

**PENGARUH SENYAWA ASAM
2-(3-KLOROBENZOILOKSI)BENZOAT TERHADAP AGREGASI
TROMBOSIT DENGAN METODE PENGUJIAN *THROMBOCYTE*
AGGREGATION TEST DAN *IMMUNO-FLOW CYTOMETRY* PADA
PLASMA MANUSIA**



MEGA RAHMADHANI

2443014103

**PROGRAM STUDI S1
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS KATOLIK WIDYA MANDALA SURABAYA
2018**

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, 10 Agustus 2018



Mega Rahmadhani
2443014103

**PENGARUH SENYAWA ASAM
2-(3-KLOROBENZOILOKSI)BENZOAT TERHADAP AGREGASI
TROMBOSIT DENGAN METODE PENGUJIAN *THROMBOCYTE*
AGGREGATION TEST DAN *IMMUNO-FLOW CYTOMETRY* PADA
PLASMA MANUSIA**

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi sebagian persyaratan
memperoleh gelar Sarjana Farmasi Program Studi Strata 1
di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya

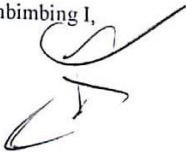
OLEH :

MEGA RAHMADHANI

2443014103

Telah disetujui pada tanggal 10 Agustus 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 *Thrombocyte Aggregation Test* dan *Immuno-flow Cytometry* pada Plasma Manusia** 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, 10 Agustus 2018



Mega Rahmadhani
2443014103

ABSTRAK

PENGARUH SENYAWA ASAM 2-(3-KLOROBENZOILOKSI)BENZOAT TERHADAP AGREGASI TROMBOSIT DENGAN METODE PENGUJIAN *THROMBOCYTE AGGREGATION TEST* DAN *IMMUNO-FLOW CYTOMETRY* PADA PLASMA MANUSIA

MEGA RAHMADHANI
2443014103

Asam asetilsalisilat (AAS) merupakan obat anti inflamasi, analgesik, antipiretik dan anti-trombosit dengan menghambat aktivitas pada COX-1 dan COX-2. AAS menghambat aktivitas pada COX-1, sehingga pembentukan tromboksan A₂ (TXA₂) dan agregasi trombosit terhambat. Namun, penggunaan AAS dapat memberikan efek samping berupa tukak lambung dan memiliki nilai toksisitas yang tinggi, sehingga berdasarkan dari hal tersebut maka dikembangkan senyawa baru turunan salisilat yaitu asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat (3K) sebagai obat baru pengganti asam asetilsalisilat dengan aktivitas anti agregasi trombosit dan efek samping yang minimal. Oleh karena itu diperlukan pemeriksaan lebih lanjut untuk melihat adanya aktivitas agregasi trombosit dengan metode uji *thrombocyte aggregation test* dan *immuno-flow cytometry* secara in vitro menggunakan plasma subyek dari sisi dalam lipatan siku yang disuntikkan dengan tiga kelompok uji (replikasi tiga kali). Untuk kelompok perlakuan terbagi menjadi, kontrol negatif (HEPES 50 mM), kontrol positif (asam asetilsalisilat), senyawa uji (asam 2-(3-klorobenzoiloksi). Kontrol positif dan 3K menggunakan konsentrasi 50 µg/mL (277 µmol/L). Kemudian dilakukan uji *thrombocyte aggregation test* dan uji *immuno-flow cytometry* meliputi uji reaktivitas antibodi pada trombosit dan uji anti agregasi trombosit. Uji *immuno-flow cytometry* menggunakan antibodi alexa fluor 488 anti-human AP-3 dan antibodi PE anti-human AP-3 dengan penambahan agonis berupa kolagen. Hasil uji dari 3K dibandingkan dengan kontrol negatif pada metode *thrombocyte aggregation test* adalah (0,367±0,0617 vs 0,329±0,0803 %/detik). Hasil uji *immuno-flow cytometry* adalah (17,02%±1,44 vs 15,12%±0,72%). Simpulan yang di peroleh bahwa pemberian senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat kurang berpotensi sebagai anti agregasi trombosit.

Kata Kunci: Asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat, asam asetilsalisilat, agregasi, *thrombocyte aggregation test*, *immuno-flow cytometry*.

ABSTRACT

EFFECT OF 2-(3-CHLOROBENZOYLOXY) BENZOIC ACID ON PLATELET AGGREGATION IN HUMAN PLASMA USING THROMBOCYTE AGGREGATION TEST AND IMMUNO-FLOW CYTOMETRY METHODS

MEGA RAHMADHANI
2443014103

Acetyl Salicylic Acid (ASA) is an anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and antiplatelet drug which inhibits activities of COX-1 and COX-2. ASA inhibits activity of COX-1, so that the forming of A2 thromboxane (TXA2) and platelet aggregation are obstructed. However, the usage of ASA can cause side effects in the form of peptic ulcers, it also has a high toxicity value, so based on that, new salicylic derivate compound is developed then in the form of 2-(3-chlorobenzoyloxy)benzoic acid (3K) as a new substitute drug of acetyl salicylic acid with the activity of platelet anti-aggregation and minimal side effects. Therefore, it required further examination to see the activity of platelet aggregation with thrombocyte aggregation test and immuno-flow cytometry method in vitro using plasma subjects from the antecubital fossa which is injected within three different test groups (three times replications). For the three treatment groups are divided into negative control (50 mM HEPES), positive control (AAS and 50 mM of HEPES), test compounds (2-(3-chlorobenzoyloxy)benzoic acid and 50 mM HEPES). The positive control and 3K are using 50 µg/mL (277 µmol/L) of concentrate. After that, thrombocyte aggregation test and immuno-flow cytometry are done included antibodies reactivity on platelets also platelet anti-aggregation test. Immuno-flow cytometry uses alexa fluor 488 anti-human AP-3 and PE anti-human AP-3 antibodies with the addition of agonist in the form of collagen. The results of 3K are compared to negative control on thrombocyte aggregation test method (0.367 ± 0.0617 vs 0.329 ± 0.0803 %/detik). Immuno-flow cytometry test results ($17.02\% \pm 1.44$ vs $15.12\% \pm 0.72\%$). Summary obtained that the addition of 2-(3-chlorobenzoyloxy)benzoic acid compound has less potential as platelet anti-aggregation.

Keywords: 2-(3-chlorobenzoyloxy)benzoic acid, acetyl salicylic acid, aggregation, thrombocyte aggregation test, immuno-flow cytometry.

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 *Thrombocyte Aggregation Test* dan *Immuno-Flow Cytometry* pada Plasma Manusia** 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 terima kasih 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 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
5. Dr. Lanny Hartanti, S.Si., M.Si selaku Ketua Prodi Studi S1 Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.
6. Henry Kurnia Setiawan, S.Si., M.Si., Apt. selaku pembimbing akademik.
7. Seluruh Bapak dan Ibu dosen Fakultas Farmasi yang sudah memberikan banyak sekali ilmu pengetahuan.
8. Kepala Instalasi Patologi Klinik RSUD dr Soetomo Surabaya, Laboratorium Gleneagles, Laboratorium Penelitian, Laboratorium Kimia Organik, 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. Ibu (Eva Siti), Nenek (Marchumah), kakak (Rifky Ramadhan dan Harun Ar-rasyid), adik (Muhammad Ariq) 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, Alfian, Febrina, Elmy, Sam, Rufus) yang telah berjuang bersama dan saling memberikan semangat dalam menyelesaikan proyek ini hingga selesai.
12. Teman-teman Go-tit (Fitri, Hanis, Titta, Rista, Cintia, Yuyung, Secilia, Umi) yang selalu memberikan dukungan

dan keceriaan dalam keberhasilan penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

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

Surabaya, 10 Agustus 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
<i>ABSTRACT</i>	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Hipotesa Penelitian.....	7
1.5 Manfaat Penelitian.....	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Asam Asetilsalisilat (AAS)	8
2.2 Asam 2-(3-Klorobenzoiloksi)Benzoat	12
2.3 Trombosit.....	14
2.3.1 <i>Morfologi Trombosit</i>	14
2.3.2 <i>Mekanisme Agregasi Trombosit</i>	15
2.4 Metode Pengujian.....	21
2.4.1 <i>Metode Thrombocyte Aggregation Test</i>	21
2.4.2 <i>Tinjauan Metode Flow Cytometry</i>	25
2.5 Senyawa Marker Antibodi AP-3	30
BAB 3 METODE PENELITIAN.....	31

	Halaman
3.1 Jenis Penelitian.....	31
3.2 Bahan, Alat Penelitian.....	31
3.2.1 <i>Bahan Penelitian</i>	31
3.2.2 <i>Alat Penelitian</i>	32
3.3 Metode Penelitian.....	33
3.4 Tahapan Penelitian	34
3.4.1 <i>Sintesis Asam 2-(3-Klorobenzoiloksi)Benzoat</i>	34
3.4.2 <i>Uji Kemurnian Asam 2-(3-Klorobenzoiloksi)Benzoat.</i>	34
3.4.3 <i>Perlakuan Plasma Subyek secara In Vitro</i>	36
3.4.4 <i>Prosedur Kerja Isolasi Darah, Pembuatan PRP, PPP</i>	37
3.4.5 <i>Prosedur Thrombocyte Aggregation Test</i>	38
3.4.6 <i>Prosedur Immuno-flow Cytometry</i>	39
3.5 Analisis Statistika	44
BAB 4 HASIL PERCOBAAN DAN PEMBAHASAN	45
4.1 Hasil Penelitian	45
4.1.1 <i>Identifikasi Asam 2-(3-Klorobenzoiloksi)benzoat</i>	45
4.2 Uji Kemurnian Senyawa.....	45
4.2.1 <i>Uji Organoleptis</i>	45
4.2.2 <i>Uji Titik Leleh</i>	45
4.2.3 <i>Uji Kromatografi Lapis Tipis</i>	46
4.3 Pengujian Agregasi Trombosit.....	47
4.3.1 <i>Uji Thrombocyte Aggregation Test</i>	48
4.3.2 <i>Uji Reaktivitas Antibodi pada Trombosit</i>	51
4.3.3 <i>Uji Anti Agregasi Trombosit</i>	53
4.4 Pembahasan.....	56

	Halaman
4.4.1 <i>Senyawa Asam 2-(3-Klorobenzoiloksi)Benzoat yang Murni dan Stabil pada Uji Organoleptis, KLT dan Titik Leleh</i>	56
4.4.2 <i>Pengaruh Asam 2-(3- Klorobenzoiloksi)Benzoat, AAS, Kolagen, HEPES 50 mM pH 7,4 pada Uji Agregasi Trombosit secara In Vitro</i>	57
4.4.3 <i>Uji Anti Agregasi Trombosit Metode Immuno-flow Cytometry</i>	59
4.4.4 <i>Perbandingan Hasil Senyawa Asam 2-(3-Klorobenzoiloksi)Benzoat pada Uji Anti Agregasi Trombosit menggunakan Plasma Manusia dan Mencit</i>	61
4.4.5 <i>Asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat menghambat COX-1 dan COX-2</i>	67
5.1 Kesimpulan	70
5.2 Saran.....	70
DAFTAR PUSTAKA.....	71
LAMPIRAN	82

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur Molekul Asam Asetilsalisilat	8
2.2 Mekanisme Kerja AAS	11
2.3 Struktur Asam 2-(3-(Klorobenzoiloksi)Benzoat.....	12
2.4 Struktur Trombosit	15
2.5 Mekanisme Agregasi Trombosit secara In Vivo.....	18
2.6 Mekanisme Kerja AAS pada Trombosit	20
2.7 Instrumen Alat Aggregometer	23
2.8 Representasi Hasil Uji TAT	24
2.9 Prinsip Kerja <i>Immuno-flow Cytometry</i>	26
2.10 Uji Agregasi Trombosit	28
2.11 Mekanisme Agregasi Trombosit dengan Agonis Kolagen secara In Vitro	29
3.1 Skema Rancangan Penelitian	33
3.2 Tahapan Isolasi PRP dan PPP	37
3.3 Tahapan Metode <i>Thrombocyte Aggregation Test</i>	38
3.4 Pembuatan Larutan Stok Antibodi.....	40
3.5 Uji Reaktivitas Antibodi terhadap Trombosit.....	41
3.6 Uji Anti Agregasi	42
4.1 Hasil Uji KLT Senyawa Asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat.	47
4.2 Hasil Uji <i>Thrombocyte Aggregation Test</i>	49
4.3 Uji <i>Thrombocyte Aggregation Test</i> diperoleh Nilai %max ...	50
4.4 Uji <i>Thrombocyte Aggregation Test</i> diperoleh Nilai Vmax....	51
4.5 Area <i>Gating</i> pada Populasi Trombosit.....	52
4.6 Uji Reaktivitas Antibodi pada Trombosit	53
4.7 Uji Anti Agregasi Trombosit.....	55

Gambar

Halaman

4.8	Uji <i>Immuno-flow Cytometry</i>	56
-----	--	----

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
2.1	Daftar Fluorokrom.....	27
3.1	Bahan Penelitian yang Digunakan.....	31
3.2	Alat Penelitian yang Digunakan.....	32
3.3	Daftar Perlakuan Plasma Subyek secara In Vitro.....	36
4.1	Pemeriksaan Organoleptis.....	45
4.2	Titik Leleh Senyawa Asam 2-(3-Klorobenzoiloksi)Benzoat.	46
4.3	Uji Kromatografi Lapis Tipis Senyawa Asam 2-(3-Klorobenzoiloksi)Benzoat.....	46

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
A	Hasil Uji dan Analisis Statistik.....	82
B	Surat Kelayakan Etik.....	94
C	Surat Persetujuan Tindakan Medik.....	95
D	Penentuan Jumlah Subyek	96

DAFTAR SINGKATAN

AA	= Arachidonic acid
AAS	= Asam Asetilsalisilat
AC	= Enzim adenilen siklase reseptor platina TXA ₂
ADP	= Adenosin difosfat
ATP	= Adenosin trifosfat
COX	= Cyclooxygenase
C/EBP	= CAAT <i>Enhancer Binding Protein</i>
DTS	= Dense tubular system
ED ₅₀	= <i>Effective dose 50</i>
FSC	= Forward scatter
GP	= Glikoprotein
KLT	= Kromatografi lapis tipis
LD ₅₀	= Lethal dose 50
Mit	= <i>Mitochondria</i>
MTC	= Mikrotubular coil
NF-κB	= <i>nuclear factor kappa B</i>
OAINS	= Obat anti inflamasi non steroid
OCS	= <i>Open canalicular system</i>
PE	= Phycoerythrin
PG	= Prostaglandin
PGD2	= Prostaglandin D2
PGE2	= Prostaglandin E2
PGF2α	= Prostaglandin F2α
PGH2	= Prostaglandin H2
PGI ₂	= Prostaglandin I ₂
PLT	= Platelet

PPP	= <i>Platelet poor plasma</i>
PRP	= <i>Platelet rich plasma</i>
Rf	= Retardation factor
SSC	= Side scatter
TAT	= Thrombocyte aggregation test
TP	= Reseptor platinum PGI ₂ (reseptor IP)
TXA ₂	= Tromboksan A ₂
VSMCs	= Vascular smooth muscle cells
v/v	= Volume per volume
vWf	= Von willebrand factor
α -G	= α -granules
δ -G	= δ -granules atau <i>dense bodies</i>
3K	= Asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat.