

**PENGARUH SENYAWA ASAM 2-(4-(KLOROMETIL)
BENZOILOKSI)BENZOAT TERHADAP AGREGASI TROMBOSIT
DENGAN METODE PENGUJIAN *IMMUNO-FLOW CYTOMETRY*
DAN UJI WAKTU PERDARAHAN PADA MENCIT**



RISTA AULIA

2443014135

**PROGRAM STUDI S1
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS KATOLIK WIDYA MANDALA SURABAYA
2017**

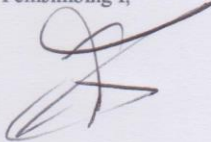
**PENGARUH SENYAWA ASAM 2-(4-(KLOROMETIL)BENZOILOKSI)
BENZOAT TERHADAP AGREGASI TROMBOSIT DENGAN
METODE PENGUJIAN *IMMUNO-FLOW CYTOMETRY* DAN UJI
WAKTU PERDARAHAN PADA MENCIT**

SKRIPSI

**OLEH :
RISTA AULIA
2443014135**

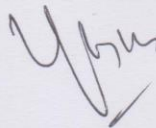
Telah disetujui pada tanggal 13 Desember 2017 dan dinyatakan LULUS

Pembimbing I,



Dr. Endang Retnowati, MS., Sp.PK. (K)
NIK. 241.LB.0075

Pembimbing II,



Yudy Tjahjono, B.Sc., M.Sc. Biol.
NIK. 241.15.0835

Ketua Penguji,



Dra. Siti Surdijati, MS., Apt.
NIK. 241.12.0734

LEMBAR PERSETUJUAN
PUBLIKASI KARYA ILMIAH

Demi perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui skripsi/karya ilmiah saya dengan judul : **PENGARUH SENYAWA ASAM 2-(4-(Klorometil)benzoiloksi) benzoat terhadap agregasi platelet dengan metode pengujian *immuno-flow cytometry* dan uji waktu perdarahan pada mencit** untuk publikasi atau ditampilkan di internet atau media lain yaitu *Digital Library* Perpustakaan Unika Widya Mandala Surabaya untuk kepentingan akademik sebatas sesuai dengan Undang-Undang Hak Cipta.

Demikian pernyataan persetujuan publikasi karya ilmiah ini saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 13 Desember 2017



Rista Aulia
2443014135

Saya menyatakan dengan sesungguhnya bahwa hasil tugas akhir ini
Adalah benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.
Apabila di kemudian hari diketahui bahwa skripsi ini
merupakan hasil plagiarisme, maka saya bersedia
menerima sanksi berupa pembatalan kelulusan
dan atau pencabutan gelar yang saya peroleh.

Surabaya, 13 Desember 2017



Rista Aulia
2443014135

ABSTRAK

PENGARUH SENYAWA ASAM 2-(4-(KLOROMETIL)BENZOILOKSI)BENZOAT TERHADAP AGREGASI TROMBOSIT DENGAN METODE PENGUJIAN *IMMUNO-FLOW CYTOMETRY* DAN UJI WAKTU PERDARAHAN PADA MENCIT

RISTA AULIA

2443014135

Asam asetilsalisilat (AAS) merupakan obat OAINS (Obat Anti Inflamasi Non Steroid) yang menghambat aktivitas pada COX-1 dan COX-2 sebagai antiplatelet dan anti inflamasi. AAS menghambat aktivitas pada COX-1, sehingga pembentukan tromboksan A₂ (TXA₂) dan agregasi trombosit terhambat. AAS bersifat toksik yang menyebabkan tukak lambung dan meningkatkan risiko perdarahan. Penelitian ini bertujuan sebagai acuan mengembangkan senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat sebagai obat baru pengganti senyawa turunan salisilat dengan aktivitas anti agregasi trombosit dan efek samping yang minimal. Pembekuan darah dilakukan uji waktu perdarahan dan agregasi trombosit digunakan uji *immuno-flow cytometry* dengan subjek mencit jantan dengan perlakuan yaitu, kontrol negatif (PGA 3%), kontrol positif (AAS dan PGA 3%), senyawa uji (asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat dan PGA 3%). Kontrol positif dan senyawa uji menggunakan dosis 1,3 mg/20gBB ($7,21 \times 10^{-3}$ M). Perlakuan diberikan secara peroral kemudian dilakukan uji waktu perdarahan dan uji *immuno-flow cytometry* meliputi uji reaktivitas antibodi pada trombosit dan uji anti agregasi trombosit. Uji *immuno-flow cytometry* menggunakan antibodi PE/CY7 anti-murine CD-31 dan antibodi FITC anti-murine CD-31. Pada uji anti agregasi trombosit ditambahkan agonis berupa kolagen. Hasil uji waktu perdarahan diperoleh rata-rata waktu perdarahan pada kontrol negatif (480 ± 104 detik), kontrol positif ($750 \pm 130,7$ detik) dan senyawa uji ($590 \pm 170,5$ detik). Dan didapatkan hasil uji kuantitatif jumlah darah pada kontrol negatif ($0,53 \pm 0,15$ SD/gram), kontrol positif ($1,02 \pm 0,04$ SD/gram) dan senyawa uji ($0,77 \pm 0,08$ SD/gram). Hasil uji *immuno-flow cytometry* diperoleh rata-rata %total (*Upper Right*) kontrol negatif ($4,18 \pm 1,68\%$), kontrol positif ($2,12 \pm 0,88\%$) dan senyawa uji ($2,11 \pm 0,74\%$). Simpulan yang dapat diperoleh pemberian senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat berpotensi sebagai anti trombosit.

Kata Kunci: Asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat, asam asetil salisilat, uji waktu perdarahan, uji *immuno-flow cytometry*, kuantifikasi jumlah darah.

ABSTRACT

EFFECT OF 2-(4-(CHLOROMETHYL)BENZOYLOXY) BENZOIC ACID ON PLATELET AGGREGATION IN MICE USING IMMUNO-FLOW CYTOMETRY TESTING AND BLEEDING TIME TESTING METHODS

RISTA AULIA

2443014135

Acetylsalicylic acid (ASA) is a Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug (NSAID) which inhibits activity in COX-1 and COX-2 as an antiplatelet and anti-inflammatory. ASA inhibits activity on COX-1, thereby formation of thromboxane A₂ (TXA₂) and platelet aggregation is inhibited. ASA also has a side effect of gastric ulcers and increases the risk of bleeding. The aim of this research is to develop a 2-(4-(chloromethyl)benzoyloxy)benzoate acid with anti aggregation platelet activity and minimal side effects. Coagulation of blood was tested for bleeding time and platelet aggregation used immuno-flow cytometry test with male mice as the subjects with treatment, that negative control (PGA 3%), positive control (ASA and PGA 3%), and test substrat (2-(4-(chloromethyl)benzoyloxy)benzoate acid and PGA 3%). Positive control and test substrat using a dose of 1.3 mg/20gBB (7.21×10^{-3} M). The treatment was given orally and then tested for bleeding time and immuno-flow cytometry test included antibody reactivity test on platelet and platelet anti-agregation test. Immuno-flow cytometry test used CD-31 anti-murine PE/CY₇ antibody and CD-31 anti-murine FITC antibody. Platelet anti-agregation test used collagen agonist. Bleeding time result obtained mean time at negative control (480 ± 104 second), positive control ($750 \pm 130,7$ second), and test compound (590 ± 170.5 second). The result of quantitative test of blood count on negative control (0.53 ± 0.15 SD/gram), positive control (1.02 ± 0.04 SD/gram), and test compound (0.77 ± 0.08 SD/gram). Immuno-flow cytometry test result obtained the average %total (*Upper Right*) negative control ($4.18 \pm 1.68\%$), positive control ($2.12\% \pm 0.88\%$) and test substrat ($2.11 \pm 0.74\%$). These result indicates that 2-(4-(chloromethyl)benzoyloxy)benzoate acid substrat is a potential as an anti platelet.

Keywords: 2-(4-(chloromethyl)benzoyloxy)benzoate acid, acetylsalicylic acid, bleeding time, immuno-flow cytometry, quantification of blood count.

KATA PENGANTAR

Rasa syukur saya ucapkan kepada Allah SWT karena atas rahmat dan ridho-Nya, sehingga skripsi dengan judul **“Pengaruh Senyawa Asam 2-(4-(Klorometil) Benzoiloksi) Benzoat terhadap Agregasi Trombosit dengan Metode Pengujian *Immuno-Flow Cytometry* dan Uji Waktu Perdarahan pada Mencit”** sebagai prasyarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya dapat terselesaikan tepat pada waktunya.

Keberhasilan dalam penyelesaian skripsi ini tidak terlepas dari dukungan, bantuan serta doa dari banyak pihak. Oleh karena itu disampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. dr. Endang Retnowati, MS., Sp.PK(K) selaku pembimbing I dan Yudy Tjahjono, B.Sc., M.Sc.Biol selaku pembimbing II yang telah meluangkan banyak waktu, pikiran dan tenaganya untuk membimbing, mengarahkan dan memotivasi penulis dalam penyelesaian skripsi ini. Catherina Caroline, M.Si., Apt. selaku pimpinan proyek yang telah memberikan nasehat dan dukungan dalam melaksanakan penelitian ini.
2. Dra. Siti Surdijati, MS., Apt selaku penguji I dan Dr. Drh. Hevi Wihadmadyatami, M.Sc selaku penguji II yang telah memberikan kritik dan saran yang berguna untuk menyempurnakan penyusunan skripsi ini.
3. Drs. Kuncoro Foe, G.Dip.Se., Ph.D. selaku Rektor Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.
4. Sumi Wijaya, S.Si., Ph.D., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya dan

Penasehat Akademik.

5. Dr. Lanny Hartanti, S.Si., M.Si selaku Ketua Prodi Studi S1 Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.
6. Seluruh Bapak dan Ibu dosen Fakultas Farmasi yang sudah memberikan banyak sekali ilmu pengetahuan.
7. Kapala Instalasi Patologi Klinik RSUD dr Soetomo Surabaya, Laboratorium Penelitian, Laboratorium Kimia Organik, Laboratorium Hewan, Laboratorium Diagnostik Klinik, Laboratorium Farmakologi yang telah memberikan izin menggunakan fasilitas untuk melakukan penelitian.
8. Para petugas laboratorium, yaitu Ibu Nita, Bapak Dwi, Bapak Rendy, Bapak Anang, Bapak Heri yang telah membantu dalam memfasilitasi alat beserta bahan selama proses penelitian.
9. Ibu (Yeti Prabandari), kakak (Fadilla Delima Sandi), adik (Agung Sarjito Putera dan Rynna Melati) yang telah memberikan semangat yang luar biasa dan kasih sayangnya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi tepat waktu.
10. Teman-teman proyek sintesis farmakologi (Tya, Alfian, Mega, Ola, Elmy) yang telah berjuang bersama dan saling memberikan semangat dalam menyelesaikan proyek ini hingga selesai.
11. Teman-teman Go-Tit (Titta, Umik, Mega, Fitri, Yuyung, Secilia, Hanistya, Cintya) yang selalu memberikan dukungan dan keceriaan dalam keberhasilan penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Menyadari sepenuhnya bahwa skripsi oleh penulis ini masih jauh dari sempurna karena keterbatasan pengalaman, waktu, tenaga dan pengetahuan penulis.

Surabaya, 13 Desember 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK.....	i
<i>ABSTRACT</i>	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Hipotesa Penelitian.....	6
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Asam Asetilsalisilat (AAS)	7
2.2 Asam 2-(4-(Klorometil)Benzoiloksi)Benzoat	11
2.3 `Trombosit.....	15
2.4 Aktivasi Platelet <i>In Vivo</i>	16
2.5 Aktivasi Platelet <i>In Vitro</i>	18
2.6 Flow Cytometer.....	19
2.7 Uji Waktu Perdarahan	22
2.8 Antibodi anti CD-31.....	23
BAB 3 METODE PENELITIAN	25

	Halaman
3.1 Jenis Penelitian.....	25
3.2 Bahan, Alat dan Hewan Coba Penelitian	25
3.3 Metode Penelitian.....	31
3.4 Analisis Statistik.....	44
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	45
4.1 Hasil Penelitian	45
4.2 Pembahasan.....	55
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	62
5.1 Kesimpulan	62
5.2 Saran.....	62
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN	72

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Mekanisme Kerja “OAINS” pada Biosintesis Prostaglandin	8
2.2. Mekanisme Kerja AAS.....	10
2.3. Struktur Asam 2-(4-(Klorometil)Benzoiloksi)Benzoat	11
2.4. Struktur Trombosit	16
2.5. Interaksi Reseptor-Ligan dalam Agregasi Trombosit InVivo	18
2.6. Mekanisme Agregasi Trombosit dengan Agonis Kolagen secara Invitro	18
2.7. Prinsip <i>Flow Cytometry</i>	21
2.8. Uji Agregasi Trombosit	22
2.9. Senyawa Marker Antibodi CD-31	24
3.1. Skema Rancangan Penelitian	31
3.2. Pola Waktu Perdarahan	34
3.3. Skema Uji Waktu Perdarahan.....	36
3.4. Prosedur Kerja Isolasi Darah pada Mencit dan Pembuatan PRP.....	38
3.5. Pembuatan Larutan Stok Antibodi	40
3.6. Uji Reaktivitas Antibodi terhadap Trombosit.....	41
3.7. Uji Antiagregasi	43
4.1. Pengamatan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	48
4.2. Pola Darah Hasil Uji Waktu Perdarahan	49
4.3. Uji Waktu Perdarahan	50
4.4. Uji Kuantifikasi Jumlah Darah	51
4.5. Area <i>Gating</i> pada Populasi Trombosit	52
4.6. Uji Reaktivitas Antibodi pada Trombosit dengan <i>Flow Cytometry</i>	53

Gambar	Halaman
4.7. Uji Anti Agregasi Trombosit.....	54
4.8. Uji <i>Immuno-flow Cytometry</i>	55

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1. Bahan Penelitian yang Digunakan.....	25
3.2. Alat Penelitian yang Digunakan	27
3.3. Parameter Uji Waktu Perdarahan	35
4.1. Pemeriksaan Organoleptis	45
4.2. Titik Leleh Senyawa Asam 2-(4-(Klorometil)Benzoiloksi)Benzoat	46
4.3. Uji Kromatografi Lapis Tipis Senyawa Asam 2-(4-(Klorometil) benzoiloksi)Benzoat	47

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil Uji <i>Immuno-Flow Cytometry</i>	74
2. Hasil Uji Perdarahan.....	77
3. Parameter Hasil Uji Waktu Perdarahan	79
4. Tabel Hasil Uji <i>Immuno-Flow Cytometry</i>	80
5. Tabel Analisis Statistik Uji Waktu Perdarahan	81
6. Tabel Analisis Statistik Uji Kuantifikasi Jumlah darah	82
7. Tabel Analisis Statistik Uji <i>Immuno-Flow Cytometry</i>	83

DAFTAR SINGKATAN

AA	= Arachidonic acid
AC	= Enzim adenilen siklase reseptor platina TXA ₂
ADP	= Adenosin difosfat
AAS	= Asam Asetilsalisilat
CD-31	= Cluster of differentiation-31
COX	= Cyclooxygenase
DTS	= Dense tubular system
ED50	= Effective dose 50
FITC	= Fluorescence isothiocyanat
FSC	= Forward scatter
KLT	= Kromatografi lapis tipis
LD50	= Lethal dose 50
Mit	= <i>Mitochondria</i>
MTC	= Mikrotubular coil
OAINS	= Obat anti inflamasi non steroid
OCS	= Open canalicular system
PECAM-1	= Trombosit endothelial cell adhesion molecul
PGD2	= Prostaglandin D2
PGE2	= Prostaglandin E2
PGF2 α	= Prostaglandin F2 α
PGH2	= Prostaglandin H2
PGI2	= Prostasiklin
PPP	= Trombosit poor plasma
PRP	= Trombosit rich plasma
Rf	= Retardation factor

SD	= Standart deviasi
SSC	= Side scatter
TP	= Reseptor platinum PGI ₂ (reseptor IP)
TXA ₂	= Tromboksan A ₂
VSMCs	= Vascular smooth muscle cells
α -G	= α -granules
δ -G	= δ -granules atau <i>dense bodies</i>
PE/CY-7	= <i>Phycoerythrin/Cyanine 7</i>