

# **BAB 1**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Asam asetilsalisilat (AAS) merupakan turunan dari asam salisilat yang ditemukan dari ekstraksi kulit pohon Willow Bark (Miller *et al.*, 1978). Asam asetilsalisilat dihasilkan dari reaksi asam 2-hidroksi benzoat dengan anhidrida asetat yang menghasilkan AAS dan asam asetat yang disebut dengan reaksi anhidrida asam (Forsythe, 1991). AAS menghambat aktivitas dua jenis COX yaitu COX-1 dan COX-2. COX-1 merupakan isoform yang diekspresikan tanpa induksi (konstitutif), sedangkan COX-2 merupakan isoform yang diekspresikan dengan adanya induksi seperti rangsangan inflamasi, hormon, dan faktor pertumbuhan (Ricciotti and FitzGerald, 2011). Ekspresi COX-1 mayoritas terletak pada lambung dan COX-2 terletak pada ginjal dan otak. Penghambatan pada COX-1 dapat menyebabkan penghambatan agregasi trombosit, dan menyebabkan iritasi pada lapisan lambung dan fungsi ginjal. Inhibisi COX-2 bertindak sebagai anti inflamasi, antipiretik dan analgesik (Vane, 2003).

Pada tahun 2003 Vane menjelaskan mekanisme kerja AAS sebagai obat anti inflamasi non steroid (OAINS), analgesik dan antipiretik. Vane membuktikan bahwa AAS sebagai obat anti inflamasi non steroid (OAINS) menghambat aktivitas enzim siklooksigenase (COX) yang mengarah pada pembentukan prostaglandin (PG) yang menyebabkan radang, rasa nyeri dan demam (Vane, 2003). Sedangkan, AAS bertindak sebagai anti agregasi trombosit dikarenakan terjadi penghambatan fungsi trombosit oleh asetilasi dari COX pada asam amino yaitu serine 530. Hal ini menyebabkan substrat asam arakidonat menuju enzim katalis yaitu tyrosine385 dan pembentukan

tromboksen terhambat. Oleh karena itu AAS dapat digunakan sebagai agen anti agregasi trombosit untuk pencegahan trombotosis arteri (terbentuknya gumpalan darah pada pembuluh darah) (Schorr, 1997). Menurut penelitian Sils *et al.* (1988) pengujian AAS secara *in vitro* dengan konsentrasi 50 µg/mL (277 µmol/L) merupakan konsentrasi yang memberikan efek anti agregasi secara optimal, sehingga menjadi acuan konsentrasi pengujian pada penelitian ini.

Berdasarkan penelitian Alberts *et al.* (2004) dosis AAS  $\leq 162$  mg/KgBB dan  $\geq 325$  mg/KgBB juga menunjukkan adanya efek anti agregasi trombosit pada pasien yang mengalami penyakit *cerebrovascular*. Namun, pada penggunaan AAS akan memberikan efek samping yaitu gangguan pencernaan, terutama iritasi lambung dan duodenum dikarenakan adanya penghambatan sintesa prostaglandin, dimana prostaglandin merupakan substansi sitoprotektif yang sangat penting bagi mukosa lambung, selain itu akan terjadi difusi balik HCl masuk ke dalam mukosa dan menimbulkan kerusakan, sehingga akan terjadi anemia sekunder karena pendarahan saluran cerna (Price and Wilson, 1982). Selain itu efek penghambatan prostaglandin (PGE<sub>2</sub>) di ginjal mempengaruhi gangguan keseimbangan cairan yang mengakibatkan aliran darah ginjal dan kecepatan filtrasi glomerulus menurun bahkan dapat pula terjadi gagal ginjal akut (Cedric and Alan, 1992).

Untuk pengertian dari trombosit atau platelet merupakan salah satu komponen di dalam darah yang memiliki peranan penting dalam hemostatis. Bilamana terjadi luka pada pembuluh darah, trombosit akan menempel pada luka tersebut membentuk agregat atau membentuk gumpalan yang disebut dengan trombus (Rand *et al.*, 2003). Agregasi trombosit memegang peranan penting dalam patogenesis trombotosis akut pada penyakit jantung koroner stroke, dan penyakit arteri perifer (Jagroop *et al.*, 2007; O'Donnell *et al.*, 2001).

Berdasarkan penjelasan efek samping karena penggunaan AAS, maka perlu dilakukan pengembangan senyawa baru dari AAS yang memiliki indikasi sebagai anti agregasi trombosit yaitu asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat merupakan modifikasi struktur asam salisilat dengan gugus asam 3-klorobenzoil klorida melalui sintesis dengan reaksi *schotten-boumann*. Pada penelitian sebelumnya senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat telah di uji aktivitas analgesik pada mencit, diperoleh harga *Effective Dose 50% of Respons* ( $ED_{50}$ ) sebesar 20,09 mg/kgBB, sedangkan harga  $ED_{50}$  dari asam asetilsalisilat adalah 34,89 mg/kgBB, sehingga dapat disimpulkan bahwa aktivitas analgesik dari asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat lebih tinggi dibandingkan dengan asam asetilsalisilat (Novitasari, 2007). Pengujian toksisitas subkronis pada senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat tidak memberikan pengaruh terhadap perubahan organ tikus wistar jantan (Sinaga, 2016). Sehingga, senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat dilanjutkan dengan metode pengujian agregasi trombosit seperti yang dijelaskan pada alinea berikut ini.

Pengujian agregasi trombosit bertujuan mendeteksi abnormalitas fungsi trombosit (Jagroop *et al.*, 2007). Pemeriksaan dapat dilakukan dengan berbagai cara seperti uji waktu perdarahan (*bleeding time*), *immuno-flow cytometry* dan *Thrombocyte Aggregation Test*. *Thrombocyte Aggregation Test* (TAT) merupakan metode yang dikenal sejak tahun 1962 oleh Born dan metode TAT paling sering digunakan di laboratorium klinik untuk pemeriksaan agregasi trombosit seperti pada gangguan fungsi trombosit: Glanzmann thrombasthenia, Bernard-Soulier Syndrome. Pada uji agregasi trombosit menggunakan metode TAT memerlukan sampel dengan volume yang sesuai dengan standart pemeriksaan (De Cuyper *et al.*, 2013). Uji TAT merupakan pengujian agregasi trombosit secara *in vitro* menggunakan alat uji spektrofotometri seperti *Aggregation Remote*

*Analyzer Module* (Helena Laboratories, Beaumont Texas, USA). Uji TAT merupakan suatu analisa agregasi trombosit menggunakan metode serapan optik melalui suspensi sampel PRP (*platelet rich plasma*) yang diletakkan diantara sumber sinar dan detektor. Sehingga, transmisi cahaya dari sampel akan diteruskan menuju detektor dan memberikan interpretasi data berupa kurva grafik yang meningkat (Pusch, 2008). Pengujian agregasi trombosit dapat dipengaruhi oleh jenis dan konsentrasi agonis yang digunakan akan memberikan pengaruh pada bentuk kurva. Bentuk kurva menggambarkan perubahan intensitas transmisi cahaya pada sampel. Kurva tersebut akan memberikan interpretasi data mengenai %agregasi maksimal, *lag phase*, kurva *slope* agregasi dan *tmax* (Cattaneo *et al.*, 2013). Agregasi trombosit dapat diinduksi oleh sejumlah agonis yang sering digunakan dalam pengujian seperti adenosin difosfat (ADP) dan kolagen, yang nantinya akan mempengaruhi reseptor trombosit (Jagroop *et al.*, 2007; O'Donnell *et al.*, 2001).

*Immuno-flow cytometry* merupakan metode modern yang digunakan untuk mendeteksi dan melihat aktivitas agregasi trombosit secara *in vitro*. Alat *flow cytometry* yang digunakan yaitu BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA) milik Instalasi Patologi Klinik RSUD dr. Soetomo Surabaya yang dapat mendeteksi dua jenis fluorokrom berbeda. Pada pengujian ini diperlukan pelabelan trombosit dengan dua zat fluorokrom berbeda menggunakan antibodi, selain itu diperlukan penambahan agonis yaitu kolagen untuk menginduksi agregasi trombosit. Keuntungan dari metode *immuno-flow cytometry* yaitu waktu yang dibutuhkan untuk analisis sangat singkat, hasil yang didapat juga cepat, dapat memproses hingga 100.000 partikel per detik, dapat memisahkan partikel tunggal dari campuran populasi, dan metode modern yang dapat melakukan analisis multiparameter dengan prinsip gating pada populasi sel yang ada (Jagani, 2009).

Detektor molekuler yang digunakan pada pengujian adalah antibodi monoklonal berfluorokrom yaitu antibodi monoklonal *murine* IgG anti-*human* GPIIIa klon AP-3 (Sintesis Peter Newman, Grune & Stratton, Inc., USA) yang spesifik terhadap GPIIIa pada trombosit manusia dan ditambahkan penanda antibodi sekunder alexa fluor 488 (alexa fluor 488-*murine* anti-*human* Fc IgG) (Thermo fisher Inc., USA) dan penanda F(ab')<sub>2</sub>-Goat anti-*mouse* IgG (H+L) *secondary antibody*, PE (Phycoerythrin) (Thermo fisher Inc., USA). Uji anti agregasi trombosit dilakukan dengan menggunakan kolagen sebagai stimulus karena pada *immuno-flow cytometry* bergantung pada fungsi integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  pada kolagen (De Cuyper *et al.*, 2013). Pada pengujian *immuno-flow cytometry* digunakan dua jenis antibodi berfluorokrom yang berbeda, karena agregasi trombosit ditunjukkan dengan adanya dua macam warna dalam satu quadran (Q2) (De Cuyper *et al.*, 2013). Antibodi monoklonal murine IgG anti-*human* GPIIIa klon AP-3 merupakan antibodi yang spesifik berikatan dengan GPIIIa dan dapat menghambat agregasi trombosit yang diinduksi oleh ADP, trombin, ristocetin, selain itu juga dapat menghambat ikatan fibrinogen (Newman *et al.*, 1985). Trombosit yang telah diberi label dengan antibodi alexa fluor 488 akan memberikan warna hijau, sedangkan trombosit yang telah diberi label menggunakan antibodi PE akan memberikan warna merah pada Q2 bila di analisis menggunakan metode *immuno-flow cytometry*.

Dikarenakan efek samping penggunaan AAS seperti pendarahan pada gastrointestinal atau yang telah disebutkan diatas, maka peneliti akan melakukan uji senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat untuk melihat potensi yang ada dan mengetahui aktivitas anti agregasi trombosit menggunakan metode *thrombocyte aggregation test* dan *immuno-flow cytometry* sesuai yang telah dijabarkan pada alinea diatas. Sehingga diharapkan pengembangan obat baru turunan senyawa AAS dapat

mengurangi efek toksik dan memiliki efek terapeutik yang lebih baik bila dibandingkan dengan AAS yaitu sebagai anti agregasi trombosit.

## **1.2 Rumusan Masalah**

1. Bagaimana pengaruh senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat terhadap agregasi trombosit setelah pemberian konsentrasi 50 µg/mL (277 µmol/L) dibandingkan dengan senyawa asam asetilsalisilat pada plasma manusia dengan metode *thrombocyte aggregation test* secara in vitro?
2. Bagaimana pengaruh senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat terhadap agregasi trombosit setelah pemberian konsentrasi 50 µg/mL (277 µmol/L) dibandingkan dengan senyawa asam asetilsalisilat pada plasma manusia dengan metode *immuno-flow cytometry* secara in vitro?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

1. Menganalisis pengaruh senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat pada agregasi trombosit setelah pemberian konsentrasi 50 µg/mL (277 µmol/L) dengan metode *thrombocyte aggregation test* secara in vitro.
2. Menganalisis pengaruh senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat pada agregasi trombosit setelah pemberian konsentrasi 50 µg/mL (277 µmol/L) dengan metode *immuno-flow cytometry* secara in vitro.

## **1.4 Hipotesis Penelitian**

1. Senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat menurunkan agregasi trombosit setelah pemberian konsentrasi 50 µg/mL (277 µmol/L) dibandingkan dengan senyawa asam asetilsalisilat pada

plasma manusia menggunakan agonis kolagen dengan metode *thrombocyte aggregation test* secara in vitro.

2. Senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat menurunkan agregasi trombosit setelah pemberian konsentrasi 50 µg/mL (277 µmol/L) dibandingkan dengan senyawa asam asetilsalisilat pada plasma manusia menggunakan antibodi spesifik dan agonis kolagen dengan metode *immuno-flow cytometry* secara in vitro.

### **1.5 Manfaat Penelitian**

Dari hasil penelitian ini, diharapkan dapat digunakan sebagai acuan dalam mengembangkan senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat sebagai calon obat baru pengganti senyawa turunan salisilat yang memiliki indikasi anti agregasi trombosit dan memiliki efek samping yang minimal setelah melalui beberapa pengujian lebih lanjut yaitu uji praklinis dan klinis.