yang terdeteksi yaitu 87, 63, 57, 35, dan 30 kDa (Gambar 1 dan Tabel 1).

Gambar 1. Profil protein testikuler mencit yang dielektroforesis secara duplo. M (marker, BM 118-20 kDa), K (kontrol), P1 (PSK 15 mg/kg BB), P2 (PSK 30 mg/kg BB), dan P3 (PSK 60 mg/kg BB).



Tabel 1. Sebaran berat molekul protein testis setelah pemberian polisakarida krestin

Berat Molekul Protein (kDa)	Kontrol	PSK 15 mg/kgBB	PSK 30 mg/kgBB	PSK 60 mg/kgBB
87	+	+	+	+
63	+	+	+	+
57	+	+	+	+
35	+	+	+	+
30	+	+	+	+

Keterangan : + : Ada protein
PSK : Polisakarida krestin

Kadar Testosteron

Kadar testosteron hasil penelitian adalah 34.281,9 $\mu\text{g/mL}$ (K); 33.215,2 $\mu\text{g/mL}$ (P1); 37.115,0 $\mu\text{g/mL}$ (P2) dan 25.946,8 $\mu\text{g/mL}$ (P3).

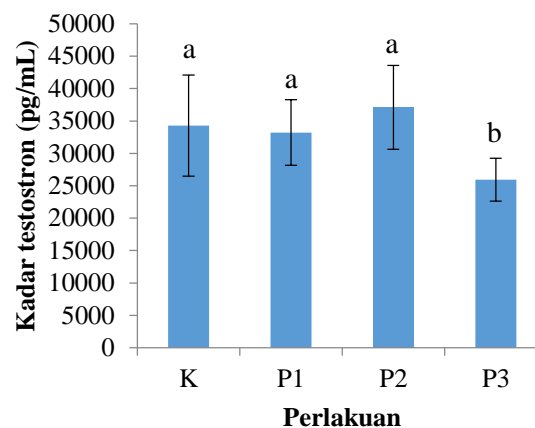
Tabel 2. Kadar testosteron setelah pemberian polisakarida krestin

Perlakuan mg/kgBB	Kadar Testosteron ($\mu\text{g/ml}$)						Rata-rata
	1	2	3	4	5	6	
Kontrol	30.235,3	42.103,1	20.958,6	36.765,2	34.769,9	40.859,3	34.281,9 \pm 7.806,7 ^a
15	29.172,9	39.434,1	36.894,7	25.778,3	32.722,8	35.288,2	33.215,2 \pm 5.067,6 ^a
30	39.822,8	44.512,9	43.398,7	31.815,9	34.225,8	28.913,7	37.115,0 \pm 6.467,2 ^a
60	31.064,5	22.176,5	28.810,1	25.234,2	24.016,3	24.379,1	25.946,8 \pm 3.325,6 ^b

Ket. : angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan berbeda tidak signifikan

Data yang diperoleh dari hasil pengukuran kadar testosteron menunjukkan bahwa data berdistribusi normal dan homogen sehingga dapat dilanjutkan dengan uji Anova satu arah dengan hasil $p < \alpha$ ($0.024 < 0.05$) maka dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan antar perlakuan. Hasil uji lanjutan yaitu uji Duncan menunjukkan bahwa perlakuan P3 berbeda signifikan dengan kelompok kontrol, P1, dan P2. Pada perlakuan P3, kadar testosteron menurun dibanding dengan kontrol. Kadar testosteron pada kontrol berbeda tidak signifikan dengan perlakuan 1 dan 2.

Pada penelitian ini digunakan indikator profil protein testikuler dan kadar testosteron untuk mengetahui kualitas sistem reproduksi mencit jantan yang diberi perlakuan polisakarida krestin dengan variasi dosis 15, 30, 60 mg/kg BB dibandingkan dengan kontrol.



Gambar 2. Kadar testosteron setelah pemberian polisakarida krestin. Kontrol (K), PSK 15 mg/kgBB (P1), PSK 30 mg/kgBB (P2), PSK 60 mg/kgBB (P3).

PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi dosis PSK yang diberikan pada mencit selama 36 hari tidak memberikan pengaruh terhadap profil protein testikuler. Berat molekul protein yang terdeteksi dari hasil elektroforesis pada keempat perlakuan yaitu 30, 35, 57, 63, dan 87 kDa. Menurut Chu *et al.* (2002) penggunaan PSK dalam waktu 3 bulan secara peroral tidak memberikan efek mutagenik dan sitotoksik. Polisakarida krestin yang mengandung senyawa β -glukan mengobati kanker dengan tidak langsung yaitu melalui mekanisme imunomodulator bukan melalui mekanisme sitotoksik, sehingga dapat dikatakan bahwa polisakarida krestin sangat aman dan tidak berpengaruh sama sekali terhadap sel germinal pada testis. Selain itu sel germinal dalam testis juga memperoleh perlindungan dari adanya *blood testis barrier*. Dengan adanya pelindung tersebut maka setiap senyawa asing akan sulit untuk masuk dalam tubulus seminiferus karena tidak memiliki reseptor yang tepat.

Sel germinal dalam testis dipisahkan dari aliran darah oleh *blood testis barrier*. *Barrier* tersebut secara anatomi terbentuk dari jalinan sel sertoli. Pada beberapa spesies, jaringan peritubular juga menolak masuknya substansi asing (Setchell and Main, 1978). Oleh karena itu apabila terdapat molekul polisakarida krestin yang lolos masuk dalam testis tidak dapat memasuki tubulus seminiferous sehingga tidak dapat merusak sel germinal serta

komponen lain dalam tubulus seminiferous akibatnya tidak dapat mempengaruhi sintesis protein. Menurut Cheng and Mruk (2012), *blood testis barrier* mencegah aliran paraselular biomolekul seperti air, elektrolit, ion, nutrient, hormon, dan molekul biologis. Hal ini disebabkan karena pada epitel seminiferous tidak dilalui pembuluh darah, pembuluh limfa, bahkan syaraf yang mana ketiganya ada di bagian intersisial.

Douglas and Soderman (1991) mengatakan bahwa protein dengan berat 30 kDa terdapat pada mitokondria sel leydig, kemunculan ini bersamaan dengan meningkatnya proses steroidogenesis. Protein ini hanya akan terekspresi pada saat proses kapasitas (Liu and Baker, 1992). Menurut Shi *et al.* (2013) protein dengan berat molekul 57 kDa hanya terekspresi pada testis. Reddy *et al.* (2006) mengatakan bahwa protein dengan berat molekul 57 kDa berperan penting pada saat fertilisasi terutama saat fusi dengan ovum. Menurut Lewis and Aitken (2001), protein spermatozoa dengan berat molekul 50-64 kDa berperan dalam fosforilasi tiroksin pada proses maturasi spermatozoa di bagian kauda epididimis tikus.

Hasil pengukuran kadar testosteron terlihat pada P3 yang memiliki beda signifikan dengan K, P1, dan P2 dengan kadar testosteron paling rendah yakni 25.946,8 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan paling tinggi pada P2 sebesar 37.115,0 $\mu\text{g/mL}$. Sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian dosis PSK sebesar 60 mg/kgBB memberikan perubahan signifikan pada kadar testosteron. Pada kelompok perlakuan PSK 30 mg/kg BB kadar testosteron yang terukur adalah 37.115 $\mu\text{g/mL}$ yang merupakan kadar tertinggi dibandingkan 3 kelompok perlakuan lain. Hal ini ada kemungkinan bahwa PSK pada dosis tersebut justru dapat mengoptimalkan kadar testosteron yang diperlukan oleh tubuh. Pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan PSK 15 mg/kgBB kadar testosteron yang terukur adalah 34.281,9 dan 33.215,2 $\mu\text{g/mL}$ yang mana kadarnya tidak berbeda jauh sehingga dapat dikatakan bahwa pada dosis 15 mg/kgBB tidak mengubah kadar testosteron sehingga kadarnya cenderung normal. Kadar testosteron rata-rata pada keempat perlakuan diatas adalah 32.639,7 $\mu\text{g/mL}$ dimana pada kadar tersebut termasuk dalam *range* kadar testosteron normal yaitu 24.000-37.700 $\mu\text{g/mL}$. Namun munculnya gejala penurunan

tetsosteron pada perlakuan PSK dosis 60 mg/kgBB dapat mengindikasikan bahwa pada dosis yang lebih besar lagi dapat semakin menurunkan kadar testosteron.

Penurunan kadar testosteron yang turun dengan signifikan pada perlakuan PSK 60 mg/kgBB dapat terjadi dimungkinkan karena pada dosis 60 mg/kgBB termasuk kategori dosis yang tinggi dimana pada dosis tersebut polisakarida krestin akan terakumulasi pada testis dan dapat menyebabkan dampak toksik.

Molekul polisakarida krestin yang masuk dalam testis akan terakumulasi dan menjadi toksik. Pada kondisi toksik tersebut terjadi reaksi oksidasi karena adanya senyawa ROS akibat akumulasi dari molekul polisakarida krestin.

Senyawa superoksida ROS menyebabkan gangguan steroidogenesis dengan dan golongan ROS yang lain selain dihasilkan dari senyawa asing juga dihasilkan oleh mitokondria selama proses oksidasi fosforilasi. Sel leydig mengandung enzim sitokrom P450 yang mengkatalisis reaksi oksidasi dalam proses steroidogenesis yang kemudian menghasilkan radikal bebas (Beattie *et al.*, 2013). Keberadaan ROS dapat menyebabkan gangguan steroidogenesis dengan cara memblok kompleks multiprotein transducesom yang berfungsi sebagai reseptor kolesterol pada mitokondria sel leydig yang meliputi A-kinase *anchoring protein* (AKAP121), *peripheral-type benzodiazepine receptor associated protein* (PAP7), *steroidogenesis acute regulatory protein* (StAR), protein translokator dan ion channel (Diemer, *et al.*, 2003), serta dapat merusak komponen makromolekul dari sel leydig (Chen and Zirkin, 1999). Terganggunya jalur sintesis testosteron ini dapat mengakibatkan turunnya kadar testosteron.

Sintesis testosteron memberikan *feedback negative* pada hipotalamus untuk memproduksi GnRH serta pada pituitari untuk memproduksi LH yang dengan segera akan menstimulasi transfer kolesterol pada membran dalam mitokondria (Beattie *et al.*, 2013). Menurut Beattie *et al.* (2013) stimulasi LH dalam waktu lama dapat menurunkan steroidogenesis, hal tersebut didasarkan pada studi yang dilakukan oleh Chen and Zirkin (1999) yang menuturkan bahwa penekanan kadar LH dapat menstimulasi ulang sintesis testosteron. Mekanisme *feedback negative* pada regulasi testosteron juga dapat terganggu

akibat keberadaan ROS yang besar, hal ini terjadi karena meskipun hipotalamus dan hipofisa anterior menanggapi sinyal untuk memproduksi GnRH, LH, dan FSH hormon peptide tersebut tidak akan bisa memasuki proses sintesis testosteron karena terblokir oleh ROS.

Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa obat-obat antikanker memiliki dua mekanisme dalam melawan kanker yaitu secara langsung karena memiliki dampak sitotoksik dan dengan cara tidak langsung yaitu melalui mekanisme imunomodulator. Sebagian besar obat kanker yang berbahan kimia sintesis akan bersifat sitotoksik sehingga dapat membunuh sel kanker secara langsung. Chan *et al.*, (2009) mengatakan bahwa obat kanker yang bersifat sitotoksik tidak dapat membedakan manakah yang termasuk sel kanker dan manakah yang termasuk sel normal. Kelebihan dari polisakarida krestin dalam mengobati kanker adalah adanya senyawa aktif β -glukan yang berperan sebagai imunomodulator. Sehingga polisakarida krestin sangat aman untuk dikonsumsi dalam waktu lama untuk mengobati kanker.

KESIMPULAN

Dari pembahasan diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian variasi dosis polisakarida krestin tidak memberikan pengaruh pada profil protein testikuler menciit dikarenakan polisakarida krestin bukanlah bahan yang bersifat mutagenik. Pengaruh dari variasi dosis tersebut nampak pada kadar testosteron dimana pada P3 terjadi penurunan kadar testosteron. Polisakarida krestin tidak mempengaruhi profil protein meskipun terjadi penurunan kadar testosteron. Kadar tersebut masih dalam rentang kadar testosteron normal, meskipun demikian akan ada kemungkinan dapat menyebabkan turunnya konsentrasi protein testikuler secara tidak langsung melalui mekanisme hormonal.

DAFTAR PUSTAKA

Agarwal A., Saleh R. A. and Bedaiwy M. A. 2003. Role of Reactive Oxygen Species in the Pathophysiology of Human Reproduction. *Fertil Steril.* 79: 829-43.

Aitken R. J. and Bennetts. 2006. Reactive Oxygen Species: Friend or Foe. *The Sperm Cell De Jonge C, Barratt C,*

editors., ed 170–193 Cambridge: Cambridge University Press.

- Beattie M. C., Chen H., Fan J., Papadopoulos V., Paul Miller P. and Zirkin B. R. 2013. Aging and Luteinizing Hormone Effects on Reactive Oxygen Species Production and DNA Damage in Rat Leydig Cells. *Biol of Reproduc.* 88 (4): 1-7.
- Chan G. C., Chan W. K. and Sze D. M. 2009. The Effects of β -Glucan on Human Immune and Cancer Cells. *J Hematol and Oncol.* 2-25.
- Chen H. and Zirkin B. R. 1999. Long-term Suppression of Leydig Cell Steroidogenesis Prevents Leydig Cell Aging. *Proc Nat Acad Sci USA.* 96: 14877-14881.
- Cheng C. Y. and Mruk D. D. 2012. The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception. *Pharmacologic Rev.* 64: 16-64.
- Chu K. K. and Chow A. H. 2002. *Coriolus versicolor*: A Medicinal Mushroom with Promising Immunotherapeutic Values. *J Clinic Pharmacol.* 42: 976.
- Cui J. and Chisti Y. 2003. Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: Physiological activity, uses, and production. *Biotechnol Adv.* 21(2): 109-122.
- Diemer T., Allen J. A., Hales K. H. and Hales D. B. 2003. Reactive Oxygen Disrupts Mitochondria in MA-10 Tumor Leydig Cells and Inhibits Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) Protein and Steroidogenesis. *Endocrinol.* 144(7): 2882–2891.
- Douglas M. S. and Sodeman T. C. 1991. The 30-kDa Mitochondrial Protein Induced by Hormone Stimulator in MA-10 Mouse Leydig Tumor Cells are Processed from Larger Precursor. *J Biol Chem.* Vol. 266: 29.
- Hamada A. J., Aspinder S. and Ashok A. 2011. Cell Phones and their Impact on Male Fertility: Fact or Fiction. *The Open Reproduc Sci Journal.* 5: 125-137.

- Hayati A. 2011. Spermatologi. Surabaya: Pusat Penerbitan dan Percetakan Unair.
- Hinsch K. D., Hinsch E. and Aumuller G. 1992. Immunological Identification of G Protein alpha- and beta-subunits in Tail Membrane of Bovine Spermatozoa. *Biology Reproducty*. 47: 337-346.
- Johnson, M. and Everitt, B. 1990. *Essential in Reproduction*. Blackwell Science Pub Oxford. London.
- Lavranos G., Balla M., Tzortzopoulou A., Syriou V., and Angelopoulou R. 2012. Investigating ROS Sources in Male Infertility: a Common End for Numerous Pathways. *Reproducty Toxicology*. 34: 298-307.
- Lewis, B. and Aitken, R. J. 2001. A redox-regulated tyrosine phosphorylation cascade in rat spermatozoa. *J Androl*. 22(4): 611-622.
- Liu D. Y. and Baker H. W. G. 1992. Tests of human sperm function and fertilisation in vitro. *Fertil Steril*. 58: 465-483.
- Loomis T. A. and Hayes A. W. 1996. *Loomis's Essentials of Toxicology*, fourth edition. Elsevier Inc.
- Ooi V. E. C. and Liu F. 1999. A review of pharmacological activities of mushroom Polysaccharides. *Int J Med Mushrooms*. 1: 195-206.
- Reddy K. V. R., Vijayalaxmi G., Rajeev K. S., and Aranha C. 2006. Inhibition in Sperm-egg Binding and Fertilisation in Mice by a Monoclonal Antibody Reactive to 57-kDa Human Sperm Surface Antigen. *Reprod Fertil and Dev*: 18(8): 875- 884.
- Setchell, B. P. and S. J., Main. 1978. Drugs and the Blood-Testis Barrier. *Environmental Health Perspective*. vol. 24: 61-64.
- Shi Y., Zhang L., Song S., Teves ME., Li H., Wang Z., Hess RA., Jiang G., and Zhang Z. 2013. The Mouse Transcription Factor-like 5 Gene Encodes a Protein Localized in the Manchette and Centriole of the Elongating Spermatid. *Andrology*. 431-439.
- Wahyuningsih, S. P. A. dan Darmanto, W. 2010. Uji Toksisitas Akut Polisakarida Krestin dari Ekstrak dan Miselium Jamur *Coriolus versicolor*: Upaya Menggali Potensi Bahan Hayati sebagai Imunomodulator Respon Imun Terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. Lembaga Penelitian. Universitas Airlangga. Surabaya.