

# Isolasi dan Identifikasi Senyawa (-)-Asam Usnat dari *Lichen Usnea* sp. serta Aktivitas Sitotoksiknya terhadap Sel *Murine Leukemia* P388

## (Isolation and Identification of (-)-Usnic Acid Compound from Lichen *Usnea* sp. and Its Cytotoxic Activity on Murine Leukemia P388 Cell)

MAULIDIYAH\*, THAMRIN AZIS, SITTI HADIJAH SABARWATI,  
MUHAMMAD NURDIN

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Halu Oleo,  
Kendari 93232.

Diterima 15 Juli 2014, Disetujui 11 Februari 2015

**Abstrak:** *Lichen* adalah organisme simbiosis antara ganggang dan jamur yang diketahui menghasilkan metabolit sekunder yang khas dan memiliki bioaktivitas. Senyawa golongan depsida, desidon dan dibenzofuran adalah kelompok senyawa yang banyak dijumpai dalam *Lichen*. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menentukan struktur kimia senyawa metabolit sekunder dari *Lichen Usnea* sp. dan menguji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel *murine leukemia* P388. Isolasi dilakukan dengan teknik kromatografi kolom menggunakan fase diam silika gel 60 dengan eluen campuran *n*-heksana dan etil asetat secara elusi gradien. Senyawa yang diperoleh diidentifikasi menggunakan spektroskopi UV-Vis, IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR. Hasil identifikasi isolat diperoleh senyawa (-)-asam usnat dengan BM 344 g/mol, berbentuk kristal jarum berwarna kuning. Hasil uji sitotoksik senyawa (-)-asam usnat terhadap sel murine leukemia P388 diperoleh nilai IC<sub>50</sub> 5,738 ± 0,61 µg/mL.

**Kata Kunci:** sel *murine leukemia* P388, sitotoksik, *Usnea* sp., *Lichen*.

**Abstract:** Lichen is a symbiotic organism composed by algae and fungi that already known produces specific secondary metabolites having bioactivities. The aim of this study were to isolate and determine the structure of secondary metabolites of Lichen *Usnea* sp. and to examine the cytotoxic activity against murine leukemia P388 cells. Isolation was carried out by utilizing colom chromatography using silica gel 60 stationary phase with eluent mixtures of *n*-hexane and ethyl acetate in a gradient elution. Isolates compounds were identified using UV-Vis spectroscopy, IR, <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR. The identification result obtained was (-)-usnic acid compound with molecular weight (MW) of 344 g/mol, needle-shaped yellow crystals. Test results cytotoxic compound of (-)-usnic acid against murine leukemia P388 cells were derived IC<sub>50</sub> 5.738 ± 0.61 µg/mL.

**Keywords:** Murine leukemia P388 cells, cytotoxic, *Usnea* sp., Lichen.

### PENDAHULUAN

*LICHEN* merupakan tumbuhan suku rendah yang unik, karena dibentuk oleh dua organisme yang berbeda melalui kehidupan bersama yang saling

menguntungkan (simbiosis mutualistik), yaitu antara ganggang dan jamur. Simbiosis mutualistik ini berpotensi menghasilkan sumber senyawaan (metabolit) untuk obat-obatan yang berasal dari alam, atau sebagai bahan baku industri farmasi.

*Lichen* mempunyai kegunaan yang luas dan beberapa diantaranya mempunyai sifat etnofarmakologi. *Lichen* juga telah diketahui sebagai

\* Penulis korespondensi, Hp. 081388327118  
e-mail: maulid06@yahoo.com

organisme sumber senyawa baru, seperti depsida dan depsidone yang masih jarang diteliti aktivitas biologisnya<sup>(1)</sup>. Beberapa penelitian telah dilakukan yang melaporkan berbagai aktivitas biologis *Lichen* yang sangat menarik, misalnya sebagai antibiotik<sup>(2)</sup>, antiproliferatif<sup>(3)</sup>, antioksidan<sup>(4)</sup> dan anti HIV<sup>(5)</sup>.

Umumnya, *Lichen Usnea* sp. mengandung (+) –asam usnat, antara lain: *U. dasyopoga*, *U. aspera*, *U. longissima*, *U. orientalis*, *U. implicita*, *U. aureola*, *U. iacerata*, *U. rubicunda*, *U. pusilla*, *U. eulychniae*, *U. florida*, *U. hirta* dan *U. articulata*. Akan tetapi, *Usnea* sp. yang mengandung (-)-asam usnat masih perlu diteliti lagi karena senyawa ini mengandung aktivitas biologis sebagai anti tumor<sup>(6,7)</sup>.

Selain asam usnat, beberapa peneliti menemukan asam-asam lainnya yang ada dalam *Usnea* sp., misalnya *U. barbata* mengandung asam barbatat, *U. rubicunda* mengandung asam galbinat, asam salizinat dan asam norstiktat. *U. aspera* mengandung asam norstiktat<sup>(8,9)</sup>. Selain itu, di dalam *Usnea* sp. terkadang juga mengandung sterol, asam-asam amino, asam askorbat dan beberapa senyawa kimia yang lain yang baru bisa dibuktikan secara kualitatif<sup>(10)</sup>.

Tujuan utama penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan menentukan struktur kimia dari senyawa yang terkandung dalam *Usnea* sp., tumbuhan asal Sulawesi Tenggara, serta untuk menguji aktivitas sitotoksik senyawa yang diperoleh terhadap sel *murine leukemia* P388. Pengujian sitotoksitas secara *in vitro* dapat digunakan sebagai penapisan awal untuk mendeteksi senyawa-senyawa yang mempunyai potensi sebagai antikanker<sup>(11,12)</sup>. Pengujian secara *in vitro* ini lebih cepat dan murah jika dibandingkan dengan pengujian secara *in vivo*.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** *Lichen Usnea* sp., yang dikumpulkan dari Kecamatan Mowewe, Kabupaten Kolaka, Sulawesi Tenggara, *n*-heksana, etil asetat, diklorometana (DCM), metanol, silika gel 60 Merck 7734, plat KLT, penampak noda CeSO<sub>4</sub>, pasir laut, kapas, etanol 95%, DMSO, medium RPMI 1640, sel *murine leukemia* P-388, *Fetal Bovine Serum* (FBS), pereaksi MTT.

**Alat.** Evaporator vakum putar, kolom kromatografi, lampu UV, polarimeter Jasco P1020, spektrofotometer UV-Vis Shimadzu 310-IPC, FTIR Perkin Elmer RX-1, NMR 500 MHz Bruker, alat-alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium, pipet pasteur, tabung sentrifuga, *micro plate reader*; inkubator CO<sub>2</sub>, alat penguji titik leleh.

**METODE. Preparasi Sampel.** Sampel *Lichen Usnea* sp., dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering, sampel dipotong kecil-kecil dan

selanjutnya disebut sampel kering, kemudian *diblender* hingga didapatkan serbuk 500 g.

**Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Kimia *Lichen Usnea* sp.** Ekstraksi *Lichen Usnea* sp. dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Selanjutnya, pelarut diuapkan dalam evaporator vakum putar, sehingga diperoleh ekstrak metanol. Terhadap ekstrak metanol dilakukan pemeriksaan bercak noda dengan kromatografi lapis tipis (KLT) untuk memperoleh pelarut yang sesuai untuk dipakai dalam kromatografi kolom. Ekstrak metanol kemudian dipisahkan melalui kolom kromatografi (KK) silika gel-60 menggunakan eluen *n*-heksana : etil asetat dengan perbandingan yang berubah secara gradien. Dari proses tersebut diperoleh fraksi-fraksi, dan masing-masing fraksi dianalisis menggunakan KLT untuk melihat kemurnian senyawa yang diperoleh. Senyawa murni yang diperoleh diuji sifat fisiknya, yang meliputi: titik leleh dengan alat pengukur titik leleh, kelarutan, putaran optik dengan polarimeter, bentuk dan warna. Penentuan struktur molekul senyawa kimia dilakukan analisis spektroskopi menggunakan data spektra FTIR, UV-Vis, <sup>1</sup>H-NMR dan <sup>13</sup>C-NMR.

**Pengujian Aktivitas Sitotoksik terhadap Sel *Murine Leukemia* P388.** Pengujian aktivitas sitotoksik terhadap sel *murine leukemia* P388 dilakukan dengan metode MTT<sup>(13,14)</sup>. Sel *murine leukemia* P388 dalam medium RPMI 1640 (dengan konsentrasi > 10<sup>6</sup> sel/mL) dari labu kultur dimasukkan ke dalam tabung sentrifuga 15 mL dan disentrifugasi dengan kecepatan 1200 – 1300 rpm selama 5 menit pada suhu kamar. Supernatan dipisahkan dengan pipet Pasteur steril dan endapan (*pellet* sel) yang tinggal ditambahkan 1 mL FBS dan 100 µL DMSO, dicampur pelan-pelan, kemudian dipindahkan ke dalam tabung 2 mL dan dilekatkan tutupnya dengan parafin. Selanjutnya dilakukan pelarutan sel dan disentrifugasi untuk pemisahan. Selanjutnya dilakukan subkultur bahan pengujian.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

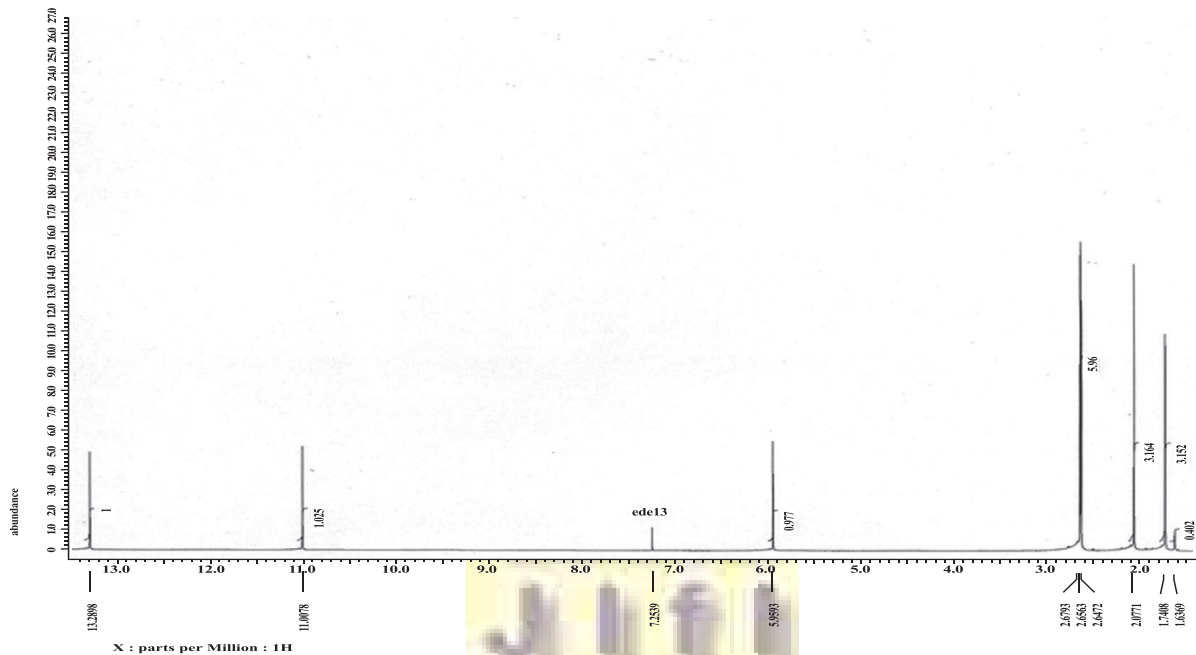
**Isolasi dan Identifikasi Senyawa dari *Lichen Usnea* sp.** Hasil ekstraksi terhadap 500 g serbuk kering *Usnea* sp. diperoleh 32,42 g ekstrak metanol dan hasil pemisahan dengan KK diperoleh fraksi 1-7 dengan eluen campuran *n*-heksana dan etil asetat yang berubah secara gradien. Hasil KK gravitasi ditampung dalam botol 100 mL. Masing-masing fraksi diuapkan, kemudian dilakukan uji noda dengan KLT agar diketahui fraksi yang mempunyai R<sub>f</sub> yang sama untuk kemudian digabungkan. Dari proses ini diperoleh 7 fraksi. Fraksi 2 berbentuk kristal warna kuning.

Setelah direkrystalisasi dan dianalisis sifat fisika dan spektroskopinya, diperoleh informasi bahwa senyawa tersebut (selanjutnya disebut senyawa A) berbentuk kristal jarum berwarna kuning emas, memiliki titik leleh 203-205 °C, rotasi optik spesifik  $[\alpha]_D^{25} = -496$  (kloroform), larut dalam pelarut diklorometana, kloroform dan aseton.

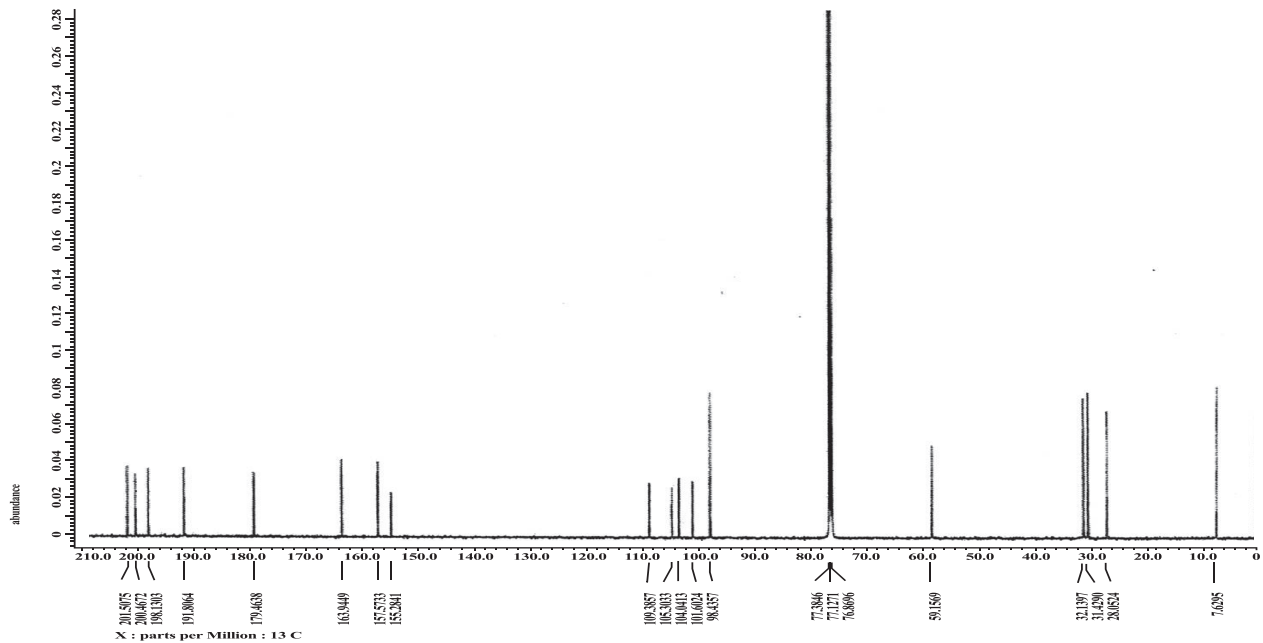
Hasil pengukuran inframerah senyawa A menunjukkan bahwa Senyawa A yang diisolasi mengandung gugus -OH, -C=O, -C=C, -CH, -CH<sub>3</sub>, -C-O-C dan gugus aromatik. Hasil pengukuran senyawa A menggunakan spektroskopi UV pada panjang gelombang antara 200-400 nm, menunjukkan

bahwa senyawa tersebut memberikan serapan maksimum dalam diklorometana pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 281 dan 233 nm. Berdasarkan literatur, senyawa asam usnat memiliki karakteristik berupa serapan maksimum pada  $\lambda$  284 & 234 nm<sup>(15)</sup>.

Hasil pengukuran spektrum <sup>1</sup>H-NMR (Gambar 1) dan <sup>13</sup>C-NMR (Gambar 2 dan Tabel 1) memperkuat dugaan gugus fungsi yang diperoleh dari interpretasi spektrum IR. Spektrum <sup>1</sup>H-NMR (Gambar 1) pada pergeseran kimia (masing-masing *singlet*)  $\delta_H = 1,74$  dan  $2,07$  ppm menunjukkan adanya 2 gugus metil (-CH<sub>3</sub>).  $\delta_H = 2,65$  dan  $2,66$  ppm menunjukkan adanya 2 gugus metil yang terikat pada gugus karboksil.



Gambar 1. Hasil spektrum <sup>1</sup>H-NMR.



Gambar 2. Hasil spektrum <sup>13</sup>C-NMR.



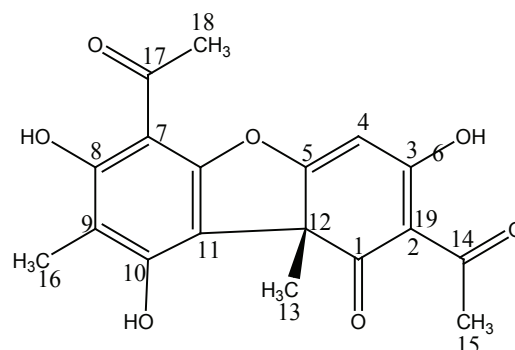
**Tabel 1.** Nilai pergeseran kimia  $^1\text{H-NMR}$  dan  $^{13}\text{C-NMR}$  dari senyawa (-)-asam usnat.

H	NMR	Senyawa (-)-asam usnat	
		$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
	1		198,20
	2		179,47
3-OH	3	11,01	155,33
H-4	4	5,92 (s)	98,46
	5		101,64
	6		191,85
	7		109,41
8-OH	8	13,29 (s)	157,62
	9		104,09
	10		163,99
	11		105,36
	12		59,20
H-13	13	1,74 (s)	28,04
	14		200,17
H-15	15	2,66 (s)	32,28
H-16	16	2,07 (s)	7,68
	17		201,92
H-18	18	2,64 (s)	31,43

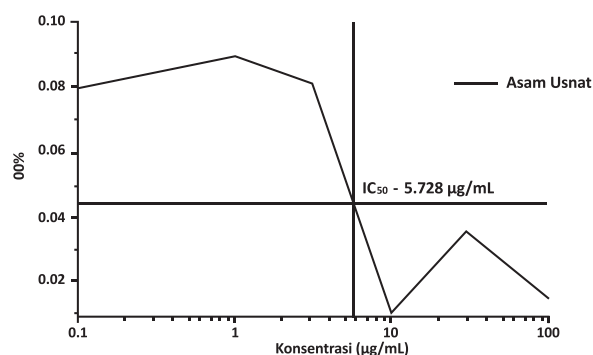
Adanya proton olefinik muncul pada  $\delta_{\text{H}} = 5,96 \text{ ppm}$ . Spektrum pada pergeseran kimia  $\delta_{\text{H}} = 13,29$  dan  $11,01 \text{ ppm}$  menunjukkan adanya 2 gugus hidroksi yang membentuk ikatan hidrogen dengan gugus karbonil. Dari spektrum  $^{13}\text{C-NMR}$  (Gambar 2) memberikan informasi bahwa senyawa A mengandung 18 karbon yang terdiri dari 3 karbon dari gugus karbonil ( $-\text{C}=\text{O}$ ) pada pergeseran  $\delta_{\text{C}} = 198,2$ ;  $200,47$  dan  $201,92 \text{ ppm}$ . Harga pergeseran kimia dari karbonil ini disebabkan gugus karbonil berkonjugasi dengan ikatan rangkap sehingga terjadi resonansi. Hal ini diperkuat dengan adanya pita serapan IR pada bilangan gelombang  $1693 \text{ cm}^{-1}$  yang sedikit menurun dari bilangan gelombang karbonil normal pada  $1715 \text{ cm}^{-1}$ . Dua gugus metil ditunjukkan pada  $\delta_{\text{C}} = 7,68$  dan  $28,04 \text{ ppm}$ . Dua gugus metil yang terikat pada gugus karbonil ditunjukkan pada  $\delta_{\text{C}} = 31,43$  dan  $32,28 \text{ ppm}$ . Gugus metin ( $-\text{CH}$ ) ditunjukkan pada  $\delta_{\text{C}} = 101,64$ ;  $155,33$ ;  $157,62$ ;  $163,99$ ;  $98,46 \text{ ppm}$ . Lima gugus C kuarternar yang lain ditunjukkan pada  $\delta_{\text{C}} = 59,20$ ;  $104,09$ ;  $105,36$ ;  $109,41$  dan  $179,47 \text{ ppm}$ .

Berdasarkan data sifat fisika, data spektrum dan penelusuran pustaka dari senyawa yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa senyawa A memiliki rumus

molekul  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$  dengan berat molekul (BM)  $344 \text{ g/mol}$ . Struktur molekul senyawa (-)-asam usnat ditunjukkan pada Gambar 3. Struktur tersebut sesuai dengan hasil yang telah dilaporkan pada penelitian terdahulu terkait dengan ekstrak aseton dari *Lichen Usnea flexuosa* Tayl<sup>(16)</sup>.

**Gambar 3.** Struktur molekul (-)-asam usnat.

Uji aktivitas sitotoksik senyawa (-)-asam usnat dilakukan terhadap sel *murine leukemia* P388. Pengujian terhadap sel *murine leukemia* P388 mengikuti standard *National Cancer Institute* (NCI), yaitu berdasarkan metode MTT<sup>(13)</sup>. Nilai  $\text{IC}_{50}$  ditentukan melalui persamaan logaritma menggunakan program Origin Pro 8.5.1. Hasil pengukuran aktivitas sitotoksik menunjukkan nilai  $\text{IC}_{50} 5,728 \pm 0,61 \mu\text{g/mL}$  (Gambar 4). Menurut kategori Sahid *et al*, suatu senyawa dinyatakan sangat sitotoksik jika memiliki nilai  $\text{IC}_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$ , aktif jika nilai  $\text{IC}_{50} 5-10 \mu\text{g/mL}$ , sedang jika nilai  $\text{IC}_{50} 11-30 \mu\text{g/mL}$  dan tidak aktif jika nilai  $\text{IC}_{50} > 30 \mu\text{g/mL}$ <sup>(17,18)</sup>. Dengan demikian, senyawa (-)- asam usnat yang diperoleh dari *Lichen Usnea* sp. tersebut dapat dikategorikan aktif sitotoksik terhadap sel *murine leukemia* P388.

**Gambar 4.** Hasil pengukuran sel *murine leukemia* P388.

## SIMPULAN

Berdasarkan data spektrum dan elusidasi senyawa isolat yang diperoleh dari *Lichen Usnea* sp., dapat



disimpulkan bahwa senyawa tersebut memiliki rumus molekul  $C_{18}H_{16}O_7$  dengan BM 344 g/mol. Senyawa tersebut memiliki karakteristik yang sesuai dengan (-)-asam usnat. Hasil uji sitotoksik senyawa (-)-asam usnat terhadap sel *murine leukemia* P388 memberikan nilai  $IC_{50}$   $5,728 \pm 0,61$   $\mu\text{g/mL}$ , yang menunjukkan bahwa senyawa tersebut termasuk kategori aktif sitotoksik.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Ditlitabmas DIKTI-Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi atas pendanaan penelitian.

### DAFTAR PUSTAKA

- Mitrovic T, Stamenkovic S, Cvetkovic V, Nikolic M, Tosic S, Stojicic D. Lichens as source of versatile bioactive compounds. *Biologica Nyssana*. 2011. 2(1):1-6.
- Lauterwein M, Oethinger M, Belsner K, Peters T, Marre R. *In vitro* activities of the Lichen secondary metabolites vulvinic acid, (+)-usnic acid, and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganism. *Antimicrob Agents Chemother* 2013. 39:2541-3.
- Mitrovic T, Stamenkovic S, Cvetkovic V, Tosic S, Stankovic M, Radojevic I, Stefanovic O, Comic L, Dacic D, Curcic M and Markovic S. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five Lichen species. *Int J Mol Sci*. 2011.12:5428-48.
- Brisdelli F, Perilli M, Sellitri D, Piovano M, Garbarino JA, Nicoletti M, Bozzi A, Amicosante G, Celenza G. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified Lichen metabolites: An *in vitro* study. *Phytotherapy Research*. 2012. X:XXX (DOI: 10.1002/ptr.4739).
- Emadi SN, Bhatt SM, M'Imunya JM, Suleh AJ, Raeeskarami SR, Rezai MS, Navaeifar MR. Cutaneous manifestation in children with HIV/AIDS. *J Pediatr Rev*. 2014.2(1):17-28.
- Kato MA, Hegab DS, Sweilam MAER, Gaffar ESAE. Serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  in patients with lichen planus. *Egypt J Dermatol Venereol*. 2014.34:102-6.
- Ismail SB, Kumar SKS, Zain RB. Oral Lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. *Journal of Oral Science*. 2007. 49(2):86-106.
- Emst-Russel MA, Elix JA, Chai CLL, Williams AC, Hamada N, Nash TH. Hybocarpone, a novel cytotoxic naphtazarin derivatives from mycobiont cultures of the Lichen *Lecanora hybocarpa*. *Tetrahedron Lett*. 2009.40:6321-4.
- Karagoz A, Dogruoz N, Zeybek Z, Aslan A. Antibacterial activity of some Lichen extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2009.3(12):1034-9.
- Sinon SH, Rich AM, Firth and Seymour GJ. Qualitative and quantitative assessment of immune cells in Oral Mucosal Lichen Planus (OMLP). *Sains Malaysiana*. 2013.42(1):65-71.
- Rawstron AC, Kennedy B, Evans PA, Davies FE, Richards SJ, Haynes AP, Russell NH, Hale G, Morgan GJ, Jack AS, Hillmen P. Quantitation of minimal disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy. *Blood* 2001. 98:29-35.
- Paudel B, Bhattarai HD, Pandey PD, Hur JS, Hong SG, Kim II-C, Yim JH. Antioxidant, antibacterial activity and brine shrimp toxicity of some mountainous Lichens from Nepal. *Biol Res*. 2012.45:387-91.
- Ernawati T, Anita Y, Lotulung DP, Hanafi M. Synthesis of methyl 2-cinnamamido-3-hydroxy propanoate having activity against P388 leukemia cells. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2014. 4(3):092-5.
- Waud WR, Parker WB, Gilbert KS, Secrist JA. Isolation and characterization of a murine P388 leukemia line resistant to thiarabine. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2012. 31(1):14-27.
- Rankovic B, Kosanic M, Stanojkovic T, Vasiljevic P, Manojlovic N. Biological activities of *Tonimia candida* and *Usnea barbata* together with their norshiclic acid and usnic acid constituents. *Int J Mol Sci*. 2012.13:14707-22.
- Maulidiyah, Cahyana HA, Suwarso WP. A new phenolic compound from acetone extract of Lichen *Usnea flexuosa* Tayl. *Indo J Chem*. 2011.11(3):290-4.
- Sahid A, Pandiangan D, Siahaan P, Ummondor M. Uji sitotoksitas ekstrak metanol daun sisik naga (*Drymoglossum piloselloides* Presl) terhadap sel leukemia P388. *Jurnal MIPA UNSRAT*. 2013. 2(2):94-9.
- Ito C, Itoigawa M, Takakura T, Ruangrunsi N, Enjo F, Tokuda H, Nishino H, Furukawa H. Chemical constituents of *Garcinia fusca*: Structure elucidation of eight new anthones and their cancer chemopreventive activity. *J Nat Prod*. 2003. 66:200-5.