

**PENGARUH SENYAWA ASAM
2-(4-(KLOROMETIL)BENZOILOKSI)BENZOAT
TERHADAP JUMLAH SEL DAN KEKUATAN
EKSPRESI *CYCLOOXYGENASE-2* (COX-2) PADA
MENCIT (*MUS MUSCULUS*) YANG DIINDUKSI
LIPOPOLISAKARIDA**



**KARMILA
2443019139**

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

**PENGARUH SENYAWA ASAM
2-(4-(KLOROMETIL)BENZOILOKSI)BENZOAT TERHADAP
JUMLAH SEL DAN KEKUATAN EKSPRESI *CYCLOOXYGENASE-2*
(*COX-2*) PADA MENCIT (*MUS MUSCULUS*) YANG DIINDUKSI
LIPOPOLISAKARIDA**

SKRIPSI

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


OLEH:

KARMILA

2443019139

Telah disetujui pada tanggal 8 Juni 2023 dan dinyatakan LULUS

Pembimbing I,



27 JUN 2023

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

Pembimbing II,



dr. Hendy Wijaya, M.Biomed
NIK. 241.17.0973

Mengetahui,
Ketua Penguji



apt. Caroline, S.Si., M.Si.
NIK. 241.00.0444

2023

**LEMBAR PERSETUJUAN
PUBLIKASI KARYA ILMIAH**

Demi perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui skripsi/karya ilmiah saya, dengan judul: **Pengaruh Senyawa Asam 2-(4-(klorometil)benzoioksi)benzoat terhadap Jumlah Sel dan Kekuatan Ekspresi Cyclooxygenase-2 (COX-2) pada Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi Lipopolisakarida** 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, 8 Juni 2023



Karmila
2443019139

Saya menyatakan dengan sesungguhnya bahwa hasil tugas akhir ini adalah benar-benar merupakan 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, 8 Juni 2023



Karmila
2443019139

ABSTRAK

PENGARUH SENYAWA ASAM 2-(4-(KLOROMETIL)BENZOILOKSI)BENZOAT TERHADAP JUMLAH SEL DAN KEKUATAN EKSPRESI *CYCLOOXYGENASE-2* (COX-2) PADA MENCIT (*MUS MUSCULUS*) YANG DIINDUKSI LIPOPOLISAKARIDA

KARMILA
2443019139

Inflamasi adalah respon dari sistem kekebalan tubuh terhadap rangsangan berbahaya seperti patogen, sel yang rusak atau senyawa beracun. Inflamasi terjadi karena teraktivasinya enzim COX-2 yang berperan penting dalam ekspresi senyawa proinflamasi seperti prostaglandin (PG). OAINS memiliki mekanisme kerja dengan menghambat enzim COX-2 untuk mensintesis PG melalui jalur asam arakidonat. COX-2 adalah enzim yang ditranskripsikan melalui aktivasi jalur NF κ B akibat adanya patogen seperti Lipopolisakarida (LPS). Asam Asetilsalisilat (AAS) diketahui dapat menurunkan ekspresi COX-2 dengan menghambat proses transkripsi COX-2 pada jalur NF κ B yang merupakan persinyalan penting dalam transkripsi, proliferasi dan produksi sitokin proinflamasi sehingga memiliki keuntungan sebagai anti-inflamasi. Limpa merupakan organ yang berfungsi dalam pengaturan regulasi sel imun sebagai respon terhadap patogen. Limpa mengandung sel splenosit tempat terjadinya proliferasi dan aktivasi sel imun. Pada penelitian ini digunakan hewan coba mencit Swiss Webster usia 12 minggu yang dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, AAS, dan 4-CH₂Cl. Mencit diinduksi inflamasi dengan senyawa LPS dan pemberian senyawa uji selama 2 hari. Hasil yang didapatkan adalah pemberian asam 2-(4-(klorometil)benzoioksi)benzoat (4-CH₂Cl) dosis 60 mg/KgBB dapat menurunkan jumlah sel splenosit yang mengekspresi COX-2 dan kekuatan ekspresi COX-2 sehingga menunjukkan kemampuannya sebagai anti-inflamasi

Kata kunci: asam, 2-(4-(klorometil)benzoioksi)benzoat (4-CH₂Cl), fluorescence-activated cell sorting (FACS), inflamasi, lipopolisakarida, COX-2

ABSTRACT

THE EFFECT OF 2-(4-(CHLOROMETHYL)BENZOYLOXY)BENZOIC ACID ON THE NUMBER OF CELLS AND THE POWER OF EXPRESSION OF CYCLOOXYGENASE-2 (COX-2) IN MICE (*MUS MUSCULUS*) INDUCED LIPOPOLYSACCHARIDE

**KARMILA
2443019139**

Inflammation is the response of the immune system to harmful stimuli such as pathogens, damaged cells or toxic compounds. Inflammation occurs due to the activation of the COX-2 enzyme which plays an important role in the expression of proinflammatory compounds such as prostaglandins (PG). NSAIDs have a mechanism of action by inhibiting the COX-2 enzyme to synthesize PG through the arachidonic acid pathway. COX-2 is an enzyme that is transcribed through activation of the NF κ B pathway due to pathogens such as lipopolysaccharide (LPS). Acetylsalicylic acid (AAS) is known to reduce COX-2 expression by inhibiting the COX-2 transcription process in the NF κ B pathway which is an important signaling in transcription, proliferation and production of proinflammatory cytokines so that it has an advantage as an anti-inflammatory. The spleen is an organ that functions in the regulation of immune cell regulation in response to pathogens. The spleen contains splenocyte cells where proliferation and activation of immune cells occur. In this study, 12 week old Swiss Webster mice were divided into 4 groups: negative control; positive control; AAS; and 4-CH₂Cl. Mice were induced inflammation with LPS compounds and administration of test compounds for 2 days. The results obtained are the administration of 2-(4-(chloromethyl)benzoyloxy)benzoic acid (4-CH₂Cl) at a dose of 60 mg/KgBB can reduce the number of splenocyte cells that express COX-2 and the strength of COX-2 expression, thus showing its ability as an anti-inflammatory.

Keywords: 2-(4-(chloromethyl)benzoyloxy)benzoic acid (4-CH₂Cl), fluorescence-activated cell sorting (FACS), inflammation, lipopolysaccharide, COX-2

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Pengaruh Senyawa Asam 2-(4-(klorometil)benzoioksi)benzoat terhadap Jumlah Sel dan Kekuatan Ekspresi Cyclooxygenase-2 (COX-2) pada Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi Lipopolisakarida”** dapat terselesaikan. Penyusunan skripsi ini dimaksudkan untuk memenuhi persyaratan dalam menyelesaikan Pendidikan Strata-1 di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya. Penulis sangat menyadari bahwa skripsi ini tidak akan bisa terselesaikan tanpa bantuan pihak-pihak disekitar. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis sangat ingin mengucapkan rasa terima kasih sebesar-besarnya kepada:

1. Allah Tritunggal dan Bunda Maria yang telah memberikan berkat dan anugerah yang sangat luar biasa sehingga penulis diberikan kekuatan dan hikmat dalam menempuh pendidikan S1 dan menyelesaikan tugas akhir penulis.
2. Bapak Yudy Tjahjono, B.Sc.Biol., M.Sc.Biol. selaku dosen pembimbing I yang telah memberikan waktu, tenaga, petunjuk, saran, dan pemikirannya yang sangat berharga selama proses penelitian hingga terselesainya penyusunan naskah skripsi penulis.
3. Bapak dr. Hendy Wijaya, M. Biomed. selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan waktu, tenaga, petunjuk, saran, dan pemikirannya yang sangat berharga selama proses penelitian hingga terselesainya penyusunan naskah skripsi penulis.
4. Ibu Caroline, S.Si., M.Si., Apt. dan Bapak Diga Albrian Setiadi., S. Farm., M.Farm., Apt. selaku tim penguji yang telah memberikan

waktu, petunjuk, saran, arahan, dan kritik yang sangat membantu dan bermanfaat bagi pengembangan skripsi penulis.

5. Ibu Farida Lanawati Darsono S.Si., M.Sc. selaku penasihat akademik yang menuntun dan memberikan waktu, petunjuk, saran, serta arahan kepada penulis.
6. Bapak Ari dan Bapak Dwi. selaku laboran laboratorium penelitian yang telah memberikan waktu, tenaga, dan pikiran dalam pengerjaan skripsi penulis di laboratorium.
7. Ibu Nita selaku laboran di laboratorium Litbang RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang telah membantu dan membimbing dalam pengerjaan skripsi penulis dengan alat *flow cytometry*.
8. Orang tua terkasih yaitu Mama David, Papa David dan David serta seluruh keluarga besar penulis yang telah dengan sabar memberikan dukungan, doa dan semangat agar skripsi penulis dapat cepat terselesaikan dengan baik.
9. Teman-teman dari tim penelitian *Flow Cytometry* (Bara, Sindi, Echa, Shellin, Oryza dan Nico) yang telah bersama-sama berjuang untuk menyelesaikan proyek obesitas dan salisilat dan yang selalu memberikan semangat untuk menyelesaikan skripsi penulis.
10. Teman-teman “Wacana” (Sindi dan Cindy) yang telah memberikan dukungan yang amat besar dan doanya dalam menyelesaikan skripsi penulis.
11. Lee Haechan dan Mark Lee serta seluruh anggota NCT yang selalu memberikan semangat dan kekuatan dalam menyelesaikan skripsi penulis.
12. Kakak tingkat Kak Lutfi, Kak Paulina, Kak Steven atas bantuan, informasi, dukungan dan pengalaman yang diberikan kepada saya se-

hingga dapat menyelesaikan pendidikan S1 di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala.

13. Pihak-pihak lain yang telah memberikan bantuan baik secara langsung maupun tidak langsung dalam pengerjaan skripsi yang tidak dapat disebutkan satu per satu.
14. Terima kasih kepada diri sendiri yang telah berani keluar dari zona nyaman untuk memulai dan bergabung dengan teman-teman tim peneliti dan berjuang menempuh perkuliahan sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini meskipun banyak kendala yang dihadapi. *Congrats Karmila. Proud of my self, don't be afraid to step out of your comfort zone.*

Dengan keterbatasan pengalaman, pengetahuan maupun pustaka yang ditinjau, penulis menyadari kekurangan dalam penulisan naskah skripsi ini. Akhir kata penulis mengharapkan kritik dan saran agar naskah skripsi ini dapat lebih disempurnakan.

Surabaya, 8 Juni 2023

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
<i>ABSTRACT</i>	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Hipotesis Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Inflamasi.....	7
2.1.1. Mekanisme Inflamasi	8
2.1.2. Respon Imun terhadap Inflamasi.....	9
2.2 Sel T-limfosit	10
2.2.1. Pembentukan Sel T-limfosit	11
2.3 COX-2.....	12
2.4 OAINS (Obat Anti-Inflamasi Non Steroid)	13
2.4.1. Asam Asetilsalisilat atau AAS.....	14
2.4.2. 2-(4-(klorometil)benzoioksi)benzoat atau 4-CH ₂ Cl	16

	Halaman
2.5	Lipopolisakarida (LPS) 19
2.6	Organ Limpa 22
2.6.1.	Splenosit 23
2.7	<i>Flow Cytometry</i> 24
2.7.1.	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS)</i> 24
BAB 3.	METODE PENELITIAN 26
3.1	Jenis Penelitian 26
3.2	Bahan, Alat dan Hewan Coba 26
3.2.1.	Bahan Penelitian 26
3.2.2.	Alat Penelitian 28
3.2.3.	Hewan Coba 29
3.2.4.	Perhitungan Hewan Coba yang Dibutuhkan..... 30
3.3	Metode Penelitian..... 31
3.4	Rancangan Penelitian 31
3.5	Tahapan Penelitian 32
3.5.1.	Uji Kemurnian Senyawa Asam 4-CH ₂ Cl dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) 32
3.5.2.	Perlakuan Hewan Coba 33
3.5.3.	Penyiapan dan Pemberian Larutan Stok LPS 34
3.5.4.	Penyiapan dan Pemberian Larutan PGA 3% 35
3.5.5.	Penyiapan Suspensi dan Volume Pemberian Senyawa AAS 35
3.5.6.	Penyiapan Suspensi dan Volume Pemberian Senyawa Asam 4-CH ₂ Cl 35
3.5.7.	Pengukuran Suhu Mencit..... 36
3.5.8.	Penyiapan Buffer ACK (<i>Amonium-Chloride-Pottasium</i>) 36
3.5.9.	Penyiapan PBS (<i>Phosphate Buffer Saline</i>) 37
3.5.10.	Penyiapan Buffer A, B dan C 37

	Halaman
3.5.11. Prosedur Eutanasia Mencit	37
3.5.12. Prosedur Pengambilan Limpa Mencit.....	37
3.5.13. Prosedur Isolasi Splenosit.....	38
3.5.14. Pemeriksaan Konsentrasi Sel.....	39
3.5.15. Prosedur <i>Staining</i> Antibodi	39
3.6 <i>Flow Cytometry</i>	40
3.7 Analisa Data.....	43
3.7.1. Analisis FCM.....	43
3.7.2. Jumlah Sel Splenosit yang Mengekspresikan COX-2	43
3.7.3. Kekuatan Ekspresi COX-2	44
3.8 Variabel Penelitian	45
3.9 Analisis Statiska	46
3.10 Hipotesis Statiska	46
3.10.1. Hipotesis Nol (H ₀)	46
3.10.2. Hipotesis Alternatif (H _A)	46
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	48
4.1 Hasil	48
4.1.1. Senyawa Asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat Menurunkan Konsentrasi Sel Splenosit yang Mengekspresikan COX-2 pada Limpa Mencit Setelah Diinduksi Inflamasi dengan LPS	48
4.1.2. Senyawa Asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat Menurunkan Kekuatan Ekspresi Sel Splenosit yang Mengekspresikan COX-2 pada Limpa Mencit Setelah Diinduksi Inflamasi dengan LPS	50
4.2 Pembahasan.....	52
BAB 5. KESIMPULAN.....	59
5.1 Kesimpulan.....	59
5.2 Saran	59

	Halaman
DAFTAR PUSTAKA.....	60
LAMPIRAN	66

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 3.1	Bahan Penelitian yang Digunakan..... 26
Tabel 3.2	Alat Penelitian yang Digunakan 28
Tabel 3.3	Kelompok Perlakuan Hewan Coba 34
Tabel 3.4	Macam-macam Fluorokrom untuk Mendeteksi Sel 42
Tabel 3.5	Variabel Parameter Penelitian 45
Tabel 4.1	Tabel Statistik Jumlah Sel Splenosit yang Mengekspresikan COX-2 ($\times 10^5$) 49
Tabel 4.2	Tabel Statistik Kekuatan Ekspresi COX-2 pada Sel Splenosit 51

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur Asam Asetilsalisilat.....	14
Gambar 2.2 Skema Mekanisme Kerja Aspirin Menghambat Aktivasi COX-2.....	16
Gambar 2.3 Struktur 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat.....	16
Gambar 2.4 Pengamatan Mikroskopis Organ Lambung Berupa Sel Nekrosis Tikus Wistar Betina.....	18
Gambar 2.5 Struktur Lipopolisakarida.....	19
Gambar 2.6 Mekanisme Lipopolisakarida Menginduksi Inflamasi	21
Gambar 3.1 Skema Rancangan Penelitian	32
Gambar 3.2 Skema Kerja <i>Staining</i> Antibodi COX-2	40
Gambar 3.3 Spektrum Emisi dan Eksitasi dari 8 Jenis Fluorokrom pada Detektor	42
Gambar 3.4 Strategi Gating Jumlah Sel Splenosit yang Mengekspresikan COX-2.....	44
Gambar 3.5 Representatif Kekuatan Ekspresi COX-2 pada Sel Splenosit.....	45
Gambar 4.1 Representatif Populasi Sel Splenosit yang Mengekspresikan COX-2 ($\times 10^5$) Dibandingkan dengan Tiap Kelompok Perlakuan.....	48
Gambar 4.2 Jumlah Sel Splenosit yang Mengekspresikan COX-2 pada Setiap Kelompok Perlakuan. <i>Independent sample T test</i> , $*(0,05 < p < 0,01)$; $** (0,0099 < p < 0,001)$; $*** (0,00099 < p < 0,0001)$; $**** (p < 0,0001)$; $n=4$	49
Gambar 4.3 Representatif Kekuatan Ekspresi COX-2 ($\times 10^5$) Dibandingkan dengan Tiap Kelompok Perlakuan.....	50
Gambar 4.4 Kekuatan Ekspresi COX-2 pada Sel Splenosit Dibandingkan pada Setiap Kelompok Perlakuan. <i>Independent sample T test</i> , $*(0,05 < p < 0,01)$; $** (0,0099 < p < 0,001)$; $*** (0,00099 < p < 0,0001)$; $**** (p < 0,0001)$; $n=4$	51

Gambar 4.5 Ilustrasi Penelitian Pengaruh Pemberian Senyawa Asam
4-CH₂Cl pada Jumlah Ekspresi Sel Splenosit yang
Mengekspresikan COX-2 dan Kekuatan Ekspresi COX-2.. 58

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Surat Keterangan Fasilitas Laboratorium Hewan.....	66
Lampiran 2 Surat Keterangan Kelalaian Etik	67
Lampiran 3 Komposisi Pakan Standar <i>Chow Diet</i>	68
Lampiran 4 Perhitungan Jumlah Sampel Hewan Coba dengan <i>G*Power</i>	69
Lampiran 5 Suhu Pemeriksaan Tubuh Mencit.....	70
Lampiran 6 Katalog Antibodi Cox-2	71

DAFTAR SINGKATAN

OAINS	: Obat Anti Inflamasi Non Steroid
AAS	: Asam Asetil Salisilat
4-CH ₂ Cl	: Asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat
ACK	: <i>Ammonium-Chloride-Potassium</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PGA	: <i>Pulvis Gummi Arabicum</i>
LPS	: Lipopolisakarida
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
PE	: <i>Phycoerythrin</i>
PerCP	: <i>Peridin Chlorophyll Protein</i>
FACS	: <i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
TLR	: <i>Toll Like Receptor</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
MD	: <i>Myeloid Differentiation</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
IL	: Interleukin
GM-CSF	: <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
Treg	: T Regulator
KgBB	: Kilogram Berat badan
MAPK	: <i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
NFK β	: <i>Nuclear Factor Kappa Beta</i>
COX-1	: <i>Cyclooxygenase-1</i>
COX-2	: <i>Cyclooxygenase-2</i>
HLA	: <i>Human Leukocyte Antigen</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>

Th1	: <i>T-Helper 1</i>
Th2	: <i>T-Helper 2</i>
IACUCs	: <i>Institutionil Animal Care and Use Committees</i>
UV	: <i>Ultraviolet</i>
KLT	: <i>Kromatografi Lapis Tipis</i>
Vp	: <i>Volume Pemberian</i>
FITC	: <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
FCM	: <i>Flow Cytometry</i>
SSC	: <i>Side Scatter</i>
FSC	: <i>Forward Scatter</i>
FL	: <i>Fluorochrome</i>
NEG	: <i>Negatif</i>
POS	: <i>Positif</i>
Gscore	: <i>Glide Score</i>
PG	: <i>Prostaglandin</i>
PLA	: <i>Phospholipase A2</i>
LPB	: <i>Binding Protein</i>