

**AKTIVITAS ANTITUMOR DAN PREBIOTIK SENYAWA TURUNAN
EPIGLUKAN: (1→3),(1→6)-β-GLUKAN EKSTRASELLULER
DARI *Epicoccum nigrum* EHRENB. EX SCHLECHT**

*Prebiotic and Antitumor Activities of Extracellular Epiglucan Produced by
Epicoccum nigrum Ehrenb. Ex Schlecht*

Jayus¹⁾, Nuriman²⁾ dan Sony Suwasono¹⁾

¹⁾Dosen Fakultas Teknologi Pertanian, Universtas Jember

²⁾Dosen Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Jember
E-mail: jayussanjaya@yahoo.co.uk

ABSTRACT

Extracellular epiglucan produced by Epicoccum nigrum has been examined by in vitro analysis to show its potency as an antitumor substance against leucemia cell. The aims of this study were to determine the LC₅₀ value and prebiotic activities of native and derivated epiglucan. The epiglucan was modified by sulfation and carboxymethylation methods. The result showed that LC₅₀ of native epiglucan occur at concentration of 22 µg/ml. This substance was chemically modified through sulfation and charboxymethylation process in order to increase its antitumor activity. Based on the value of LC₅₀, the sulfated and carboxymethylated epiglucan have higher activity against leucemia cell compare to that of unmodified epiglucan. The LC₅₀ value of suphated epiglucan is 14 µg/L, while the carboxymethylated one is 13 µg/L. Prebiotic activities of both sulfated and carboxymethylated epiglucan were also higher compare to the unmodified glucan since these two derivatives are able to elevate the growth rate of probiotic microorganism such as Lactobacillus casei, L. acidophilus and L. rhamnosus.

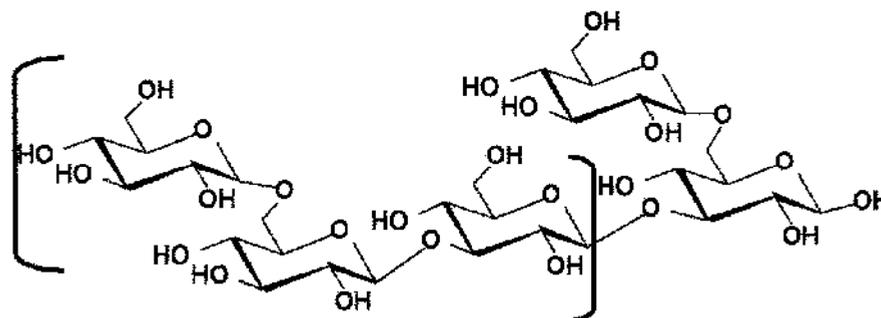
Key words: *antitumor, extracellular epiglucan, Epicoccum nigrum, charboxymethylation, sulfation*

PENDAHULUAN

Senyawa epiglukan merupakan polisakarida yang dihasilkan oleh *Epicoccum nigrum* secara ekstraselluler, memiliki rantai utama dengan ikatan β-(1→3)- dan memiliki cabang berikatan β-(1→6)- dengan frekuensi percabangan lebih tinggi dibanding polisakarida lainnya, yaitu 2 kali untuk setiap 3 residu monomer (glukosa) pada rantai utama seperti terlihat pada **Gambar 1** (Schmid *et al.*, 2001).

Epiglukan ini telah terbukti secara *in vitro* memiliki sifat anti tumor, melawan sel leukemia dengan nilai LC₅₀ terjadi pada

konsentrasi 22 µg/ml (Jayus, 2007, hasil penelitian belum dipublikasi). Sebagai bahan yang bersifat bioaktif, epiglukan dapat dijadikan sebagai bahan alternatif untuk obat melawan tumor, suatu penyakit yang di Indonesia cenderung meningkat kasusnya dari tahun ke tahun. Sebagai bahan alternatif obat tumor, peningkatan sifat bioaktif epiglukan akan memperbaiki *indeks therapeutic* dalam aplikasi klinis. Peningkatan sifat bioaktif diduga dapat dilakukan dengan memodifikasi senyawa induk epiglukan menjadi senyawa turunannya baik secara sulfatasi maupun karboksimetilasi.



Gambar 1. Struktur epiglukan (Schmid *et al.*, 2001; Smaali *et al.*, 2004)

Senyawa β -glukan sejenis epiglukan telah diberikan rekomendasi GRAS (*Generally Recognized as Safe*) oleh FDA (*Food and Drug Administration*). Ditemukannya epiglukan yang memiliki potensi sebagai senyawa antitumor dan *food additive* melahirkan peluang pemanfaatan senyawa ini sebagai bahan untuk bioterapi penyakit tumor dan pengembangannya sebagai senyawa prebiotik yang sangat bermanfaat bagi industri pangan.

Efektifitas epiglukan sebagai agen antitumor dan *food additive* sebelum diaplikasikan perlu ditingkatkan untuk mengangkat nilai jual, keunggulan dan daya kompetisi terhadap produk sejenis di pasaran. Untuk mencapai tujuan ini perlu ditemukan metode yang mampu memodifikasi epiglukan menjadi senyawa yang lebih potensial. Demikian juga dengan keterkaitan antara struktur polisakarida dan sifat bioaktifnya termasuk penghambatan tumor belum diketahui secara jelas. Selama ini diduga ada hubungan antara derajat polimerisasi, daya larut, frekuensi percabangan, panjang rantai cabang dan konfigurasi molekul polisakarida dengan sifat bioaktifnya (Bao *et al.*, 2001; Ramesh and Tharanatan, 2003). Temuan hasil eksplorasi polisakarida dari berbagai sumber penghasil, juga menunjukkan adanya variasi sifat bioaktif dan reaktivitasnya ditinjau dari struktur polisakarida yang dihasilkan. Modifikasi dari senyawa polisakarida juga banyak dilaporkan menghasilkan produk turunan yang lebih aktif dibanding senyawa induknya seperti yang telah dibuktikan oleh

Zang dan Cheung (2002) pada polisakarida (*lentinan*) yang dihasilkan oleh *Lentinus edodes* dan polisakarida yang diproduksi oleh *Poria cocos sclerotium* (Wang *et al.*, 2004).

Studi terhadap modifikasi senyawa polisakarida masih terus digalakkan oleh para peneliti untuk mendapatkan gambaran yang pasti hubungan antara struktur dan fungsi polisakarida itu sendiri. Modifikasi semacam ini mungkin dapat diterapkan untuk meningkatkan fungsionalitas epiglukan, dan tidak menutup peluang modifikasi ini akan menghasilkan turunan yang lebih baik dibanding turunan *lentinan*. Produk turunan epiglukan ini masih belum diketahui seberapa besar potensi dan sifat bioaktifnya. Dalam artikel ilmiah ini dikaji metode substitusi baik sulfatasi maupun karboksimetilasi yang mungkin menghasilkan turunan epiglukan yang lebih unggul.

METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian

Penelitian laboratorium (*pure experiment*) ini dilakukan dalam tahap : 1) pemeliharaan kultur *Epicoccum nigrum*, 2) produksi Epiglukan dari *Epicoccum nigrum*, 3) preparasi turunan Epiglukan secara sulfatasi, 4) preparasi turunan epiglukan secara karboksimetilasi, 5) uji sifat antitumor senyawa turunan epiglukan, 6) uji prebiotik senyawa turunan epiglukan secara sulfatasi, dan 7) pengujian sifat fisik -glukan. Semua tahapan penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi

Pangan dan Hasil Pertanian, THP,FTP, Universitas Jember.

Rancangan Percobaan

Satu seri konsentrasi (0,2,4,8,16,32 µg/L) native epiglukan dan epiglukan termodifikasi diujikan untuk menentukan nilai LC₅₀ sebagai indikator aktivitas anti kanker. Sementara, untuk uji prebiotik digunakan satu konsentrasi yang sama untuk native dan epiglukan dan epiglukan termodifikasi, yaitu µg/L)

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian meliputi: kultur *Epicocum nigrum* Ehrenb. Ex Schlecht diperoleh dari Culture Collection of University of La Trobe (Australia) dalam bentuk kultur tanah, *Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. Acidophilus*, sel leukemia L1210 yang ditumbuhkan pada medium Eagle's MEM, Malt Extract Agar (Oxoid), MRS broth, molase, sodium nitrat, pelarut etanol, 2 M HCl, 2 M NaOH, DMSO, pyridine, isopropanol, dan asam klorosulfonat (HClSO₃).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: Fermentor (2 L) dengan pengaduk kontinu (Applikon) dan 2 impeler Ruston 6-blade, sentrifuse, *freeze drier*, membran dialisis, magnetik stirer, dan viskometer.

Pemeliharaan Kultur *Epicocum nigrum*

Kultur mikroba *E. nigrum* Ehrenb. Ex Schlecht diperoleh dari Culture Collection of University of La Trobe (Australia) dalam bentuk kultur tanah. Fungi ini ditumbuhkan dalam cawan petri yang berisi media Malt Extract Agar (MEA) (Oxoid) pada suhu 40° C selama 48 jam.

Produksi Epiglukan dari *Epicocum nigrum*

Fermentasi *E. nigrum* akan dilakukan dalam fermentor volume 2 L yang dilengkapi dengan pengaduk kontinu

(Applikon) dan 2 impeler Ruston 6-blade. pH pertumbuhan dimonitor menggunakan Ingold pH probe dan dikontrol secara otomatis dengan penambahan 2 M HCl atau 2 M NaOH menggunakan pH controller. *Epicocum nigrum* akan ditumbuhkan menggunakan substrat molases sebagai sumber karbon dan sumber N dari sodium nitrat.

Epiglukan hasil fermentasi diendapkan menggunakan pelarut etanol (2:1) setelah dilakukan pemisahan biomassa dan filtratnya dengan sentrifugasi 8000 rpm. Gumpalan -glukan kemudian ditempatkan dalam membran dialisis untuk memisahkan sisa-sisa substrat yang terikat sebelum dilakukan pengeringan pada *freeze drier*.

Preparasi Turunan Epiglukan secara Sulfatasi

Pada dasarnya metode yang digunakan untuk mendapatkan turunan epiglukan secara sulfatasi ini mengikuti metode yang dikembangkan oleh Zhang *et al.* (2001). Epiglukan (600 mg) dilarutkan dalam 50 mL DMSO dan diaduk dengan magnetik stirer semalam pada suhu kamar. Setelah itu ditambahkan 9 mL pyridine dan secara perlahan diaduk menggunakan magnetik stirer selama 30 menit. Asam klorosulfonat (HClSO₃) (dengan perbandingan mol asam dengan mol pyridin 1:2) ditambahkan secara tetes demi tetes ke dalamnya dengan menggunakan pendingin es dan diaduk menggunakan magnetik stirer. Larutan yang diperoleh dipanaskan sampai 80° C dan reaksi dilanjutkan selama 2 jam. Setelah reaksi didinginkan sampai suhu kamar, larutan NaOH 5% ditambahkan sehingga mencapai kondisi netral (pH 7). Larutan kemudian didialisis dalam larutan basa (*slightly alkaline water*) sehingga mencapai pH 9 untuk menghilangkan piridin. Akhirnya, epiglukan tersulfatasi didialisis lagi dalam aquades dan dilakukan lyophilisis untuk memisahkan produk dari koloidal sehingga diperoleh produk akhir.

Preparasi Turunan Epiglukan secara Karboksimetilasi

Metode yang digunakan untuk mendapatkan turunan epiglukan secara karboksimetilasi ini pada dasarnya mengikuti metode yang dikembangkan oleh Wang, *et al.* (2004). Epiglukan (600 mg) disuspensikan dalam campuran 10 mL NaOH 20% dan 25 mL isopropanol dalam pendingin es dengan diaduk menggunakan magnetik stirer selama 3 jam. Selanjutnya, 5,25 g asam kloroasetat, 10 mL NaOH 20% dan 25 mL isopropanol ditambahkan secara perlahan dengan terus dilakukan pengadukan. Reaksi dilanjutkan sampai 3 jam pada temperatur kamar dan kemudian dipanaskan sampai suhu 60° C selama 1,5 jam. Setelah reaksi didinginkan sampai temperatur kamar, 0,5 mol mol/L HCl ditambahkan hingga mencapai pH 7. Senyawa turunan polisakarida karboksimetilat dimurnikan dengan proses dialisis dilanjutkan lyophilisis sehingga diperoleh senyawa akhir untuk analisis.

Uji Sifat Antitumor Senyawa Turunan Epiglukan

Produk turunan epiglukan secara sulfatasi dan karboksimetilasi akan diuji sifat antitumornya secara *in vitro* berdasarkan metode yang dikembangkan oleh Sumatra (1998), menggunakan sel leukemia L1210 yang ditumbuhkan pada medium Eagle's MEM.

Uji Prebiotik Senyawa Turunan Epiglukan secara Sulfatasi

Pengujian prebiotik pada senyawa turunan epiglukan sebelum dan sesudah modifikasi dilakukan secara *in-vitro* menggunakan inokulum *Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*. Mikroorganisme yang tergolong probiotik ini ditumbuhkan selama 72 jam dalam media MRS broth untuk diukur kecepatan pertumbuhannya dengan atau tanpa adanya senyawa turunan epiglukan. Kecepatan pertumbuhan spesifik (μ)

mikroba dihitung dengan menggunakan rumus berikut.

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{\Delta t}$$

dimana :

μ = kecepatan pertumbuhan spesifik (μ g/jam)

X_1 = total mikroba jam ke-1 (μ g)

X_2 = total mikroba jam ke-2 (μ g)

t = selisih waktu ($t_2 - t_1$) (jam)

Pengujian Sifat Fisik -Glukan

Pengujian sifat fisik turunan epiglukan akan dilakukan pada nilai viskositas dan kelarutannya menggunakan alat viskosimeter.

Data dalam penelitian ini merupakan hasil rata-rata pengukuran dari minimal 2 kali ulangan. Data penelitian dianalisis dengan membandingkan rata-rata pengamatan akibat perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeliharaan Kultur *Epicoccum nigrum*

Epicocum nigrum Ehrenb. Ex Schlecht merupakan jamur yang dalam pertumbuhannya sulit bersporulasi dalam jumlah banyak, sehingga dalam proses peremajaannya perlu menggunakan jaringan dari jamur tersebut untuk tumbuh. Jamur yang sudah cukup tua sangat sulit untuk ditumbuhkan kembali. Hal ini berbeda dengan jamur yang banyak memproduksi spora, peremajaan jamur yang mudah bersporulasi cukup dilakukan dengan mengambil sebagian kecil spora yang umumnya berada pada permukaan hifa jamur tersebut.

Produksi Epiglukan dari *E.nigrum* dalam Fermentor

Pada fermentasi terendam (*submerged culture*), *E.nigrum* tumbuh dengan morfologi berbentuk pelet. Pertumbuhan semacam ini sering terjadi pada banyak jamur yang ditumbuhkan dalam fermentor berpengaduk kontinyu. *Yield* atau rendemen dari epiglukan yang diproduksi

oleh jamur ini masih tergolong rendah yang hanya mampu mencapai rata-rata 3 g dalam tiap liter media yang digunakan. Jamur-jamur sejenis *Epicoccum* yang memproduksi polisakarida secara ekstraselluler mampu menghasilkan *yield* lebih dari 10 g/L seperti pada produksi scleroglukan dari *Sclerotium glaucanicum* (Wang dan McNeil, 1995; Gibs dan Seviour, 1996).

Sifat Fungsional Turunan Epiglukan secara Sulfatasi

Modifikasi epiglukan secara sulfatasi dengan metode yang dikembangkan oleh Zhang, *et al.* (2001), menghasilkan turunan epiglukan yang memiliki tingkat kelarutan dalam air lebih tinggi. Dengan perlakuan dialisis terhadap hasil modifikasi sulfatasi sebelum dikeringkan mampu menghilangkan sebagian besar sisa garam mineral dan senyawa monosakarida atau oligosakarida yang masih terikat pada senyawa turunan yang dihasilkan selama proses preparasi. Senyawa glukan yang berkonfigurasi ikatan α - juga bisa mengalami peningkatan kelarutan dalam air apabila disulfatasi seperti yang dilaporkan oleh Bao, *et al.* (2001) pada produksi (1 \rightarrow 3)- α -D-glukan dari spora *Ganoderma lucidum*. Selain terjadi peningkatan kelarutan pada epiglukan hasil sulfatasi, sifat aktivitas antitumor dari senyawa turunan ini juga sepertinya menunjukkan adanya peningkatan. Uji antitumor secara *in vitro* menggunakan sel leukemia L1210 yang ditumbuhkan pada medium Eagle's MEM, menunjukkan adanya penurunan nilai LC₅₀ turunan epiglukan secara sulfatasi. Nilai LC₅₀ dari senyawa asal, epiglukan, adalah 22 μ g/L, sedangkan nilai LC₅₀ dari senyawa turunannya adalah 13 μ g/L. Hal ini berarti terjadi peningkatan kemampuan turunan epiglukan dalam menghambat pertumbuhan tumor sel leukemia. Kasus peningkatan sifat antitumor dari senyawa hasil sulfatasi semacam ini pernah dilaporkan terjadi pada sulfatasi (1 \rightarrow 3)- α -

D-glukan dari *Ganoderma lucidum* oleh Zang, *et al.* (2000).

Sifat Fungsional Turunan Epiglukan secara Karboksimetilasi

Turunan epiglukan secara karboksimetilasi yang dilakukan berdasar pada metode yang dikembangkan oleh Wang, *et al.* (2004) menghasilkan senyawa yang mengalami perubahan kelarutan secara drastis. Epiglukan yang semula sama sekali tidak bisa larut dalam air dingin, setelah dikarboksimetilasi kelarutannya dalam air dingin sangat tinggi. Selain terjadi peningkatan kelarutan pada epiglukan hasil karboksimetilasi, sifat aktivitas antitumor dari senyawa turunan ini juga menunjukkan adanya peningkatan berdasarkan penurunan nilai LC₅₀. Nilai LC₅₀ dari senyawa asal, epiglukan, adalah 22 μ g/L, sedangkan nilai LC₅₀ dari senyawa turunannya adalah 14 μ g/L. Hal ini berarti terjadi peningkatan kemampuan turunan epiglukan dalam menghambat pertumbuhan tumor sel leukemia. Kasus peningkatan sifat antitumor dari senyawa hasil karboksimetilasi semacam ini pernah dilaporkan terjadi pada (1 \rightarrow 3)- α -D-glukan dari *Ganoderma lucidum* oleh Zhang, *et al.* (2000).

Senyawa glukan yang berkonfigurasi ikatan α - juga bisa mengalami peningkatan kelarutan dalam air apabila dikarboksimetilasi seperti yang dilaporkan oleh Bao, *et al.* (2001) pada produksi (1 \rightarrow 3)- α -D-glukan dari spora *Ganoderma lucidum*.

Sifat Antitumor Senyawa Turunan Epiglukan

Produk turunan epiglukan secara sulfatasi dan karboksimetilasi yang diuji sifat antitumornya secara *in vitro* berdasarkan metode yang dikembangkan oleh Sumatra (1998), menggunakan sel leukemia L1210 yang ditumbuhkan pada medium Eagle's MEM menunjukkan adanya peningkatan kemampuan senyawa turunan ini dalam menghambat pertumbuhan sel tumor tersebut. Uji *in vitro* terhadap senyawa induk glukan

ini cukup mengalami kesulitan karena tingkat kelarutan dalam air sangat rendah. Banyak sekali senyawa glukukan yang dihasilkan oleh mikroorganisme memiliki kelarutan yang rendah dalam air seperti (1→3)- α -D-glukan dari *Lentinus Edodes* (Zhang, *et al.* 2002).

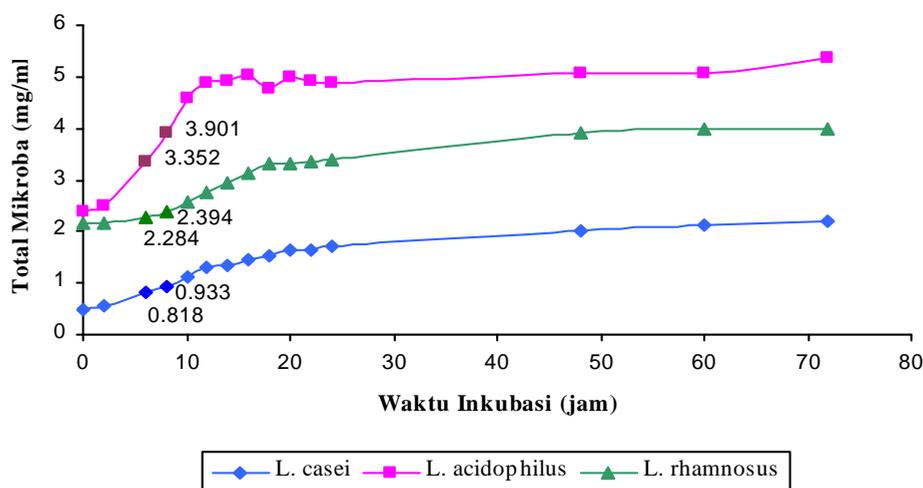
Kemampuan tingkat kenaikan menghambat pertumbuhan tumor senyawa turunan epiglukan hanya dilihat dari nilai LC₅₀ dari masing-masing senyawa turunan. Melalui proses sulfatasi dan karboksimetilasi epiglukan akan mengalami proses substitusi pada rantai utama maupun rantai cabang. Derajat substitusi ini akan mempengaruhi fitur struktur dan konformasi senyawa turunan epiglukan ini dalam pelarut air. Perbedaan struktur dan konformasi inilah yang diduga berkaitan erat dengan aktivitas biologis dari turunan epiglukan seperti yang pernah ditunjukkan oleh Bao, *et al.* (2001) yang membandingkan aktivitas imunologi polisakarida (1→3)- β -D-glukan dan beberapa turunannya yang dihasilkan oleh spora *Ganoderma lucidum*. Hasil pengujiannya menunjukkan adanya dugaan bahwa derajat substitusi pada rantai utama dan panjang rantai cabang berkaitan erat dengan bioaktivitas senyawa glukukan yang dimaksud.

Uji antitumor secara *in vitro* terhadap senyawa alam seperti glukukan adalah pengujian awal yang perlu dilakukan sebelum dilakukan uji *in vivo*. Meskipun sudah ada beberapa turunan glukukan baik yang dilakukan secara sulfatasi maupun karboksimetilasi yang dapat menghambat pertumbuhan sel tumor, bagaimana sebenarnya mekanisme senyawa ini melakukan penghambatan terhadap sel tumor itu sendiri masih belum jelas. Hamuro dan Cihara (1973) menyatakan bahwa polisakarida mampu mengubah struktur α -heliks serum albumin bovine. Dengan kemampuan ini polisakarida mungkin memiliki pengaruh signifikan terhadap struktur protein dan karakter dari permukaan sel tumor seperti yang ditunjukkan oleh Maeda, *et al.* (1974). Hasil penelitian yang lain menunjukkan terjadinya proses

penetrasi oleh turunan dextran hasil sulfatasi terhadap muatan permukaan sel-sel tumor sehingga terjadi kontak antar sel tumor yang dapat menyebabkan sel tumor tersebut berhenti membelah (Ambrose, *et al.*, 1956). Liu, *et al.* (2000) juga melaporkan adanya penghambatan adhesi sel-sel tumor payudara carcinoma (MCF-7 dan MDA-MB231) menjadi berbagai substrat sel tumor baru. Terjadinya penghambatan ini diduga karena adanya gugusan yang tersulfatasi, berat molekul dan juga struktur polisakarida yang tersulfatasi tersebut.

Hasil Uji Prebiotik Senyawa Turunan Epiglukan secara Sulfatasi

Probiotik *L. casei*, *L. acidophilus*, dan *L. rhamnosus* memiliki laju pertumbuhan yang berbeda dalam media MRS-broth tanpa adanya penambahan senyawa epiglukan. Profil pertumbuhan dari ketiga probiotik tersebut dapat dilihat pada **Gambar 2**. Penambahan epiglukan dan turunannya ternyata dapat mempengaruhi laju pertumbuhan masing-masing mikroorganisme probiotik tersebut. Meskipun demikian besarnya pengaruh senyawa epiglukan dan turunannya terhadap masing-masing bakteri probiotik tidak sama. Penambahan glukukan termodifikasi tidak selalu dapat meningkatkan laju pertumbuhan probiotik dibanding dengan laju pertumbuhannya pada media yang mengandung glukukan yang tidak termodifikasi. Prosentase peningkatan kecepatan pertumbuhan yang paling besar terjadi pada mikroorganisme *L. rhamnosus* (57,1 %) dengan laju pertumbuhan 0.024 μ g/jam pada media tanpa glukukan menjadi 0.056 μ g/jam pada media yang ditambahi glukukan tersulfatasi. Terjadinya peningkatan laju pertumbuhan mikroorganisme probiotik akibat penambahan senyawa glukukan ini mengindikasikan bahwa senyawa tersebut bersifat prebiotik. Data peningkatan laju pertumbuhan probiotik akibat penambahan senyawa glukukan selengkapnya dapat dilihat pada **Tabel 1**.



Gambar 2. Profil pertumbuhan mikroorganisme probiotik pada media MRS-Broth yang tidak ditambahkan epiglukan

Tabel 1. Kecepatan pertumbuhan probiotik dalam media yang mengandung glukon

Jenis media	Jenis Probiotik	μ ($\mu\text{g}/\text{jam}$)	Persentase peningkatan μ (%)
Media MRS-Broth tanpa glukon	<i>L. casei</i>	0,066	
	<i>L. acidophilus</i>	0,076	
	<i>L. rhamnosus</i>	0,024	
MRS-Broth + glukon	<i>L. casei</i>	0,075	12,0
	<i>L. acidophilus</i>	0,109	30,3
	<i>L. rhamnosus</i>	0,055	56,4
MRS-Broth + glukon modifikasi	<i>L. casei</i>	0,087	24,1
	<i>L. acidophilus</i>	0,078	2,6
	<i>L. rhamnosus</i>	0,056	57,1

Data prosentase kenaikan laju pertumbuhan pada Tabel 1 memperlihatkan bahwa kecepatan pertumbuhan mikroorganisme probiotik dalam media yang mengandung glukon dan glukon hasil modifikasi hampir sama dan bahkan untuk *L. acidophilus*, laju pertumbuhannya menurun jika ditumbuhkan pada media yang mengandung glukon hasil modifikasi. Hal ini menunjukkan bahwa respon dari masing-

masing probiotik berbeda terhadap keberadaan prebiotik dalam lingkungan pertumbuhannya.

Pengujian Kelarutan -Glukon Hasil Modifikasi

Pengujian kelarutan terhadap turunan epiglukan baik yang dilakukan secara sulfatasi maupun karboksimetilasi menunjukkan adanya peningkatan tingkat kelarutan. Senyawa induk epiglukan yang semula sulit dan sama sekali tidak larut dalam air dingin, setelah mengalami modifikasi baik secara sulfatasi maupun karboksimetilasi menjadi larut dalam air dingin. Hasil pengukuran viskositas menggunakan viskosimeter terhadap kedua senyawa turunan tersebut menunjukkan adanya penurunan viskositas sebanyak kurang lebih 2,5x dibanding senyawa induknya. Terjadinya peningkatan kelarutan

ini diduga karena terjadinya substitusi gugusan hidroksil oleh karboksimetil dan sulfat yang lebih bersifat polar. Peningkatan kelarutan ini juga diduga terjadi akibat adanya penurunan berat molekul epiglukan selama proses sulfatasi maupun karboksimetilasi.

Terjadinya peningkatan kelarutan akibat proses sulfatasi dan karboksimetilasi terhadap epiglukan yang dapat menyebabkan viskositas cairannya menjadi sangat rendah juga menjadi salah satu penyebab terjadinya peningkatan sifat bioaktivitas senyawa tersebut. Selama proses sulfatasi maupun karboksimetilasi, sebagian epiglukan dapat mengalami hidrolisis menjadi polisakarida yang panjang rantainya lebih pendek. Hidrolisis sebagian ini diduga akan meningkat jikalau proses sulfatasi maupun karboksimetilasinya dilakukan pada suhu yang lebih tinggi, seperti yang terjadi pada proses sulfatasi (1→3)- α -D-glukan dari *Lentinus Edodes* (Zhang, *et al.* 2002). Proses karboksimetilasi glukan linier, curdlan, diatas 55° C juga dapat menghilangkan interaksi hidrofobik antar gugusan metylen yang terbentuk di karbon C-6 akibat munculnya gugusan karboksimetil yang hidrofilik (Jin, *et al.*, 2006).

KESIMPULAN

Proses modifikasi epiglukan baik secara sulfatasi maupun karboksimetilasi menghasilkan turunan epiglukan yang memiliki tingkat kelarutan dalam air lebih tinggi. Nilai LC₅₀ dari senyawa asal, epiglukan, adalah 22 μ g/L, sedangkan nilai LC₅₀ dari senyawa turunannya secara sulfatasi adalah 14 μ g/L dan secara karboksimetilasi nilai LC₅₀ 13 μ g/L. Hal ini berarti terjadi peningkatan kemampuan turunan epiglukan dalam menghambat pertumbuhan sel tumor leukemia. Selain itu, senyawa glukan ini juga berpotensi sebagai senyawa prebiotik yang dapat

meningkatkan laju pertumbuhan probiotik *L. casei*, *L. acidophilus*, dan *L. rhamnosus*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional atas dukungan dana yang telah diberikan untuk terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ambrose EJ, James AM, & Lowick LBH (1956). *Differences between the electrical change carried by normal and homologous tumor cells. J. of E. Nature* (177): 576-577.
- Bao X, Liu C, Fang J, & Li X (2001). *Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of Ganoderma lucidum* (fr.) KARST. *J. of Carbohydrate Research* (332): 67-74.
- Bao X, Duan JC, Fang X, & Fang J (2001). *Chemical modifications of the (1→3)- α -d-glukan from spores of Ganoderma lucidum and investigation of their physicochemical properties and immunological activity. J. of Carbohydrate Research* (336): 127-140.
- Hamuro J & Chihara G (1973). *Effect of antitumor polysaccharides on the higher structure of serum protein. J. of Nature* (245): 40-41.
- Jin Y, Zhang H, Yin Y, & Nishinari K (2006). *Comparison of curdlan and its carboxymethylated derivative by means of rheology, DSC, and AFM. J. of Carbohydrate Research* (341): 90-99.

- Liu JM, Haroun-Bouhedja F, & Boisson-Vidal C (2000). *Analysis of the in vitro inhibition of mammary adenocarcinoma cell adhesion by sulfated polysaccharides*. **J. of Anti Cancer Research** (20): 3265-3271.
- Maeda YY, Chihara G, & Ishimura K (1974). *Unique increase of serum protein and action antitumor polysaccharides*. **J. of Nature** (252): 250-252.
- Ramesh HP & Tharanathan RN (2003). *Carbohydrates the renewable raw materials of high biotechnological value*. **J. of Critical Reviews in Biotechnology** (23): 149-173.
- Schmid F, Stone BA, McDougall BM, Bacic A, Martin KL, Brownlee, RTC, Chai E & Seviour RJ (2001). *Structure of epiglucan, a highly side-chain/branched (1→3;1→6)-β-glucan from the micro fungus Epicoccum nigrum Ehrenb. Ex Schlecht*. **Carbohydrate Research** (331): 163-171.
- Smaali MI, Michaud N, Marzouki N, Legoy MD, & Maugard T (2004). *Comparison of two -glucosidases for the enzymatic synthesis of -(1-6)- -(1-3)-gluco-oligosaccharides*. **Biotechnology Letters** (26): 675–679.
- Wang Y & McNeil B (1995). *pH effect on exopolysaccharide and oxalic acid production in cultures of Sclerotium glaucum*. **J. of Enzyme and Microbial Technology** (17): 124-130.
- Wang Y, Zhang L, & Ruan D (2004). *Preparation and structure of five derivatives of β-(1→3)-d-glucan isolated from poria cocos sclerotium*. **J. of Polymer Science** (22): 137-145.
- Zhang P & Cheung PCK (2002). *Evaluation of sulfated lentinus edodes α-(1→3)-D-glucan as a potential antitumor agent*. **J. Bioscience Biotechnology and Biochemistry** (66): 1052-1056.