

PRODUKSI BETA-1,3 GLUKAN DARI *Agrobacterium* DAN AKTIVITAS PENYEMBUHAN LUKA TERBUKA PADA TIKUS PUTIH

Kusmiati¹, Fitria Rachmawati², Syafrida Siregar²,
Sukma Nuswantara¹ dan Amarila Malik²

1. Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI, Cibinong, Bogor 16911, Indonesia
2. Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok 16424, Indonesia

E-mail: amarila.malik@farmasi.ui.ac.id

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas produk beta-1,3 glukukan hasil ekstraksi dari *Agrobacterium sp* Bro 1.2.1 isolat lokal galur tipe liar dan galur tipe mutan terhadap penyembuhan luka terbuka pada hewan coba tikus putih galur *Sprague Dawley* yang dibuat luka terbuka. Ekstraksi produk beta-1,3 glukukan dilakukan dengan cara pengendapan dan dilanjutkan dengan pemurnian pada kromatografi kolom sebagai fraksi gradien KCl. Percobaan uji aktivitas dibagi menjadi tujuh kelompok perlakuan yaitu kontrol negatif, kontrol positif dengan Povidon iodium, dua kelompok dari dua produk beta-1,3 glukukan komersil dengan dosis masing-masing 0,02 mg/4 cm², tiga kelompok beta-1,3 glukukan uji dengan dosis masing-masing yaitu 0,02 mg/4 cm², 0,10 mg/4 cm² dan 0,5 mg/4 cm². Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara kontrol negatif dengan kontrol positif dan kelompok uji pada dosis tertinggi 0,5 mg/4 cm² dibandingkan kelompok kontrol negatif dan kontrol positif (p<0.05) menggunakan analisis statistik beda nyata terkecil.

Abstract

Production of beta-1,3 glucan from *Agrobacterium* and its wound healing activity on white rat. The objective of this study was to determine the activity of beta-1,3 glucan product extracted from local *Agrobacterium sp* Bro 1.2.1, both wild-type and mutant-type, on opened-wound healing process. Beta-1,3 glucan product was extracted by precipitation, and the purification was carried out by column chromatography as KCl gradient fractions. In this study, white *Sprague Dawley* rats were employed, and have been treated for opened-wound condition. Seven groups were performed in this experiment, i.e. the negative control, the positive control employing povidone iodine, the two groups of two commercial beta-1,3 glucan with 0,02 mg/4 cm² each, and the last three groups of beta-1,3 glucan as the test group with 0,02 mg/4 cm², 0,10 mg/4 cm² and 0,50 mg/4 cm², respectively. The result showed significant differences of wound-healing activity performing statistical analysis of the least significance between the negative control, the positive control, as well as the highest dose of the test group of beta-1,3 glucan, at the dose of 0,5 mg/4 cm² (p<0.05).

Keywords: Agrobacterium sp Bro1.2.1, Beta-1,3 glucan, wound healing.

1. Pendahuluan

Beta-1,3 glukukan adalah polisakarida yang tersusun dari monomer glukosa dengan ikatan β -1 \rightarrow 3. Polisakarida ini dihasilkan oleh ragi, gandum dan bakteri. Kelompok bakteri Rhizobiaceae dilaporkan menghasilkan beta-1,3 glukukan, sebagai contoh adalah *Agrobacterium sp*. Bakteri ini termasuk Gram negatif, sel dapat berpasangan, serta tidak berspora. *Agrobacterium* bersifat aerob, namun pada kondisi anaerob, beberapa galur dapat bertahan dengan adanya

nitrat, dan beberapa masih dapat hidup dalam kondisi kekurangan oksigen. Temperatur optimum untuk pertumbuhan adalah berkisar 25-28°C [1].

Secara umum beta-1,3 glukon memiliki beberapa manfaat antara lain sebagai anti infeksi terhadap mikroorganisme seperti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Pneumocytis carinii*, *Listeria monocytogenesis*, *Leishmania donovani*, *Herpes simplex* yang meliputi bakteri, fungi, virus dan parasit [2]. Senyawa ini juga memiliki efek anti tumor dan berpotensi sebagai antioksidan yang melindungi makrofag darah dari serangan radikal bebas, serta mampu menyembuhkan luka. Luka yang diberi beta-1,3 glukon akan menunjukkan adanya makrofag dalam jumlah yang lebih banyak. Dilaporkan bahwa lima hari setelah insisi, luka yang diberi beta-1,3 glukon sudah mengalami re-epitelisasi dibandingkan kontrol. Fibroplasia pada luka juga meningkat pada hari kelima sampai ketujuh. Pada hari kesepuluh setelah insisi, reepitelisasi pada luka telah sempurna [3,4]. Aktivitas lainnya yang telah dilaporkan adalah sifat *anti aging*, peremajaan kulit dan penyembuhan luka bakar [5].

Kosmetika kulit merupakan salah satu produk yang penggunaannya lebih menonjol dibandingkan jenis produk kosmetika lain. Bahan aktif untuk kosmetika kulit pada industri kosmetika dalam negeri masih menggunakan bahan baku impor. Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi dan menguji salah satu aktivitas produk beta-1,3 glukon yang dihasilkan oleh *Agrobacterium sp* isolat lokal yaitu terhadap penyembuhan luka terbuka pada tikus putih. Pengujian ini adalah untuk mempelajari aktivitas produk beta-1,3 glukon pada aplikasinya sebagai bahan aktif dalam formulasi kosmetika kulit. Metode kultur mikroba untuk produksi polisakarida ini lebih mudah, cepat serta dapat dilakukan secara berkesinambungan, sehingga berpotensi untuk dikembangkan dalam skala industri sebagai pengganti produk beta-1,3 glukon impor. Uji aktivitas penyembuhan luka terbuka dilakukan dengan memformulasi produk beta-1,3 glukon dalam sediaan krim sebagai bentuk sediaan yang umum dalam formulasi kosmetik kulit.

2. Eksperimental

Bakteri yang digunakan untuk memproduksi beta-1,3 glukon adalah *Agrobacterium sp* Bro 1.2.1 galur tipe liar (L) dan galur tipe mutan (M) koleksi Laboratorium Biopolimer, Puslitbang Bioteknologi, LIPI, Cibinong hasil isolasi dari tanaman brokoli di Lembang, Bandung, serta hasil mutasi tipe liar pada penelitian sebelumnya.

Sebagai pembanding dalam perlakuan pengolesan krim mengandung beta-1,3 glukon terhadap luka terbuka, digunakan jenis glukon komersil yaitu beta-1,3 glukon dari perusahaan Takeda, Jepang, dan perusahaan Pacific Co., Thailand.

Agrobacterium sp Bro 1.2.1 dikultur dalam media sintetik untuk menghasilkan beta-1,3 glukon. Komposisi media sebagai berikut: 4 g sukrosa, 0,15 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,1 g KH_2PO_4 , 0,05 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g ekstrak ragi, 0,5 g CaCO_3 , 0,1 ml larutan mineral dan 100 ml akuades. Media disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atmosfer.

Perlakuan dilakukan terhadap tikus putih jantan galur *Sprague Dawley* yang diperoleh dari Pusat Pemeriksaan Obat dan Makanan (PPOM), Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta. Umur, berat badan dan kondisi percobaan dibuat hampir seragam untuk mengurangi adanya variasi biologis dan faktor-faktor yang dapat mempengaruhi percobaan. Sebelum dilakukan percobaan, tikus diadaptasikan selama dua minggu agar dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru.

Satu koloni bakteri yang murni dan segar ditumbuhkan ke dalam 3 ml medium cair PY dengan komposisi berikut: dalam 100 ml mengandung 1 g pepton, 0,5 g ekstrak ragi dan 0,5 g NaCl. Selanjutnya diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu ruangan dan sentrifus dengan kecepatan 150 rpm. Dari prakultur tersebut diambil sebanyak 1 % untuk ditumbuhkan ke dalam medium PY 20 ml, diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruangan dan digoyang dengan kecepatan yang sama. Dari kultur terakhir sebanyak 1% diinokulasikan ke dalam medium sintetik untuk produksi beta-1,3 glukon. Kultur bakteri digoyang selama 6 hari dengan kecepatan 150 rpm pada suhu ruangan.

Produk beta-1,3 glukon diekstraksi berdasarkan metode yang dijabarkan [6]. Kultur kedua galur bakteri, yaitu tipe liar dan tipe mutan, dipanen pada fase stasioner. Suspensi biakan disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit. Supernatan dibuang sedangkan endapan yang terbentuk ditambah dengan 10 ml HCl 5 N dan disentrifus kembali dengan kondisi sama. Endapan yang diperoleh ditambahkan 10 ml NaOH 1 N kemudian disentrifus kembali dengan kecepatan yang sama. Endapan yang terbentuk merupakan biomasa sel ditimbang sebagai berat kering (mg). Bagian supernatan ditambahkan sejumlah HCl 5 N sedikit demi sedikit sampai mencapai pH 7,0, kemudian disentrifus kembali

selama 20 menit dengan kecepatan yang sama. Endapan yang terbentuk dicuci dengan 10 ml akuades, suspensi tersebut disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Pencucian dilanjutkan menggunakan 10 ml etanol, disentrifus sehingga diperoleh endapan yang terpisah. Endapan tersebut dikeringkan pada suhu 50°C dan ditimbang sebagai bobot beta-1,3 glukukan dalam mg.

Pemurnian produk beta-1,3 glukukan dilakukan menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam DEAE selulosa dan *Sephadex G-75*. Diameter kolom adalah 2 cm dengan tinggi 27 cm. Larutan sampel sebanyak 200 µl dimasukkan ke dalam kolom yang berisi gel DEAE selulosa, kemudian kolom dialiri dengan 10 ml akuades dan kecepatan aliran diatur 40 tetes/menit. Eluat yang dikeluarkan dipisahkan sebagai fraksi air sebanyak dua fraksi yang masing-masing berisi 200 tetes (~5 ml). Kemudian kolom dielusi dengan campuran larutan (100 ml H₂O dan 100 ml KCl 0,5N). Eluat merupakan gradien KCl yang ditampung sebagai fraksi KCl, yaitu fraksi ke 1 hingga fraksi ke 35 sebanyak 200 tetes per fraksi. Fraksi KCl diukur kadar glukosa dan kadar protein berdasarkan metode yang dijabarkan [7,8]. Sebanyak 1 ml dari setiap fraksi dipipet dan dianalisis kadar glukosa dalam larutan sampel. Sedangkan untuk kadar protein sebanyak 200 µl dari setiap fraksi, ditambah 300 µl akuades dianalisis kadar protein dalam larutan sampel. Fraksi-fraksi yang menghasilkan kadar glukosa terbesar dikumpulkan untuk proses pemurnian lanjut. Fraksi-fraksi yang tertinggi tersebut dimasukkan ke dalam kolom yang berisi matriks *Sephadex G-75*. Ke dalam kolom dialiri air sebanyak 43 ml lalu setiap eluat yang keluar ditampung masing-masing sebanyak 33 tetes (~1,5ml). Fraksi yang ditampung mencapai 30 fraksi. Fraksi-fraksi tadi diukur kembali kadar glukosa dan kadar proteinnnya. Dari setiap fraksi diambil 1 ml kemudian diberi perlakuan yang sama seperti analisis kadar glukosa dalam larutan sampel. Dari setiap sampel diambil 200 µl ditambah 300 µl aquades lalu diberi perlakuan yang sama seperti analisis kadar protein dalam larutan sampel.

Penyembuhan luka terbuka pada hewan coba menggunakan basis krim non ionik mengandung beta-1,3 glukukan. Komposisi basis krim terdiri dari bahan-bahan sebagai berikut: 25 g Vaseline album, 10g Cetil alkohol, 0,97 g Span 60, 1,03 g Tween 60 dan 0,2 g Nipagin dilarutkan dengan akuades ad 100 g [9-11]. Pada percobaan pendahuluan diketahui, bahwa untuk menutup seluruh permukaan luka seluas 4 cm² diperlukan basis krim sebanyak 0,2 gram. Sediaan krim mengandung beta-1,3 glukukan hasil ekstraksi dicobakan dengan dosis bervariasi. Sediaan krim dengan dosis 0,02 mg/4 cm² mengandung 30 mg beta-1,3 glukukan, sedangkan pada dosis 0,1 mg/4 cm² mengandung 150 mg beta-1,3 glukukan dan dosis 0,5 mg/4 cm² mengandung 750 mg beta-1,3 glukukan dalam 100 gr basis krim.

Percobaan di kandang dirancang menggunakan acak lengkap dengan 4 ulangan (4 ekor /kelompok), yang dibagi menjadi 7 kelompok perlakuan: kelompok A (kontrol negatif) diberi basis krim sebanyak 0.2 g/4 cm², kelompok B (kontrol positif) dibubuhi larutan povidon iodum 10% (Kimia Farma) menggunakan kapas, kelompok C dan kelompok D diberi krim beta-glukan komersil 1 (Takeda) dan krim beta-glukan komersil 2 (Pasific Co.), masing-masing dengan dosis 0,02 mg/4 cm², kelompok E diberi krim beta-glukan Bro 1.2.1 dengan dosis 0,02 mg/4 cm², kelompok F diberi krim beta-glukan Bro 1.2.1 dengan dosis 0,1 mg/4 cm² dan kelompok G diberi krim beta-glukan Bro 1.2.1 dengan dosis 0,5 mg/4 cm².



Gambar 1. Tikus putih yang dilukai

Penentuan efek penyembuhan luka dilakukan menurut metode Morton yang telah dimodifikasi [12]. Pada hari ke-0 tikus dibius dengan eter kemudian diletakkan di atas papan bedah dengan posisi telungkup dan keempat kaki diikat. Rambut disekitar punggung tikus dicukur kemudian dibersihkan dengan kapas yang dibasahi alkohol 70%. Pola luka dibuat berbentuk persegi dengan sisi ± 2 cm dan kulit di daerah tersebut diangkat dengan pinset dan digunting sampai bagian dermis beserta jaringan yang terikat di bawahnya sehingga terjadi pendarahan pada bagian tertentu. Luka dianggap berbentuk lingkaran (Gambar 1).

Persentase penyembuhan luka diukur berdasarkan luas daerah luka, dan diukur menggunakan jangka sorong sampai 0,1 mm terdekat. Pengukuran dilakukan pada hewan-hewan coba pada semua ulangan dan semua kelompok yaitu dengan arah melintang, membujur dan kedua diagonal mulai hari ke-2 sampai hari ke-14. Perlakuan pengolesan sediaan krim dilakukan setiap hari. Diameter rata-rata dari pengukuran diambil sebagai data.

Luas dianggap berbentuk lingkaran sehingga luas luka dihitung sebagai berikut:

$$L = \frac{1}{4} \times \pi \times D^2$$

$$L = 0.7854 \times D^2$$

Sedangkan persentase penyembuhan luka diperhitungkan dengan rumus berikut:

$$L = \frac{(D_1)^2 - (D_2)^2}{(D_1)^2} \times 100\%$$

dimana D_1 = diameter luka sehari setelah luka dibuat, dan D_2 = diameter luka pada hari pengamatan.

3. Hasil dan Pembahasan

Ekstraksi dilakukan terhadap kultur sel setelah bakteri diinkubasi 6 hari yaitu setelah mencapai fase stasioner yang diketahui dari penelitian pendahuluan. Perolehan bobot sel kering dan produk beta-1,3 glukon dari kedua galur adalah sebagai berikut, sebagaimana tercantum pada Tabel 1.

Galur Bro 121 M memproduksi sel 25% lebih banyak dari Bro 121 L, dan berat kering produk beta-1,3 glukon yang diperoleh oleh galur Bro 121 M adalah 44 mg/g sel, dan galur tipe liar adalah 43 mg/g sel. Terlihat bahwa kemampuan memproduksi beta-1,3 glukon dari galur tipe mutan dibandingkan galur tipe liar lebih tinggi, sebagaimana yang menjadi tujuan dari mutasi galur. Namun, dengan asumsi bahwa kedua produk beta-1,3 glukon identik, maka pada percobaan ini produk beta-1,3 glukon baik dari tipe M maupun dari tipe L digunakan sebagai produk beta-1,3 glukon isolat lokal.

Produk beta-1,3 glukon hasil ekstraksi dari kultur *Agrobacterium sp* Bro 1.2.1 liar dan mutan dimurnikan dengan kromatografi kolom. Tahap awal menggunakan matrix DEAE selulosa dengan prinsip kerja berdasarkan proses pertukaran anion. Beta-1,3 glukon diikat oleh gugus $-O-(CH_2)_2-N^+-(CH_2-CH_3)_2$ pada matriks,

Tabel 1. Bobot kering sel dan produksi beta-1,3 glukon dari *Agrobacterium sp*. Bro 1.2.1 tipe liar dan mutan.

Isolat	Bobot Sel Kering (mg/l)	Bobot beta-1,3 glukon kering (mg/g sel)	Glu (mg/l)	Pro (mg/l)
Bro 121 L	32,6	43,0	2,9	63,5
Bro 121 M	43,4	44,0	2,7	82,2

Keterangan: L = tipe liar; M = tipe mutan; Glu = glukosa; Pro = protein.

Tabel 2. Kadar glukosa dan protein dalam sampel beta-1,3 glukon hasil pemurnian dengan kolom DEAE Selulosa dan Sephadex G-75.

Kolom	Isolat	Fraksi	Analisa Kadar mg/L	
			Glu	Pro
DEAE Selulosa	Bro 121 L	14	1.4	1.02
	Bro 121 M	19	0.59	1.75
Sephadex G-75	Bro 121 L	17	0.18	0.25
	Bro 121 M	9	0.14	0.04

Keterangan: L = tipe liar; M = tipe mutan; Glu = glukosa; Pro = protein.

kemudian dielusi dengan gradien KCl sehingga menyebabkan senyawa yang terikat dalam matriks akan lepas melewati kolom sebagai fraksi-fraksi. Fraksi-fraksi dengan kadar produk beta-1,3 glukon yang tinggi dipilih berdasarkan kadar glukosa tertinggi, yaitu fraksi ke-14 dari isolat Bro 121 L dan fraksi ke-19 isolat Bro 121 M. Kadar glukosa kedua fraksi dibandingkan dengan sebelum pemurnian lebih rendah berturut-turut sebesar 52% dan 78%. Hasil fraksinasi ditampilkan pada Tabel 2.

Berdasarkan analisa kadar glukosa hasil pemurnian pertama, fraksi-fraksi tersebut dimurnikan kembali menggunakan kolom *Sephadex G-75*, yaitu pemisahan dengan filtrasi gel berdasarkan perbedaan bobot molekul. Teknik ini didasari atas prinsip inklusi dan eksklusi suatu zat terlarut melalui suatu fase diam yang terbuat dari gel polimer yang berikatan silang dan berpori heterogen.

Kadar glukosa pada fraksi-fraksi setelah pemurnian tahap kedua ini diukur kembali, dan diperoleh kadar glukosa tertinggi pada fraksi ke-17 Bro 121 L dan pada fraksi ke-9 Bro 121 M. Kadar glukosa kedua fraksi mengalami penurunan berturut-turut sebesar 76% dan 87% dibandingkan kadar glukosa sebelum pemurnian. Fraksi-fraksi dengan kadar glukosa tertinggi merupakan fraksi yang mempunyai kandungan produk beta-1,3 glukon tinggi dibandingkan fraksi-fraksi lainnya. Hal ini disebabkan bahwa beta-1,3 glukon adalah suatu polimer dengan berat molekul tinggi sekitar 44.000-77.000 yang tersusun atas monomer-monomer glukosa [13]. Pengukuran kadar protein pada percobaan ini dilakukan untuk menguji kemurnian produk. Tingkat kadar protein menunjukkan tingkat kemurnian.

Percobaan uji aktivitas produk beta-1,3 glukon hasil ekstraksi dan pemurnian dari *Agrobacterium sp* Bro 1-2-1 menggunakan dosis uji terkecil yaitu 0,02mg/4 cm², kemudian dosis ditingkatkan menjadi 0,1 mg/4 cm² dan 0,5 mg/4 cm². Variasi ini dibuat untuk menentukan dosis berapa yang dapat memberikan penyembuhan terhadap luka terbuka. Hasil pengamatan persentase penyembuhan luka dapat dilihat pada Gambar 2 dan Tabel 3.

Data hasil pengujian terdistribusi normal dan homogen berdasarkan uji kenormalan menurut Kolmogorov-Smirnov dan homogenitas varian menurut uji Levene. Kemudian analisis dilanjutkan dengan uji BNT untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa perlakuan beta glukon Bro 1.2.1 dosis 0,5 mg/4 cm² ada perbedaan bermakna terhadap kelompok perlakuan kontrol negatif yaitu luka hanya diolesi basis krim saja ($p < 0.05$). Pada kelompok perlakuan B,C,D,E dan F juga menunjukkan adanya persentase penyembuhan luka tetapi tidak berbeda nyata secara statistik ($p > 0.05$). Perlakuan krim mengandung

Gambar 2. Grafik persentase penyembuhan luka terbuka.

Keterangan: A = Kontrol negatif, B = Kontrol positif, C = Beta glukon standar I, D = Beta glukon standar II, E = Beta glukon 0,02 mg/luka, F = Beta glukon 0,5 mg/luka, G = Beta glukon 1,0 mg/luka.

Tabel 3. Hasil rata-rata persentase penyembuhan luka terbuka (%) pada tikus putih

Hari ke	Kelompok Perlakuan						
	A	B	C	D	E	F	G
2	1,40	3,62	5,15	4,96	1,85	2,62	2,20
3	5,89	8,70	8,23	8,95	6,99	9,12	7,12
4	9,85	14,80	11,30	13,16	11,79	14,46	13,81
5	14,92	17,59	16,99	16,98	16,90	18,86	18,77
6	20,10	22,90	22,03	23,46	22,46	25,62	25,83
7	23,31	27,73	34,30	35,67	28,64	34,80	31,18
8	29,21	33,62	42,35	38,70	32,66	40,15	36,93
9	37,59	45,28	44,99	49,15	39,92	43,36	47,69
10	41,20	51,75	48,71	47,55	43,56	47,39	55,80
11	50,08	65,28	54,97	56,50	52,61	58,13	65,52
12	54,76	72,00	61,60	60,89	61,49	65,45	73,42
13	60,15	76,80	64,25	67,81	64,03	73,51	77,72
14	68,80	83,87	76,92	78,05	73,60	77,75	83,41

Keterangan: A = Kontrol negatif, B = Kontrol positif, C = Beta glukon standar I, D = Beta glukon standar II, E = Beta glukon 0,02 mg/luka, F = Beta glukon 0,5 mg/luka, G = Beta glukon 1,0 mg/luka.

beta glukon Bro1.2.1 menunjukkan semakin besar dosisnya, maka persentase rata-rata penyembuhan luka semakin meningkat walaupun secara statistik tidak berbeda nyata ($p > 0.05$).

Hasil uji BNT pada taraf uji 0.05 menunjukkan perbedaan nyata pada kelompok A dengan kelompok B (kontrol positif) dan G (kelompok uji beta glukon Bro1.2.1 dosis 0,5 mg/ 4 cm²) dimulai pada hari ke-11 sampai hari ke-14. Adanya perbedaan bermakna tersebut menunjukkan bahwa povidon iodum dan beta glukon hasil ekstraksi dari isolat lokal Bro 1.2.1 pada dosis 0,50 mg/luka memberikan efek penyembuhan yang tidak jauh berbeda.

Berdasarkan uji kenormalan dan kehomogenan Levene diketahui data persentase penyembuhan tersebut terdistribusi normal dan homogen dari hari kedua sampai hari keempat belas (data tidak ditampilkan), sehingga metode yang digunakan adalah analisis varian satu arah pada batas kesalahan $p=0,05$.

Dari hari kedua sampai keempat belas, hasil menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan A, B, C, D, E dan F. Perbedaan yang cukup bermakna terlihat pada pengamatan hari kesebelas sampai hari keempat belas pada kelompok A (kontrol negatif) dengan kelompok B (kontrol positif), dan pada pengamatan kelompok G (beta glukon Bro 1.2.1 dosis 0,5 mg/cm²). Penyembuhan terjadi dari hari kedua sampai hari kelima tetapi dengan tingkat penyembuhan yang berbeda-beda. Pada hari keenam sampai hari kedua belas terjadi pembentukan jaringan yang pesat dengan tingkat penyembuhan yang berbeda-beda.

Persentase penyembuhan luka diamati dari luas daerah luka. Diameter awal yang menjadi dasar perhitungan persentase penyembuhan luka adalah diameter satu hari setelah tikus dilukai, bukan pada saat hari tikus dilukai. Hal ini disebabkan ketidakstabilan luka hingga 24 jam setelah tikus dilukai. Setelah 24 jam perlukaan terjadi perubahan sedikit dan selanjutnya stabil [15].

Aktivitas penyembuhan luka terbuka dari produk beta-1,3 glukon lokal baru dapat diamati pada dosis yang tertinggi, yaitu 0,5 mg/4 cm². Hal ini diduga karena tingkat kemurnian produk masih rendah. Produk yang kurang murni masih mengandung senyawa-senyawa lain yang dapat menjadi pengganggu aktivitasnya. Disamping itu dengan adanya kandungan senyawa lain, konsentrasi zat aktif menjadi lebih rendah dari perhitungan. Oleh karena itu perlu dilakukan proses pemurnian tingkat berikutnya seperti penggunaan kolom kromatografi tekanan tinggi preparatif.

Prinsip kerja beta glukon berkaitan erat dengan strukturnya yang unik, yang memungkinkan glukon untuk berikatan dengan reseptor-reseptor spesifik yang terdapat dalam sel-sel makrofag. Sel makrofag merupakan sel utama pada sistem imun termasuk pada kulit. Sel tersebut menyerang serta menghancurkan bakteri, virus dan mikroorganisme yang masuk melalui stimulasi sistem imun tersebut. Selain itu bentuk kompleks beta-glukon reseptor selain meningkatkan aktivitas makrofag serta fungsi fagositnya, juga dapat menghasilkan sitokin [2,3]. Berdasarkan mekanisme aksinya beta glukon merupakan immunomodulator yang meningkatkan sistem imun, disamping aktivitas anti infeksi, anti tumor dan regenerasi sel. Pada luka yang diberi beta glukon dilaporkan menunjukkan adanya jumlah makrofag yang banyak [2,3].

Sediaan beta glukon yang sudah beredar di pasaran antara lain dalam bentuk kapsul, lotion dan krim. Pada percobaan ini dipilih bentuk sediaan krim dengan pertimbangan bahwa sediaan untuk penyembuh luka terbuka pada kulit lebih mengutamakan formulasi yang mengupayakan peningkatan absorpsi zat melalui kulit. Sediaan krim adalah bentuk sediaan setengah padat dengan basis diformulasi sebagai bentuk emulsi air dalam minyak atau minyak dalam air [7]. Sediaan krim beta glukon akan lebih sesuai pada pengembangannya sebagai sediaan kosmetika kulit karena merupakan bentuk sediaan yang tidak lengket dan penampakkannya lebih baik sebagai sediaan kosmetik.

4. Kesimpulan

Isolat *Agrobacterium sp* Bro1.2.1 lokal tipe liar menghasilkan beta glukon sebesar 43,0 mg/gr sel dan tipe mutan menghasilkan lebih banyak yaitu 44,0 mg/gr sel. Rendemen glukosa yang diperoleh dari sampel beta-1,3 glukon setelah pemurnian menggunakan kromatografi kolom dengan matrik DEAE selulosa dan *Sephadex G75*, yaitu: 5,2 % (Bro 1.2.1 liar) dan 6,2% (Bro 121 mutan). Hasil perolehan data dapat disimpulkan bahwa beta glukon hasil ekstraksi dari *Agrobacterium sp* Bro 1.2.1 pada dosis 0,02 mg/4 cm² dan 0,10 mg/4 cm² dan beta glukon komersil pada dosis 0,02 mg/4 cm² belum memiliki efek penyembuhan luka. Sedangkan beta glukon Bro 1.2.1 hasil ekstraksi pada dosis 0,50 mg/4 cm² memiliki efek penyembuhan luka.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan kepada Proyek RUT X/2 tahun 2004 untuk S.N. yang telah membiayai penelitian ini.

Daftar Pustaka

- [1] N. R. Krieg, J. H. Holt, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Volume I*, Williams and Wilkins, Baltimore, 1984.
- [2] G. Hetalnd, N. Ohno, I. S. Aaberge, M. Lovik, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 27 (2000) 111.
- [3] J. Raa, R. Engstad, R. Settineri, Norwegian Beta Glucan Research, *Clinical Application of Natural Medicine Immune: Depression Dysfunction & Deficiency*, [http:// immunocorp.com/beta glucan/research.cpm](http://immunocorp.com/beta%20glucan/research.cpm), 2000.
- [4] L. Ber, Purified Yeast Derivated Beta-1,3 Glucan, A Truly Effective Non-specific Immune Enhancer, <http://betaexpress.com/otherresearch.html>, 1997.
- [5] S. J. Delatte, J. Evans, A. Hebra, W. Adamson, H. B. Othersen, E. P. Tagge, *J. Pediatr. Surg.* 36 (2001) 113.
- [6] M. Hisamatsu, I. Ott, A. Anemura, T. Harada, *J. Gen. Microb.* 103 (1977) 375
- [7] Anonim, *Farmakope Indonesia, Edisi IV*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 1995.
- [8] M. W. Breedveld, L. P. T. M. Zevenhuizen, A. J. B. Zehnder, *App. Environ. Microbiol.* 56 (1990) 86.
- [9] O. H. Lowry, J. R. A Nira, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265.
- [10] H. Ansel, *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*, terjemahan, Farida Ibrahim, UI Press, Jakarta, 1989.
- [11] L. Lachman, *Teori dan Praktek Farmasi Industri*, terjemahan, Siti Suyatmi, UI Press, Jakarta, 1994.
- [12] J. P. Morton, M. H. Malone, *Archieves Int. Pharmacodynamic et de Therapie.* 196 (1990) 117.
- [13] Eliza Magdalena, *Skripsi Sarjana, Jurusan Farmasi FMIPA, Universitas Indonesia, Indonesia*, 1993.
- [14] P. Laurie, S. Wells, *Microbiology and Biotechnology*, Cambridge University Press, Cambridge, 1994.

