

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



WAHYUNI ADITYA

2443014149

PROGRAM STUDI S1

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS KATOLIK WIDYA MANDALA SURABAYA

2018

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

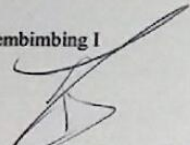
SKRIPSI

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

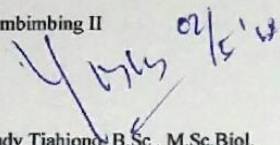
OLEH :
WAHYUNI ADITYA
2443014149

Telah disetujui pada tanggal 11 April 2018 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

Mengetahui,
Ketua Penguji



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

**LEMBAR PERSETUJUAN
PUBLIKASI KARYA ILMIAH**

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui skripsi/ karya ilmiah saya, dengan judul : **PENGARUH SENYAWA ASAM 2-(3-KLOROBENZOILOKSI)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. Demi pernyataan persetujuan publikasi karya ilmiah ini saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 1 Mei 2018



Wahyuni Aditya
2443014149

LEMBAR PERNYATAAN KARYA ILMIAH NON PLAGIAT

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, 1 Mei 2018



Wahyuni Aditya

2443014149

ABSTRAK

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

**WAHYUNI ADITYA
2443014149**

Asam asetilsalisilat (AAS) merupakan OAINS (Obat Anti Inflamasi Non Steroid) yang menghambat aktivitas dua jenis COX yaitu COX-1 dan COX-2. AAS menghambat aktivitas pada COX-1 sehingga menurunkan aktivasi trombosit pada manusia dengan cara mengurangi produksi tromboksan A₂ (TXA₂) yang digunakan sebagai anti trombosit. Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan agregasi trombosit yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh turunan AAS yaitu senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat terhadap agregasi trombosit. Pemeriksaan agregasi trombosit menggunakan subjek hewan mencit jantan yang dibagi dalam 3 kelompok yaitu, 1) kelompok kontrol negatif yang diberi PGA, 2) kelompok kontrol positif yang diberi asam asetilsalisilat dan 3) kelompok uji yang diberi senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat. Pengujian diberikan per oral dengan konsentrasi $7,21 \times 10^{-3}$ M (1,3mg/20gBB) pada kelompok kontrol positif dan senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoate kemudian dilakukan uji waktu perdarahan dan uji *flow cytometry*. Uji *flow cytometry* menggunakan antibodi PE/CY7 anti-murin CD-31 dan antibodi FITC anti-murin CD-31. Hasil uji waktu perdarahan diperoleh rata-rata waktu perdarahan kontrol negatif ($480 \pm 103,92$ detik), kontrol positif ($760 \pm 138,56$ detik) dan senyawa uji 3K (Asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat) ($370 \pm 17,32$ detik). 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 ($0,68 \pm 0,03$ SD/gram). Uji *flow cytometry* menunjukkan rata-rata %total agregasi trombosit kontrol negatif ($3,64 \pm 1,515$ %), kontrol positif ($2,12 \pm 0,885$ %) dan senyawa uji 3K ($1,12 \pm 0,545$ %). Berdasarkan hasil pengamatan terhadap senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat diketahui bahwa senyawa tersebut memiliki kemampuan sebagai anti-agregasi trombosit.

Kata Kunci: Asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat, asam asetilsalisilat, uji waktu perdarahan, uji *flow cytometry*, uji kuantitatif jumlah darah.

ABSTRACT

EFFECT OF 2-(3-CHLOROBENZOYLOXY) BENZOIC ACID ON PLATELET AGGREGATION USING FLOW CYTOMETRY AND BLEEDING TIME TESTING METHODS IN MICE

WAHYUNI ADITYA

2443014149

Acetylsalicylic acid (ASA) is an NSAID (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug) that inhibits the activity of two types of COX there are COX-1 and COX-2. ASA inhibits activity on COX-1 there by decreasing platelet activation in humans by reducing the production of thromboxane A₂ (TXA₂) used as an anti-platelet. In this research, platelet aggregation examination as aimed to determine the effect of ASA derivative of 2-(3-chlorobenzoyloxy) benzoic acid compound on platelet aggregation. Platelet aggregation examination mice were conducti subjects which were divided into 3 groups 1) negative control group given PGA, 2) positive control group treated with acetylsalicylic acid and 3) test group with 2-(3-chlorobenzoyloxy) benzoic acid. The test was administered orally at a concentration of 7.21×10^{-3} M (1.3mg/20gBB) in the positive control group and 2-(3-chlorobenzoyloxy) benzoic acid compound later tested bleeding time and flow cytometry test. Flow cytometry test was done using CD-31 anti-murine PE/CY7 antibody and anti-murine FITC antibody CD-31 mean while. The result of the trial time was obtained by the mean of negative control bleeding time (480 ± 103.92 second), positive control (760 ± 138.56 second) and 3K test compound (2-(3- (chlorobenzoyloxy)) benzoic acid) (370 ± 17.32 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). The flow cytometry test showed the average total aggregation of negative control platelets ($3.64 \pm 1.515\%$), positive controls ($2.12 \pm 0.885\%$) and 3K test compounds ($1.12 \pm 0.545\%$). Based on the observations we can conclude that 2-(3-chlorobenzoyloxy) benzoic acid compounds have the ability as an anti-aggregation of platelet.

Keywords: 2-(3-chlorobenzoyloxy) benzoic acid, acetylsalicylic acid, bleeding time, flow cytometry test, quantification of blood count.

KATA PENGANTAR

Puji dan rasa syukur yang mendalam penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan rahmatnya maka skripsi ini dapat terselesaikan. Skripsi yang berjudul **Pengaruh Senyawa Asam 2-(3-Klorobenzoiloksi)Benzoat Terhadap Agregasi Trombosit Dengan Metode Pengujian *Flow Cytometry* Dan Uji Perdarahan Pada Mencit** ini disusun dan diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi di Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.

Skripsi ini dapat terselesaikan tidak lepas dari bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu pada kesempatan ini penulis menyampaikan penghargaan dengan rasa terimakasih yang sebesar-besarnya atas bantuan, motivasi, didikan dan bimbingan yang sudah diberikan selama ini, antara lain kepada yang terhormat:

1. dr. Endang Retnowati, MS.,Sp.PK.(K). selaku dosen pembimbing I dan Yudy Tjahjono, B.Sc., M.Sc.Biol. selaku dosen pembimbing II atas segala bimbingan yang telah diberikan dengan penuh kesabaran dan pengertiannya serta banyak memberikan dukungan, motivasi, waktu, tenaga dalam membimbing dari awal sampai akhir penyusunan skripsi ini.
2. Dra. Siti Surdijati, MS.,Apt selaku penguji I dan Dr.drh. Hevi Wihadmadyatami, M.Sc. selaku penguji II yang telah memberikan banyak pengarahan dan memberikan banyak ilmu yang bermanfaat dalam penyusunan skripsi ini.
3. C. Caroline, S.Si., M.Si., Apt. selaku dosen pembimbing dalam tim penelitian senyawa turunan asam asetilsalisilat Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.

4. Farida Lanawati, S.Si., M.Sc. selaku wali studi yang telah memberikan motivasi dan bimbingan akademis selama perkuliahan di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.
5. Kaprodi Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya ibu Dr. Lanny Hartanti, S.S., M.Si. untuk bantuan serta bimbingan akademis selama perjalanan perkuliahan.
6. Kepala laboratorium yang telah memberikan ijin untuk melakukan penelitian dan laboran laboratorium biomedik (Pak Anang), Penelitian (Pak Dwi) dan Kimia organik (Pak Heri) yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.
7. Orang tua tercinta, ayah (Hapner Andung) dan ibu (Dimas) serta seluruh anggota keluarga untuk segalanya yang sudah diberikan kepada saya tanpa pamrih dan tulus ikhlas dalam saya menyelesaikan pendidikan strata-1 di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.
8. Teman - teman tim penelitian (Ola, Mega, Elmy, Alfian, dan Rista) terimakasih atas kerjasama, dukungan, kesabaran, suka dan duka selama penelitian hingga skripsi ini dapat terselesaikan.

Penulisan skripsi ini tentunya tidak lepas dari kekurangan karena keterbatasan pengalaman, pengetahuan, dan pustaka. Akhir kata penulis mengucapkan banyak terimakasih dan penulis sangat mengharapkan kritik dan saran untuk skripsi ini agar dapat disempurnakan.

Surabaya, 11 Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
<i>ABSTRACT</i>	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
DAFTAR SINGKATAN	x
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Hipotesa Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Asam Asetilsalisilat (AAS)	7
2.2 Asam 2-(3-Klorobenzoiloksi)Benzoat	11
2.3 Trombosit	15
2.3.1. Morfologi Trombosit	15
2.3.2. Mekanisme Agregasi Trombosit	16
2.4 Metode Pengujian	18
2.4.1. Metode Uji Waktu Perdarahan	18
2.4.2. Metode <i>Flow Cytometry</i>	19
BAB 3 METODE PENELITIAN	24
3.1 Jenis Penelitian	24
3.2 Bahan, Alat dan Hewan Coba Penelitian	24

	Halaman
3.2.1. Bahan Penelitian	24
3.2.2. Alat Penelitian	25
3.2.2. Hewan Coba	26
3.3. Rancangan Penelitian	28
3.4. Tahapan Penelitian	29
3.4.1. Senyawa Asam 2-(3-Klorobenzoiloksi)benzoat	29
3.4.2. Uji Kemurnian	29
3.4.3. Perlakuan pada Hewan Uji	30
3.4.4. Prosedur Uji Waktu Perdarahan pada Mencit	32
3.4.5. Prosedur Kerja Isolasi Darah pada Mencit dan Pembuatan PRP	34
3.4.6. Prosedur Uji <i>Flow Cytometry</i>	35
3.5. Analisis Statistika	41
BAB 4 HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	42
4.1 Penelitian	42
4.2 Uji Kemurnian Senyawa	42
4.3 Pengamatan	45
4.4 Pembahasan	53
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	59
5.1 Kesimpulan	59
5.2 Saran	59
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN	68

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Struktur molekul Asam Asetilsalisilat (AAS).....	7
2.2. Mekanisme Kerja “OAINS” pada Biosintesis Prostaglandin ...	9
2.3. Mekanisme Kerja AAS pada Trombosit	10
2.4. Struktur Asam 2-(3-Klorobenzoiloksi)Benzoat	12
2.5. Struktur Trombosit	16
2.6. Mekanisme Agregasi Trombosit <i>In vivo</i>	18
2.7. Mekanisme Kerja <i>Flow Cytometry</i>	20
2.8. Mekanisme Agregasi Trombosit dengan Agonis Kolagen	21
2.9. Ilustrasi Agregasi Trombosit dengan Marker Penanda Antibodi CD-31	23
3.1. Skema Rancangan Penelitian	28
3.2. Proses Pemberian Senyawa secara Per Oral dengan Sonde	32
3.3. Skema Uji Waktu Perdarahan	33
3.4. Skema Kerja Isolasi darah dan pembuatan PRP	35
3.5. Skema Kerja Pembuatan Larutan Stok Antibodi	36
3.6. Skema Kerja Uji Reaktivitas Antibodi pada Trombosit	37
3.7. Ilustrasi Hasil Uji Reaktivitas Antibodi	38
3.8. Skema Kerja Uji Antiagregasi pada Trombosit	40
4.1. Pengamatan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	44
4.2. Pola Darah Hasil Uji Waktu Perdarahan	46
4.3. Analisis Statistik Uji Waktu Perdarahan	47
4.4. Analisis Statistik Uji Kuantifikasi Jumlah Darah	48
4.5. Area <i>Gating</i> pada Populasi Trombosit	49
4.6. Uji Reaktivitas Antibodi pada Trombosit	50
4.7. Uji Anti Agregasi Trombosit	52
4.8. Analisis Statistik Uji <i>Flow Cytometry</i>	53

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1. Bahan Penelitian yang Digunakan	24
3.2. Alat Penelitian yang Digunakan	25
3.3. Parameter Uji Waktu Perdarahan	34
4.1. Pemeriksaan Organoleptis	42
4.2. Uji Kromatografi Lapis Tipis Senyawa Asam 2-(3- Klorobenzoiloksi)Benzoat	43
4.3. Uji Titik Leleh Senyawa Asam 2-(3-Klorobenzoiloksi)Benzoat	44

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
A. Berat Badan Mencit dan Analisis Statistik	68
B. Hasil Uji	73

DAFTAR SINGKATAN

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	= Prostrasiklin
PGD2	= Prostaglandin D2
PGF2 α	= 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	= <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PGA	= <i>Pulvis Gummi Arabicum</i>