

**PENGARUH SENYAWA
ASAM 2-(3-(KLOROMETIL)BENZOILOKSI)BENZOAT
TERHADAP AGREGASI TROMBOSIT DENGAN
METODE PENGUJIAN *FLOW CYTOMETRY* DAN UJI WAKTU
PERDARAHAN PADA MENCIT**



ALFIAN RIZKY PUTRA

2443014269

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

2017

**PENGARUH SENYAWA ASAM 2-(3-
(KLOROMETIL)BENZOILOKSI)BENZOAT
TERHADAP AGREGASI TROMBOSIT DENGAN METODE
PENGUJIAN *FLOW CYTOMETRY* DAN UJI WAKTU
PERDARAHAN PADA MENCIT**

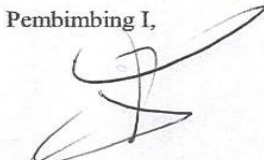
SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi sebagian persyaratan
Memperoleh gelar sarjana Farmasi Program Studi Strata I
di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya

OLEH :
ALFIAN RIZKY PUTRA
2443014269

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

Mengeahui,
Ketua Penguji



Dra. Siti Sardijati, 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-(3-(Klorometil)Benzoiloksi)Benzoat Terhadap Agregasi Trombosit Dengan Metode Pengujian *Flow Cytometry* Dan Uji Waktu Perdarahan Pada Mencit** untuk dipublikasikan 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, Desember 2017



Alfian Rizky Putra
2443014269

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, Desember 2017



ABSTRAK

PENGARUH SENYAWA ASAM 2-(3-(Klorometil)benzoiloksi)benzoat TERHADAP AGREGASI TROMBOSIT DENGAN METODE PENGUJIAN *FLOW CYTOMETRY* DAN UJI WAKTU PERDARAHAN PADA MENCIT

ALFIAN RIZKY PUTRA
2443014269

Asam asetilsalisilat (AAS) merupakan obat anti inflamasi, analgesik, dan antipiretik, selain itu juga dapat digunakan sebagai anti trombosit dengan mekanisme mengurangi produksi tromboksan A₂ (TXA₂). Selain manfaat tersebut, asam asetilsalisilat juga memiliki efek samping berupa tukak lambung dan memiliki nilai toksisitas yang tinggi. Tahun 2009 dikembangkan senyawa baru turunan asam asetilsalisilat yaitu senyawa asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat. Senyawa ini di prediksi memiliki aktivitas agregasi trombosit, oleh sebab itu diperlukan pemeriksaan lebih lanjut untuk melihat adanya aktivitas agregasi trombosit dengan metode uji waktu perdarahan, kuantifikasi jumlah darah dan *flow cytometry* menggunakan mencit dengan tiga kelompok uji (replikasi tiga kali) yaitu kontrol negatif dengan pemberian PGA 3%, kontrol positif dengan pemberian asam asetilsalisilat konsentrasi $7,21 \times 10^{-3}$ M (1,3 mg/20gBB) + PGA 3%, dan senyawa uji asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat konsentrasi $7,21 \times 10^{-3}$ M (1,3 mg/20gBB) + PGA 3%. Waktu perdarahan dan kuantifikasi jumlah darah disimpulkan senyawa uji memiliki hasil yang signifikan jika dibandingkan dengan kontrol negatif dengan p value 0,008 dan 0,003 ($\leq 0,01$). Waktu perdarahan diperoleh rata-rata perdarahan 480 detik (kontrol negatif), 750 detik (kontrol positif), dan 860 detik (senyawa uji). Kuantifikasi jumlah darah diperoleh rata-rata senyawa uji ($1,34 \pm 0,26$) dibandingkan kontrol negatif ($0,53 \pm 0,16$). Uji *flow cytometry* kontrol positif diperoleh rata-rata %total (*Upper Right*) ($4,18 \pm 1,68\%$), kontrol negatif ($2,12 \pm 0,88\%$), dan senyawa uji ($2,11 \pm 0,74\%$). Simpulan yang diperoleh pemberian senyawa asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat berpotensi sebagai anti agregasi trombosit pengganti AAS.

Kata kunci : Asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat, asam asetilsalisilat, waktu perdarahan, kuantifikasi jumlah darah, *flow cytometry*.

KATA PENGANTAR

Rasa syukur saya ucapkan kepada Allah SWT karena atas rahmat dan ridho-Nya, sehingga skripsi dengan judul **“Pengaruh Senyawa Asam 2-(3-(Klorometil)Benzoiloksi) Benzoat Terhadap Agregasi Trombosit Dengan Metode Pengujian 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 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.

5. Dr. Lany Hartanti, S.Si., M.Si. selaku Ketua Prodi Studi S1 Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.
6. Dra. Hj. Emi Sukarti, MS., Apt. selaku pembimbing akademik.
7. Seluruh Bapak dan Ibu dosen Fakultas Farmasi yang sudah memberikan banyak sekali ilmu pengetahuan.
8. 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.
9. 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.
10. Bapak Nur Samsi dan ibu Sherly Tani yang telah memberikan semangat yang luar biasa dan kasih sayangnya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik.
11. Teman-teman proyek sintesis farmakologi (Tya, Rista, Mega, Febrina, Elmy) yang telah berjuang bersama dan saling memberikan semangat dalam menyelesaikan proyek ini hingga selesai.
12. Teman-teman Goyang Dumang (Orientvisti, Yuda, Yusufi, Rozak, Luckyto, Dedik Genji, Rizal, Arinda, Riris, Pipit, Pramita, dan Vivi) yang selalu memberikan dukungan dan keceriaan dalam keberhasilan penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

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

Surabaya, Desember 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK.....	i
<i>ABSTRACT</i>	ii
KATA PENGANTAR.. ..	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR SKEMA	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR SINGKATAN	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Hipotesis Penelitian	6
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Asam Asetilsalisilat (AAS).....	7
2.2 Asam 2-(3-(Klorometil)Benzoiloksi)Benzoat	11
2.3 Uji Kemurnian Hasil Sintesis	13
2.3.1 Uji Organoleptis	13
2.3.2 Uji Titik Leleh.....	14
2.3.3 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	14

	Halaman
2.4 Hewan Uji	14
2.5 Metode Pemeriksaan	15
2.5.1 Uji Waktu Perdarahan	16
2.5.2 Metode <i>flow cytometry</i>	16
2.5.2.1 Fluorokrom	16
2.5.2.2 Visualisasi Hasil Analisis	17
2.6 Trombosit	18
2.6.1 Morfologi Trombosit	18
2.6.2 Fungsi Trombosit	20
2.6.3 Aktivasi Secara In Vivo	21
2.6.4 Mekanisme agregasi trombosit secara in vitro	23
2.7 Anti Trombosit	24
2.8 Senyawa Marker Antibodi CD-31	29
BAB 3 METODE PENELITIAN	31
3.1 Jenis Penelitian	31
3.2 Bahan, Alat dan Hewan Coba Penelitian	31
3.2.1. Bahan Penelitian	31
3.2.2. Alat Penelitian	33
3.2.3. Hewan Coba	34
3.3 Metode Penelitian	35
3.3.1 Rancangan Penelitian	35
3.3.2. Kerangka Konsep Penelitian	36
3.4 Tahapan Penelitian	37

3.4.1 Sintesis Senyawa 3KM.....	37
3.4.2 Uji Kemurnian Senyawa 3KM	37
3.4.3 Perlakuan pada hewan uji	38
3.5 Prosedur uji waktu perdarahan pada hewan coba	39
3.6 Prosedur kerja <i>flow cytometry</i>	43
3.7 Variabel Penelitian.....	53
3.8 Analisa Statistik	53
3.9 Hipotesis Statistik	54
3.9.1 <i>Hipotesis Nol (H₀)</i>	54
3.9.2 <i>Hipotesis Alternatif (H_A)</i>	54
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	55
4.1 Hasil Penelitian.....	55
4.1.1. Hasil Sintesis	55
4.1.1.1. Organoleptis.....	55
4.1.1.2. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	55
4.1.1.3. Titik Leleh.....	57
4.1.2. Uji Waktu Perdarahan.....	58
4.1.3. Uji Kuantifikasi Jumlah Darah	60
4.1.4. Uji <i>flow cytometry</i>	61
4.1.4.1 Gating Pada Trombosit	61
4.1.4.2 Uji Reaktivitas	63
4.1.4.3 Uji Agregasi Trombosit	64
4.2 Pembahasan	67

	Halaman
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	72
5.1 Kesimpulan.....	72
5.2 Saran.....	72
DAFTAR PUSTAKA.....	73
LAMPIRAN	80

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur Yang Menggambarkan Molekul Asam Asetilsalisilat	7
2.2 Mekanisme Kerja OAINS.....	8
2.3 Struktur Asam 2-(3-(Klorometil)Benzoiloksi)Benzoat.....	11
2.4 Mekanisme Kerja FACS.....	18
2.5 Struktur Trombosit.....	20
2.6 Mekanisme Agregasi Trombosit Secara <i>In Vivo</i>	22
2.7 Mekanisme Agrpasi Trombosit Dengan Agonis Kolagen Secara <i>In Vitro</i>	24
2.8 Mekanisme Kerja AAS Pada Trombosit.....	26
2.9 Ilustrasi Agregasi Trombosit Pada <i>Flow Cytometry (In Vitro)</i>	30
3.1 Skema Kerja Penelitian.....	35
3.2 Skema Kerangka Konsep Penelitian.....	36
3.3 Proses Pemberian Senyawa Secara Per Oral Dengan Sonde	41
3.4 Pola Uji Waktu Perdarahan	42
3.5 Skema Kerja Uji Waktu Perdarahan Pada Mencit	42
3.6 Proses Pemberian Senyawa Secara Per Oral Dengan Sonde	45
3.7 Skema Kerja Pembuatan Larutan Stok Antibodi	48
3.8 Skema Kerja Uji Reaktivitas Antibodi Pada Trombosit	50
3.9 Ilustrasi Hasil Uji Reaktivitas Antibodi.....	51
3.10 Skema Kerja Uji Antiagregasi Pada Trombosit	53
4.1. Pengamatan KLT	57
4.2. Waktu Perdarahan Pada Ujung Ekor Mencit	59

Gambar	Halaman
4.3. Analisis Statistik Uji Waktu Perdarahan.....	60
4.4. Analisis Statistik Uji Jumlah Darah.....	61
4.5. Area <i>Gating</i> Pada Populasi Trombosit	63
4.6. Uji Reaktivitas Antibodi Pada Trombosit	64
4.7. Uji Anti Agregasi Trombosit	65
4.8 Analisis Statistik Uji <i>Flow Cytometry</i>	66

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Daftar fluorokrom yang umum digunakan.....	17
3.1. Bahan Penelitian yang Digunakan	31
3.2. Alat Penelitian yang Digunakan	33
3.3. Daftar Perlakuan Hewan Coba.....	39
4.1. Pemeriksaan Organoleptis	55
4.2. Uji KLT Senyawa Asam 2-(3-Klorometilbenzoiloksi)Benzoat.....	56
4.3. Titik Leleh Senyawa Asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat.....	58

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
A. Hasil Uji Waktu Perdarahan.....	80
B. Hasil Histogram Uji Waktu Perdarahan.....	82
C. Hasil Uji <i>Flow Cytometry</i>	84
D. Rangkuman Hasil Uji Waktu Perdarahan	87
E. Rangkuman Hasil Uji <i>Flow Cytometry</i>	88
F. Hasil Analisis Statistik Uji Waktu Perdarahan dan <i>Flow Cytometry</i> ..	89

Daftar singkatan (*Acronyms*)

AAS	Asam asetilsalisilat
PG	Prostaglandin
COX	Siklooksigenase
TXA2	Tromboksan A2
OAINS	Obat antiinflamasi non steroid
ED50	<i>Effective Dose 50% of Respons</i>
TAT	<i>Thrombocyte Aggregation Test</i>
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
PE/CY7	<i>Phycoerythrin/Cyanine 7</i>
PECAM-1	<i>platelet-endothelial cell adhesion molecule-1</i>
CD-31	Cluster Diferensiasi – 31
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
RSUD	Rumah Sakit Umum Daerah
LD50	<i>Lethal Dose 50% of Respons</i>
PGH2	Prostaglandin H2
PGE2	Prostaglandin E2
PGI2	Prostasiklin
PGD2	Prostaglandin D2
PGF2α	Prostaglandin F2 α
AC	Adenilen siklase
ADP	Adenosin difosfat
Rf	Faktor retardasi
DTS	Sistem tubulat padat
ATP	Adenosina trifosfat
vWF	<i>von Willebrand Factor</i>

GP	Glikoprotein
FSC	<i>Forward Scatter</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
PRP	<i>Platelet Rich Plasma</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
PGA	<i>Pulvis Gummi Arabicum</i>
3KM	Asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat