

Isolasi Asam Usnat Sebagai Bahan Baku Farmasi dan Uji Aktivitas Terhadap Sel Kanker Serviks

Hendri Satria Kamal Uyun^{1*}, Panji Marvin Putra², Dwi Dinni Aulia Bakhtra¹, Aried Eriadi¹

¹Departemen Biologi Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi (STIFARM) Padang, Padang, Sumatera Barat, Indonesia

²Tim Penelitian Pengembangan Produk Alam, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi (STIFARM) Padang, Padang, Sumatera Barat, Indonesia

*E-mail: Hendrionguitar@gmail.com

Abstrak

Kanker serviks merupakan kanker terbanyak kedua di dunia setelah kanker payudara dan menyerang sebagian besar wanita, terutama di negara berkembang seperti Indonesia. Pengobatan kanker banyak menimbulkan permasalahan dalam bidang kesehatan karena menimbulkan efek samping. Salah satu tumbuhan yang didapat menjadi sumber bahan baku obat alami adalah kayu angin. Kayu angin (*Usnea* Sp) merupakan tumbuhan yang unik, karena dibentuk oleh dua organisme yang saling bersimbiosis yang saling menguntungkan (simbiosis mutualistik), antara ganggang dan jamur. Komponen bioaktif utama dari kayu angin adalah asam usnat. Dari isolasi asam usnat yang dilakukan dengan metode sokletasi didapatkan rendemen asam usnat 0,648%. Asam Usnat yang diisolasi dari Kayu angin memiliki nilai IC_{50} 794,33 μ g/mL yang tergolong kedalam tidak memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel Hela.

Kata kunci: *Usnea* sp, Asam Usnat, Kanker Serviks

Abstract

Cervical cancer is the second most common cancer in the world after breast cancer and affects most women, especially in developing countries such as Indonesia. Cancer treatment causes many problems in the health sector because it causes side effects. One of the plants obtained as a source of natural medicinal raw materials is wind wood. Wind wood (*Usnea* Sp) is a unique plant, because it is formed by two organisms that are mutually beneficial (mutualistic symbiosis), between algae and fungi. The main bioactive component of (*Usnea* sp) is usnic acid. From the isolation of usnic acid carried out by the sokletation method, the yield of usnic acid was 0.648%. Usnat acid isolated from wind wood (*Uncaria gambir* Roxb) has an IC_{50} value of 794.33 μ g/mL which is classified as having no cytotoxic activity against Hela cells.

Keywords: *Usnea* Sp, Usnic Acid, Cervical cancer

PENDAHULUAN

Kanker adalah penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan sel yang tidak normal dan tidak terkendali serta kemungkinan kerusakan atau penyebaran ke bagian tubuh lain. Salah satu penyakit kanker yang paling mematikan bagi Wanita adalah kanker serviks. Kanker serviks merupakan kanker terbanyak kedua di dunia setelah kanker payudara dan menyerang sebagian besar wanita, terutama di negara berkembang seperti Indonesia. Menurut Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), kanker serviks dimulai di leher. Sel kultur yang digunakan

pada penelitian ini adalah sel HeLa yang merupakan sel epitel manusia yang berasal dari kanker serviks atau kanker leher rahim. Alasan pemilihan sel ini dikarenakan kanker serviks atau kanker leher rahim merupakan salah satu kanker yang paling mematikan bagi wanita (Goodwin & DiMaio, 2000).

Pengobatan kanker banyak menimbulkan permasalahan dalam bidang kesehatan karena menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan seperti rambut rontok, mual, muntah, diare, gangguan tidur, penyakit kulit, penurunan berat badan (Johnsson et al., 2019). serta menimbulkan rasa tidak nyaman selama pengobatan. Selain itu, harga obat

yang digunakan untuk kemoterapi relatif mahal. Pengobatan kanker terdiri dari pembedahan, kemoterapi, terapi hormonal, radioterapi, dan imunoterapi. Pengobatan kanker umumnya masih mengandalkan kemoterapi. Kemoterapi menggunakan bahan kimia sintesis untuk membunuh sel kanker atau membatasi perkembangan dan pertumbuhan sel kanker yang terus tumbuh (Hortobagyi, 2012). Berbagai macam senyawa telah dikembangkan untuk melawan kanker, meliputi senyawa-senyawa pengalkilasi, antimetabolit, obat-obatan radiofarmasi, hormon dan senyawa antagonis, tetapi sampai saat ini belum ada hasil yang memuaskan dan tanpa efek samping yang merugikan dari berbagai jenis antikanker yang telah dikembangkan. Obat antikanker yang efektif seharusnya dapat mematikan sel kanker tanpa membahayakan jaringan yang sehat. Akan tetapi sampai sekarang belum ditemukan obat yang memenuhi kriteria demikian. Selain itu, adanya resistensi dari sel kanker terhadap obat-obatan anti kanker sehingga tidak sensitif lagi terhadap sel kanker. Usaha penelitian terus dilakukan untuk menemukan obat antikanker yang efektif. Salah satunya adalah pencarian senyawa antikanker dari bahan alam yang bersifat spesifik pada sel kanker tertentu dan menghambat protein spesifik yang menyebabkan sel kanker terus berproliferasi tanpa kendali (Gomes et al., 2015). Pemanfaatan produk bahan alam telah menjadi alternatif dan banyak diminati dalam pengobatan kanker. Senyawa yang berasal dari alam memiliki keragaman struktural dan menghasilkan mekanisme aktivitas biologis baru, sehingga diyakini bahwa sumber terbesar senyawa antikanker berasal dari alam (Bakhtra et al., 2023).

Kayu angin (*Usnea* Sp) merupakan tumbuhan yang unik, karena dibentuk oleh dua organisme yang saling bersimbiosis yang saling menguntungkan (simbiosis mutualistik), antara ganggang dan jamur (Brisdelli et al., 2013). Komponen bioaktif

utama dari kayu angin adalah asam usnat (Azis et al., 2014). Asam usnat diperoleh dari kayu angin memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi (Maulidiyah et al., 2023). Aktivitas antioksidan yang tinggi berpotensi sebagai antikanker alami sel kanker, dan potensi yang besar khususnya dalam pengembangan bahan baku obat kanker (Milella et al., 2023).

METODE

Alat dan Bahan

Alat: *Rotary evaporator* (Heidolph made in Germany), *Spectrophotometer* UV, pipet mikro (Eppendorf), oven (Yenaco), furnace (Carbolite Gero), timbangan analitik (Kern), *desiccator* (Dianrui), Biosafety cabinet (Kojair), *microscope inverted* (Zeiss), *incubator* CO₂ (Astec), *hemocytometer* (Assistant Germany), *centrifuge* (Thermo Scientific), *Tissue Culture Flask*, Plat 12, 24, 96 well (TPP Made in Europe/Switzerland), *Microcentrifuge*, Tabung *centrifuge* (Gen Follower).

Bahan: Kayu Angin, Standar Asam Usnat (Sigma Aldrich) Sel Hela Sel HeLa (koleksi laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Jati), N Heksana (PT. Novalindo), etil asetat PA (PT. Brataco), aquadest (PT. Novalindo), Etil Asetat (PT. Novalindo), larutan dimetilsulfoksida (DMSO) (PT. Brataco), *dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) (Gibco), Feta Bovine Serum (FBS) (Biowest), *phosphate-buffered saline* (PBS) (Sigma-Aldrich Chemical Co, USA), *penicillin-streptomycin* (pen strep) (Gibco), *trypan blue* (Solarbio), trypsin EDTA 0,25% (Gibco), alkohol 70%.

Prosedur Kerja

Pengambilan Sampel

Sampel tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kayu angin yang diperoleh dari pasar kota padang sumatera barat sebanyak 10 kg.

Penyiapan sampel

Dalam Penelitian ini kayu angin yang didapat di haluskan terlebih dahulu dengan cara di grinder.

Isolasi Asam Usnat

Sampel yang dihaluskan sebanyak 10 kg. Kemudian dimasukan kedalam kertas saring sebanyak 1 kg, kemudian Bungkus sampel hingga rapat dan ikat dengan benang. Kemudian tiap 1 kg sampel di lakukan sokletasi dengan pelarut N heksana selama 3 x 8 jam. Kemudian lakukan penguapan pelarut dengan rotary evaporator, akan terbentuk asam usnat kasar kemudian lakukan kristalisasi hingga terbentuk kristal asam usnat.

Identifikasi gugus fungsi dengan spektrofotometer FT- IR

Uji dilakukan terhadap sampel yang telah disiapkan dengan metoda cakram KBr, dan dianalisa pada bilangan gelombang antara 400- 4000 cm⁻¹ dengan spektrofotometer FT-IR. Sampel digerus sampai menjadi serbuk dengan KBr, lalu dipindahkan ke cetakan die dan sampel tersebut kemudian dikempa ke dalam suatu cakram pada kondisi hampa udara.

Penetapan kadar Asam Usnat

Buat larutan induk 500 ppm dengan standar baku asam usnat sigma aldrich dengan pelarut asetonitril for HPLC. Lalu dibuat deret standard dengan variasi konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm. Buat larutan uji dengan sampel asam usnat hasil isolasi dengan konsentrasi 25 ppm sebanyak 3 kali pengulangan. Lakukan 3 kali injeksi pada masing masing sampel pengulangan dan deret standar. Pemeriksaan di panjang gelombang maksimum standard baku asam usnat yang didapatkan pada spektrofotometer UV dengan laju alir 1,5 ml/min, eluensi Aseton nitril : Asam Asetat 0,1% 9:1

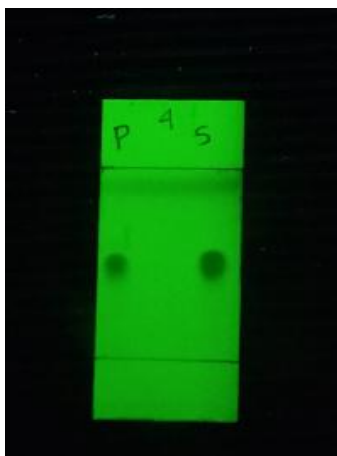
Uji aktivitas sitotoksik MTT assay

Sejumlah 1x10⁴ sel HeLa/sumuran ditumbuhkan dalam 96-well plate, diinkubasi selama 72 jam dalam inkubator CO₂. Sel diberi perlakuan katekin 1000; 800; 400; 200; 100; 50µg/mL, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂. Setelah inkubasi, kondisi sel diamati di bawah mikroskop. Media sel dibuang dan dicuci dengan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) kemudian ditambahkan reagen MTT 0,5 mg/mL sebanyak 100 µL ke setiap sumuran dan inkubasi kembali 4 jam dalam inkubator CO₂. Sel diamati di bawah mikroskop, setelah formazan terlihat jelas maka ditambahkan reagen stopper 100 µL SDS dalam HCl 0,01 N. Plate diinkubasi pada suhu kamar di tempat gelap selama semalam, serapan dibaca dengan microplate reader pada panjang gelombang 600 nm (CCRC, 2009).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel dibeli sebanyak 10 kg dari Pasar Kota Padang, Provinsi Sumatera Barat, selanjutnya dilakukan penghalusan simplisia dan dilakukan ekstraksi dengan metode sokletasi selama 3 kali 8 jam. Kemudian lakukan penguapan pelarut dengan rotary evaporator, akan terbentuk asam usnat kasar kemudian lakukan kristalisasi hingga terbentuk kristal asam usnat. Berat krsital asam usnat yang didapat adalah 64,8 gram dengan rendemen 0,648%.

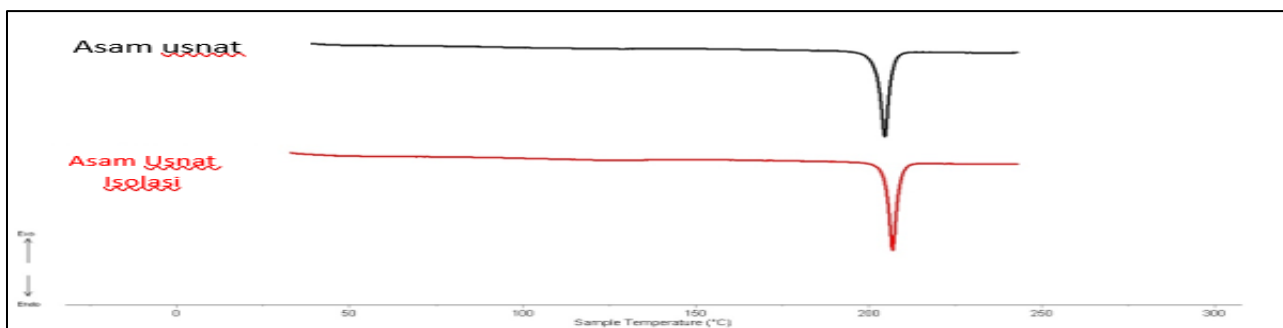
Uji KLT Asam Usnat hasil isolasi menggunakan fase gerak n-hexan : etil asetat (2:3), dimana n-heksan bersifat non polar dan etil asetat bersifat semi polar hal ini bertujuan untuk mengetahui pemisahan noda yang terbentuk berdasarkan tingkat kepolaran senyawa yang tertahan pada fase diam atau justru akan tertarik oleh fase gerak. Dari hasil kromatografi lapis tipis diperoleh 1 bercak noda sampel dengan nilai RF 0,56. Pembanding yang digunakan adalah Asam Usnat.



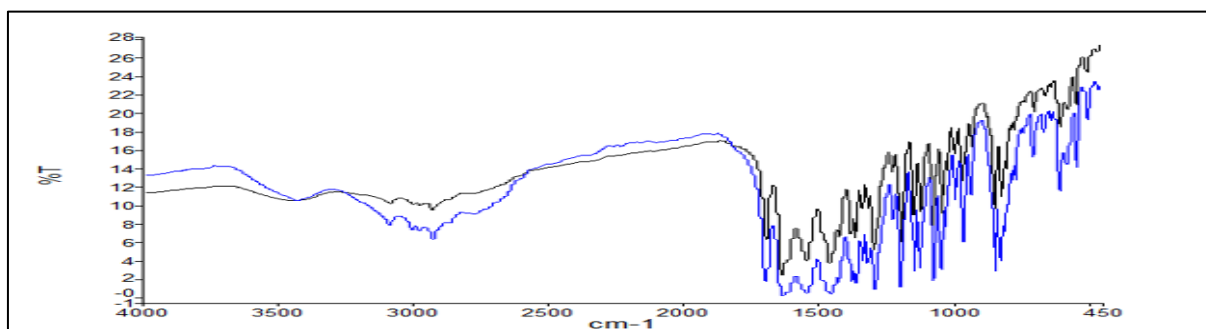
Gambar 1. KLT Asam usnat isolasi dan pembanding

Analisis titik lebur dilakukan pada kristal Asam Usnat dengan menggunakan peralatan DSC (Setaram DSC 131 Evo, Prancis). Sampel sebanyak 5 mg ditempatkan dalam panci aluminium tertutup (crusible) dan perangkat DSC diprogram untuk kisaran suhu 30-300°C dengan laju pemanasan 10°C/menit. Hasil DSC pada Gambar 2 menunjukkan bahwa asam usnat hasil isolasi uji titik lebur didapatkan dalam suhu 206,921°C. Perlakuan yang sama pada asam usnat pembanding dan didapatkan uji titik lebur pada suhu 204,679°C. Hal ini menunjukkan adanya selisih perbedaan titik lebur asam usnat hasil isolasi dengan asam usnat pembanding yaitu sebesar 2,7153 °C.

Hasil Komparasi spektrum FT-IR pada Gambar 3 menunjukkan bahwa uji sampel hasil Isolasi dengan zat standar baku Asam Usnat didapatkan korelasi antara kedua spektrum dengan nilai 0,9974. Spektrum FT-IR yang telah digunakan dengan standar korelasi kriteria 0,99. Berdasarkan hasil isolasi komparasi sampel ini dapat dinyatakan bahwa adanya senyawa Asam Usnat dengan menggunakan uji FT-IR.



Gambar 2. Hasil DSC



Gambar 3. Hasil FT-IR

Penetapan kadar Dengan HPLC didapatkan kadar % konsentrasi sampel. Kemurnian sampel yang didapat adalah 91,80%. Hal ini menunjukkan kadar Asam usnat yang diperoleh memiliki kemurnian ini cukup tinggi.

Efek sitotoksik dari suatu senyawa ditentukan berdasarkan nilai IC₅₀ senyawa tersebut. Data pada Tabel 1 digunakan untuk

$y = -181,88 x + 569,42$ dengan nilai $R^2 = 0,8792$.

Menurut National Cancer Institute (NCI) mengklasifikasikan sitotoksik suatu senyawa sebagai aktivitas sitotoksik tinggi jika $IC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$, aktivitas sitotoksik moderat jika IC_{50} antara $21-200 \mu\text{g/mL}$, aktivitas sitotoksik lemah jika IC_{50} berkisar antara $201-500 \mu\text{g/mL}$, dan tidak ada aktivitas

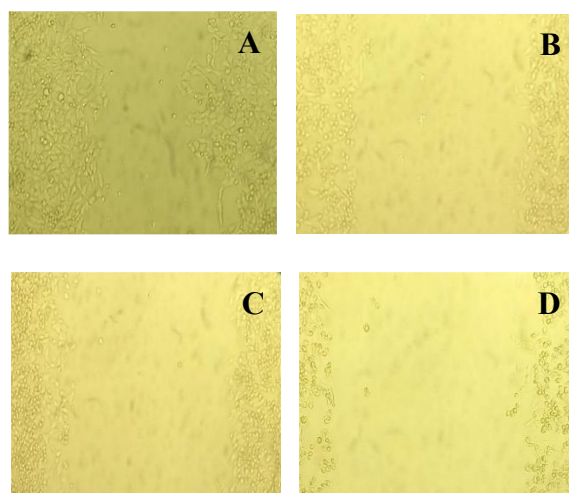
Tabel 1. Nilai Viabilitas sel setelah pemberian Asam Usnat

Konsetrasi Uji	Viabilitas sel (%)
50	236,2
100	206,8
200	163,3
400	158,2
800	10,4
1000	3,4

menghitung kadar yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan 50 persen populasi sel (IC_{50}) dengan metode analisa regresi probit. Persamaan regresi linear didapatkan dengan cara membagi konsentrasi dengan rata-rata persentase sel hidup pada masing-masing senyawa uji. Nilai IC_{50} dapat diperoleh dengan cara memasukkan $y = 50$ persen untuk mencari nilai x , kemudian nilai x dari konsentrasi sampel diantilog untuk mendapatkan nilai IC_{50} . Persamaan regresi linear yang diperoleh pada asam usnat (adalah

sitotoksik jika $IC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ (6). Asam usnat tidak memiliki aktivitas terhadap sel kanker Hela dengan nilai IC_{50} sebesar $794,33 \mu\text{g/mL}$ (Tabel 1). Hal ini Dikarenakan Asam usnat tergolong kedalam BCS kelas 2 yang memiliki permeabilitas tinggi tetapi kelarutan rendah (Noviza et al., 2018).

Pemberian asam usnat dapat menghambat migrasi sel Hela dengan hasil pengukuran menunjukkan bahwa pada konsentrasi $500 \mu\text{g/mL}$, migrasi sel Hela mencapai 194 mm; pada konsentrasi 700



Gambar 4. Luas migrasi sel Hela
(A.Kontrol sel, B.Konsentrasi 500 µg/mL; C.Konsentrasi 700 µg/mL; dan D. Konsentrasi 900 µg/mL)

Tabel 2. Pengaruh Pemberian Asam usnat terhadap induksi kematian sel Hela

Konsentrasi Uji	Viabilitas sel (%)	
	Apoptosis	Nekrosis
500	40	17,5
700	47,72	27,27
900	53	32,65

µg/mL, migrasi sel mencapai 199 mm; dan pada konsentrasi 900 µg/mL, migrasi sel mencapai 205 mm. Sebagai perbandingan, kontrol menunjukkan migrasi sel sejauh 156 mm.

Asam usnat juga dapat menginduksi kematian sel Hela. Berdasarkan Tabel 2 untuk konsentrasi uji 500 µg/mL, terjadi apoptosis sebesar 40% dan nekrosis sebesar 17,5%. Pada konsentrasi 700 µg/mL, apoptosis meningkat menjadi 47,72% dan nekrosis menjadi 27,27%. Pada konsentrasi 900 µg/mL, apoptosis mencapai 53% dan nekrosis 32,65%.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa asam usnat yang diisolasi dari Kayu angin (*Usnea sp.*) memiliki rendemen sebesar 0,68% dengan titik lebur 204 °C dan nilai IC₅₀ sebesar 794,33 µg/mL

yang tergolong tidak bersifat sitotoksik terhadap sel HeLa. Meskipun demikian, asam usnat menunjukkan kemampuan menghambat migrasi sel HeLa serta menginduksi kematian sel melalui mekanisme apoptosis dan nekrosis.

SARAN

Diharapkan untuk dapat melakukan peningkatan kelarutan dari asam usnat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar besarnya Kami mengucapkan terima kasih kepada KEMDIKBUD yang telah memberikan Dana Hibah Penelitian dosen Pemula (PDP) Dengan No Kontrak Induk112/E5/PG.02.00.PL/2024;002/LL10/P G.AK/2024.

DAFTAR RUJUKAN

- Azis, T., Hadijah Sabarwati, S., & Nurdin, M. (2014). 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 Leuke. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 13(1), 40–44.
- Bakhtra, D. D. A., Uyun, H. S. K., Eriadi, A., Fajrina, A., Wiliantari, S., Pranciska, W., & Wandani, J. D. (2023). Pengaruh Pemberian Katekin Terhadap Kultur Sel Kanker Serviks. *Jurnal Farmasi Higea*, 15(2), 163–170.
- Brisdelli, F., Perilli, M., Sellitri, D., Piovano, M., Garbarino, J. A., Nicoletti, M., Bozzi, A., Amicosante, G., & Celenza, G. (2013). Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: An in vitro study. *Phytotherapy Research*, 27(3), 431–437. <https://doi.org/10.1002/ptr.4739>
- CCRC. (2009). Uji Sitotoksik Metode Microculture Tetrazolium Test. *Cancer Chemoprevention Research Center Fakultas Farmasi UGM*, 6–9.
- Gomes, N. G. M., Lefranc, F., Kijjoa, A., & Kiss, R. (2015). Can some marine-derived fungal metabolites become actual anticancer agents? *Marine Drugs*, 13(6), 3950–3991. <https://doi.org/10.3390/md13063950>
- Goodwin, E. C., & DiMaio, D. (2000). Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23), 12513–12518. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.23.12513>
- Hortobagyi, G. N. (2012). Toward Individualized Breast Cancer Therapy: Translating Biological Concepts to the Bedside. *The Oncologist*, 17(4), 577–584. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0032>
- Johnsson, A., Demmelmaier, I., Sjövall, K., Wagner, P., Olsson, H., & Tornberg, Å. B. (2019). A single exercise session improves side-effects of chemotherapy in women with breast cancer: an observational study. *BMC Cancer*, 19(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6310-0>
- Maulidiyah, M., Rachman, F., Mulkiyan, L. O. M. Z., Natsir, M., Nohong, N., Darmawan, A., Salim, L. O. A., & Nurdin, M. (2023). Antioxidant Activity of Usnic Acid Compound from Methanol Extract of Lichen *Usnea* sp. *Journal of Oleo Science*, 72(2), 179–188. <https://doi.org/10.5650/jos.ess22315>
- Milella, R. A., De Rosso, M., Gasparro, M., Gigante, I., Debiase, G., Forleo, L. R., Marsico, A. D., Perniola, R., Tutino, V., Notarnicola, M., Velasco, R., & Flamini, R. (2023). Correlation between antioxidant and anticancer activity and phenolic profile of new Apulian table grape genotypes (V. Vinifera L.). *Frontiers in Plant Science*, 13(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1064023>
- Noviza, D., Fitriani, L., & Fauzi, R. Z. (2018). Dispersi Padat Asam Usnat dengan Teknik Freeze Drying menggunakan Poloxamer 188 sebagai Polimer. *Jurnal Sains Farmasi Dan Klinis*, 5(1), 41–48.