

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Asam asetil salisilat atau disingkat AAS adalah senyawa turunan asam salisilat yang disintesis pertama kali oleh Felix Hoffman dari perusahaan Bayer Jerman pada tahun 1897 (Dresler, 1899). AAS dihasilkan dengan mereaksikan asam salisilat dengan asam asetat menggunakan mekanisme reaksi anhidrida asam (Forsythe, 1991). AAS adalah senyawa yang termasuk ke dalam golongan OAINS (Obat Anti Inflamasi Non Steroid) dengan mekanisme kerja sebagai anti inflamasi, analgesik, dan antipiretik (Vane *and* Botting, 2003). AAS merupakan obat yang dapat diabsorpsi dengan cepat, praktis, dan lengkap terutama di bagian pertama duodenum. AAS juga bersifat asam sehingga sebagian dari AAS juga diserap di lambung. AAS diserap dalam bentuk utuh dan akan dihidrolisis di hati menjadi asam salisilat (Tjay *and* Rahardja, 2007). Kadar plasma tertinggi dicapai dalam waktu 14 menit, waktu paruh ± 17 menit (Siswandono *and* Soekardjo, 2000).

AAS berkerja dengan menghambat enzim siklooksigenase atau COX. COX merupakan enzim yang berperan dalam biosintesis prostaglandin (Simmons *et al.*, 2004). AAS bekerja dengan menghambat COX-1 dan COX-2 (Aldasoro *et al.*, 2007). Pada dosis rendah, AAS bekerja pada COX-1 sedangkan pada dosis tinggi bekerja pada COX-2 (Hayden *et al.*, 2002). AAS efektif sebagai analgesik pada dosis lebih dari 325 mg/70KgBB dan pada dosis rendah (75-325 mg/hari) sebagai obat anti platelet (Lanas *and* Scheiman, 2007).

AAS, selain berfungsi sebagai OAINS, juga memberi efek samping iritasi lapisan lambung, fungsi ginjal, dan sebagai penghambat agregasi

platelet dalam kerjanya menghambat COX-1. Toksisitas yang tinggi pada AAS ini mendorong pengembangan obat baru yang memiliki toksisitas yang lebih rendah. Modifikasi yang telah dilakukan yaitu mereaksikan asam salisilat dengan turunan benzoil klorida melalui reaksi asilasi Schotten-Baumann menghasilkan asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat dan asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi)benzoat (Martak *et al.*, 2009; Caroline *et al.*, 2019).

Asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat telah melewati uji tentang toksisitas subkronis terhadap tikus wistar telah dilakukan dengan parameter uji aktivitas dan indeks organ. Hasil uji menunjukkan bahwa senyawa jika dipaparkan kepada tikus jantan dengan dosis yang setara dengan 3.150-6300mg/70KgBB pada manusia tidak memberikan efek toksik, efek sedasi, efek relaksasi pada otot, serta tidak memberikan pengaruh terhadap saraf otonom (Pradipta, 2016). Pada penelitian lain, asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat juga telah melalui uji toksisitas akut yang memberikan nilai *Lethal Dose*₅₀ (LD₅₀) asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi) benzoat sebesar 2000 mg/kgBB. Hal ini menunjukkan bahwa asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat tidak lebih toksik daripada AAS yang memiliki LD₅₀ 250 mg/kgBB (Tamayanti *et al.*, 2016).

Asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat dan asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi) benzoat telah melalui uji nilai pKa dengan pelarut campur metanol-air dan memberikan hasil sebesar $4,28 \pm 0,056$ untuk asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat dan $4,54 \pm 0,060$ untuk asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat. Kedua nilai ini lebih baik dibandingkan dengan AAS sehingga dapat disimpulkan bahwa senyawa ini lebih mudah diabsorpsi dibandingkan dengan AAS. (Sutanto, 2013; Caroline *et al.*, 2019).

Kedua senyawa juga telah melewati uji aktivitas analgesik. Hasil uji yang diperoleh yakni harga *Effective Dose*₅₀ (ED₅₀) dari senyawa asam 2-(3-(klorometil)benzoioksi)benzoat sebesar 20,09 mg/kgBB dan asam 2-(4-(klorometil)benzoioksi)benzoat sebesar 11,31 mg/kgBB. Nilai ini lebih kecil dibandingkan dengan harga ED₅₀ AAS yaitu sebesar 34,89 mg/kgBB. Oleh sebab itu dapat ditarik kesimpulan bahwa kedua senyawa mampu memberi efek analgesik yang lebih kuat dibandingkan dengan AAS (Martak *et al.*, 2009; Caroline *et al.*, 2019).

Uji lain yang telah dilewati oleh asam 2-(3-(klorometil)benzoioksi)benzoat dan asam 2-(4-(klorometil)benzoioksi)benzoat adalah uji pemodelan molekuler turunan asam benzoil salisilat pada reseptor COX-2 melalui program *Glide* (lisensi Schrodinger). Hasil yang didapat adalah asam 2-(3-(klorometil)benzoioksi)benzoat memiliki *GScore* senilai -9,48 kkal/mol dan asam 2-(4-(klorometil)benzoioksi)benzoat senilai -8,79 kkal/mol. Nilai ini menunjukkan bahwa kedua senyawa memiliki afinitas terhadap enzim COX-2 yang lebih besar dibanding dengan AAS dengan *GScore* -5,88 kkal/mol (Caroline *et al.*, 2019).

Dari penelitian – penelitian terdahulu, didapatkan hasil bahwa kedua senyawa turunan baru ini memiliki kemampuan yang lebih baik dalam efektivitas maupun dalam toksisitas apabila dibandingkan dengan AAS. Namun asam 2-(3-(klorometil)benzoioksi)benzoat dan asam 2-(4-(klorometil)benzoioksi)benzoat masih belum memiliki kejelasan dalam fungsinya sebagai obat anti agregasi platelet, mengingat AAS yang memiliki kemampuan dalam menghambat proses agregasi platelet.

Pengujian agregasi platelet bertujuan untuk mendeteksi abnormalitas fungsi platelet (Jagroop *et al.*, 2007). Salah satu metode uji agregasi platelet adalah dengan uji *immuno-flow cytometry*. *Flow cytometer* adalah alat yang dapat mendeteksi dua jenis fluorokrom berbeda. FACS menganalisis

beberapa sel individu dari kumpulan sel. Keunggulan teknologi ini adalah gabungan dari dimensi sampel, kecepatan akuisisi data, ketepatan, dan ukuran pengukuran (Picot *et al.*, 2012). Sel individu akan diidentifikasi saat melewati zona iluminasi/deteksi dan menjadi *droplet*. Droplet yang mengandung sel akan diurutkan saat akan melewati antara *deflecting plates* (Herzenberg *et al.*, 2002). *Flow cytometer* mampu menganalisis dengan sangat singkat, hasil yang didapat juga cepat, dapat memisahkan partikel tunggal dari campuran populasi, dan adanya komputer yang modern dapat melakukan analisis multiparameter (Robinson, 2006).

Immuno-flow cytometry merupakan metode modern yang digunakan untuk mendeteksi dan melihat aktivitas agregasi platelet secara *in vitro*. Alat *flow cytometry* yang digunakan yaitu BDFACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA) milik Instalasi Patologi Klinik RSUD dr. Soetomo Surabaya. Dalam uji FACS menggunakan dua zat warna yang berbeda menggunakan antibodi kemudian pengukuran menggunakan adanya agregasi dari *events* berwarna ganda pada *flow cytometer* (Kuypers *et al.*, 1990). Pada metode ini digunakan dua zat penanda/pewarna untuk antibodi karena agregasi platelet ditunjukkan dengan adanya dua macam warna dalam satu quadran (Q2) (De Cuyper *et al.*, 2013).

Uji agregasi dilakukan dengan menggunakan kolagen sebagai stimulus karena pada FACS bergantung pada fungsi integrin α IIb β 3 pada kolagen (De Cuyper *et al.*, 2013). Zat warna atau detektor molekuler yang digunakan adalah antibodi anti GPIIb/IIIa nomor klon GI-5 dengan penanda (fluorokrom) PE F(ab')₂-Goat anti-mouse IgG (H+L) (Thermo fisher Inc., USA) dan Alexa Fluor 488-murine anti-human Fc IgG (Thermo fisher Inc., USA).

Berdasarkan hal tersebut maka diperlukan suatu pengujian dengan menggunakan metode uji *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) untuk mengetahui aktivitas agregasi platelet pada senyawa uji sehingga diperoleh asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat dan asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat sebagai antiplatelet dengan toksisitas yang lebih rendah dibanding ASA.

1.2 Rumusan Masalah

- 1 Bagaimana pengaruh senyawa asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat terhadap agregasi platelet setelah pemberian konsentrasi 277 $\mu\text{mol/L}$ pada plasma manusia dengan metode *immuno-flow cytometry* secara *in vitro*?
- 2 Bagaimana pengaruh senyawa asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi)benzoat terhadap agregasi platelet setelah pemberian konsentrasi 277 $\mu\text{mol/L}$ pada plasma manusia dengan metode *immuno-flow cytometry* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

- 1 Menganalisis pengaruh senyawa asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat pada agregasi platelet setelah pemberian konsentrasi 277 $\mu\text{mol/L}$ pada plasma manusia dengan metode *immuno-flow cytometry* secara *in vitro*.
- 2 Menganalisis pengaruh senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat pada agregasi platelet setelah pemberian konsentrasi 277 $\mu\text{mol/L}$ pada plasma manusia dengan metode *immuno-flow cytometry* secara *in vitro*.

1.4 Hipotesis Penelitian

- 1 Senyawa asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat menurunkan agregasi platelet setelah pemberian konsentrasi 277 $\mu\text{mol/L}$ pada plasma manusia dengan metode *immuno-flow cytometry* secara in vitro.
- 2 Senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat menurunkan agregasi platelet setelah pemberian konsentrasi 277 $\mu\text{mol/L}$ pada plasma manusia 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-(klorometil)benzoiloksi)benzoat dan 2-(4-(klorometil)benzoiloksi) sebagai calon obat baru pengganti senyawa turunan salisilat yang memiliki efek anti agregasi platelet yang lebih baik dengan toksisitas yang minimal setelah melalui beberapa pengujian lebih lanjut yaitu uji praklinis dan klinis.