

**UJI ANTI AGREGASI TURUNAN ASAM SALISILAT PADA
TROMBOSIT MANUSIA SECARA IN VITRO**



SAMUEL HANDOYO

2443015056

PROGRAM STUDI S1

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS KATOLIK WIDYA MANDALA SURABAYA

2020

**UJI ANTI AGREGASI TURUNAN ASAM SALISILAT PADA
TROMBOSIT MANUSIA SECARA IN VITRO**

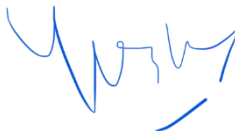
SKRIPSI

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

OLEH :
SAMUEL HANDOYO
2443015056

Telah disetujui pada tanggal 17 Juli 2020 dan dinyatakan LULUS

Pembimbing,



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

Mengetahui,

Ketua Penguji



Dra. Siti Surdijati, Ms., Apt.
NIK. 241.14.0807

LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH

Demi perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui skripsi/karya ilmiah saya, dengan judul: **Uji Anti Agregasi Turunan Asam Salisilat Pada Trombosit Manusia Secara In Vitro** 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, 2020



2443015056

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, 2020



Samuel Handoyo

2443015056

ABSTRAK

UJI ANTI AGREGASI TURUNAN ASAM SALISILAT PADA TROMBOSIT MANUSIA SECARA IN VITRO

SAMUEL HANDOYO
2443015056

Asam asetilsalisilat (AAS) merupakan obat anti inflamasi, analgesik, antipiretik dan anti-trombosit dengan menghambat aktivitas pada COX-1 dan COX-2. AAS juga memiliki efek samping yakni tukak lambung. Hal ini mendorong pengembangan obat baru yang memiliki toksisitas yang lebih rendah. Modifikasi yang telah dilakukan menghasilkan asam 2-(3-(klorometil)benzoioksi) benzoat dan asam 2-(4-(klorometil)benzoioksi) benzoat. Kedua senyawa baru masih belum memiliki kejelasan dalam fungsinya sebagai obat anti agregasi platelet. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh kedua senyawa pada agregasi platelet manusia *in vitro* dengan metode *immuno-flow cytometry*. Perlakuan dibagi menjadi empat kelompok yaitu kontrol negatif (buffer HEPES 50mM), kontrol positif (AAS dalam buffer HEPES 50mM), dan perlakuan dengan senyawa uji yaitu asam 2-(3-(klorometil)benzoioksi)benzoat dalam buffer HEPES 50mM dan asam 2-(4-(klorometil)benzoioksi)benzoat dalam buffer HEPES 50mM dengan tiga kali replikasi. Kontrol positif dan kelompok perlakuan menggunakan dosis yang sama yakni 277mM. Kemudian dilakukan uji *immuno-flow cytometry* menggunakan antibodi alexa fluor 488 GI-5 dan antibodi PE GI-5 dengan penambahan agonis berupa kolagen. Uji *immuno-flow cytometry* meliputi uji reaktivitas antibodi dan uji agregasi platelet. Hasil yang didapatkan dari uji agregasi platelet adalah rata-rata %total pada kuadran 2. Perlakuan kontrol negatif memberikan hasil rata-rata %total sebesar 14,11±1,792%, kontrol positif sebesar 13,39±1,683%, asam 2-(3-(klorometil)benzoioksi)benzoat sebesar 11,21±1,669%, dan asam 2-(4-(klorometil) benzoioksi)benzoat sebesar 12,23±2,347%. Dari hasil uji statistik, kelompok kontrol positif ($P=0,0195$) dan kelompok asam 2-(3-(klorometil) benzoioksi)benzoat ($P=0,0142$) memberikan hasil yang lebih kecil dari kontrol negatif secara signifikan ($P=0,0195$) sedangkan kelompok asam 2-(4-(klorometil)benzoioksi) benzoat memberikan hasil yang tidak berbeda signifikan dibanding kelompok kontrol positif ($P=0,0687$).

Kata Kunci : Asam 2-(3-(klorometil)benzoioksi)benzoat, asam 2-(4-(klorometil) benzoioksi)benzoat, asam asetilsalisilat, agregasi, platelet, *immuno-flow cytometry*.

ABSTRACT

***IN VITRO* ANTI AGGREGATION TEST OF SALICYLIC ACID DERIVATIVE ON HUMAN THROMBOCYTE**

SAMUEL HANDOYO

2443015056

Acetylsalicylic acid (AAS) is an antiinflammatory, analgesic, antipyretic, and anti thrombocyte aggregation drug which work by inhibits the activities of COX-1 and COX-2. However, acetylsalicylic acid can also cause gastric ulcer. This effect causes the invention of new drugs that has same effect but with less toxicity. This lead to the modification and development of two new drug in the form of 2-(3-(chloromethyl)benzoiloxo)benzoic acid and 2-(4-(chloromethyl)benzoiloxo)benzoic acid. These two novel drugs are still not proven yet of their activity inhibiting platelet aggregation. Therefore this experiment were done to analyze the novel drugs activity on human platelet aggregation using immuno-flow cytometry as the method. There are four different test group, negative control (50 mM HEPES buffer), positive control (Acetylsalicylic acid on HEPES buffer), test compound 2-(3-(chloromethyl)benzoiloxo)benzoic acid on 50 mM HEPES buffer, and test compound 2-(4-(chloromethyl)benzoiloxo)benzoic acid on 50 mM HEPES buffer) (three time replication each). Positive control and all test compound are using the same dosage of 277mM. Immuno-flow cytometry test uses alexa fluor 488-GI-5 and PE-GI5 antibodies with the addition of collagen as platelet aggregation agonist. This test consist of antibody reactivity test and platelet anti aggregation test. The results of this experiment are in the form of mean of %total on second quadran. Negative control gives the value of $14,11 \pm 1,792\%$, positive control $13,39 \pm 1,683\%$, 2-(3-(chloromethyl)benzoiloxo) benzoic acid $11,21 \pm 1,669\%$, and 2-(4-(chloromethyl)benzoiloxo)benzoic acid $12,23 \pm 2,347\%$. Statistically, positive control group ($P=0,0195$) and 2-(3-(chloromethyl)benzoiloxo) benzoic acid group ($P=0,0142$) are significantly different compared to negative control while 2-(4-(chloromethyl)benzoiloxo)benzoic acid group ($P=0,0687$) is not different significantly.

Keyword : 2-(3-(chloromethyl)benzoiloxo)benzoic acid, 2-(4-(chloromethyl)benzoiloxo)benzoic acid, acetylsalicylic acid, platelet, aggregation, immuno-flow cytometry.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan rahmat dan karunianya, sehingga skripsi dengan judul **Uji Anti Agregasi Turunan Asam Salisilat pada Trombosit Manusia secara In Vitro** dapat terselesaikan. Penyusunan skripsi ini dimaksudkan untuk memenuhi persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu selama proses pembuatan naskah skripsi ini:

1. Yudy Tjahjono, B.Sc., M.Sc.Biol. sebagai Pembimbing yang telah memberikan ilmu untuk menyelesaikan skripsi ini dan semangat dalam proses penyelesaian skripsi. 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 Ketua Penguji dan dr. Hendy Wijaya, M. Biomed selaku dosen Penguji yang telah memberikan saran dan masukan pada skripsi ini.
3. Drs. Kuncoro Foe, Ph. D., G. Dip. Sc., Apt selaku rektor Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.
4. Sumi Wijaya, Ph. D. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.
5. Dr. F. V. Lanny Hartatanti, S.Si., M.Si. selaku Ketua Program Studi S-1 Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya
6. Lucia Hendriati, S.Si., M.Sc., Apt. selaku pembimbing akademik.
7. Rufus Bayu Yulianto selaku rekan kerja skripsi yang membantu dalam pengerjaan skripsi dari awal hingga akhir.

8. Seluruh Bapak dan Ibu dosen Fakultas Farmasi yang sudah memberikan banyak sekali ilmu pengetahuan.
9. Kepala Instalasi Patologi Klinik RSUD dr Soetomo Surabaya, Laboratorium Gleneagles, Laboratorium Penelitian, dan Laboratorium Diagnostik Klinik yang telah memberikan izin menggunakan fasilitas untuk melakukan penelitian.
10. Para petugas laboratorium, yaitu Ibu Nita dan Bapak Dwi yang telah membantu dalam memfasilitasi alat beserta bahan selama proses penelitian.

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

Surabaya, 9 Juli 2020

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK.....	i
<i>ABSTRACT</i>	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB I	
PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Tujuan Penelitian.....	5
1.4. Hipotesis Penelitian.....	6
1.5. Manfaat Penelitian.....	6
BAB II	
TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Asam Asetil Salisilat	7
2.2. Asam 2-(3-(Klorometil)Benzoiloksi)Benzoat	10
2.3. Asam 2-(4-(Klorometil)Benzoiloksi)Benzoat	12
2.4. Platelet	14
2.5. Mekanisme Agregasi Platelet	15
2.6. Aktivasi Platelet Secara In Vitro	17
2.7. Anti Platelet.....	18
2.8. Marker Antibodi Gi-5.....	20

BAB III	Halaman
METODOLOGI PENELITIAN	
3.1. Bahan Dan Alat Penelitian	22
3.1.1. Bahan Penelitian.....	22
3.1.2. Alat Penelitian	23
3.2. Metode Penelitian.....	24
3.2.1. Sintesis Senyawa Asam 2-(3-(Klorometil)Benzoiloksi) Benzoat	24
3.2.2. Uji Kemurnian Senyawa Asam 2-(3-(Klorometil) Benzoiloksi)Benzoat dan Asam 2-(4-(Klorometil)Benzoiloksi) Benzoat	24
3.2.3. Perlakuan pada Plasma Subjek secara In Vitro	27
3.2.4. Prosedur Isolasi Darah dan Pembuatan PRP	28
3.2.5. Uji Reaktivitas Antibodi pada Platelet	29
3.2.6. Uji <i>Fluorescence Activated Cells Sorting</i> (FACS).....	30
3.2.7. Analisis Statistika	34
3.2.8. Hipotesis Statistika	34
 BAB IV	
HASIL PERCOBAAN DAN PEMBAHASAN	
4.1. Uji Identifikasi Senyawa	35
4.2. Uji Kemurnian Senyawa.....	35
4.2.1. Uji Organoleptis	35
4.2.2. Uji Titik Leleh.....	36
4.2.3. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	37
4.2.4. Uji Reaktivitas Antibodi.....	39
4.2.5. Hasil Uji Anti Agregasi Platelet	40
4.2.6. Pembahasan Uji Anti Agregasi Platelet.....	44

BAB V	Halaman
KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Kesimpulan.....	48
5.2. Saran	48
DAFTAR PUSTAKA.....	49
LAMPIRAN	56

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur yang Menggambarkan Molekul AAS.....	7
2.2 Mekanisme Kerja AAS pada Biosintesis Prostaglandin.....	9
2.3 Struktur Asam 2-(3-(Klorometil)Benzoiloksi)Benzoat	10
2.4 Struktur Asam 2-(4-(Klorometil)Benzoiloksi)Benzoat	12
2.5 Struktur Platelet.....	14
2.6 Interaksi Reseptor - Ligan dalam Agregasi Platelet In Vivo	16
2.7 Mekanisme Agregasi Platelet Dengan Agonis Kolagen Secara In Vitro	17
2.8 Mekanisme Kerja AAS pada Platelet	19
3.1 Gambaran Umum Kerangka Penelitian yang Dilakukan.....	24
3.2 Skema Kerja Uji Reaktivitas Antibodi terhadap Platelet.....	29
3.2 Lanjutan Skema Kerja Uji Reaktivitas Antibodi terhadap Platelet.....	30
3.3 Skema Kerja Uji Agregasi Platelet Manusia dengan Menggunakan Metode <i>Flow- Cytometry</i>	32
3.3 Lanjutan Skema Kerja Uji Agregasi Platelet Manusia dengan Menggunakan Metode <i>Flow- Cytometry</i>	33
4.1 Pengamatan Kromatografi Lapis Tipis Menggunakan 3 Fase Gerak	38
4.2 Pengamatan Kromatografi Lapis Tipis Menggunakan 3 Fase Gerak	38
4.3 Area Gating pada Platelet dan Hasil Pembacaan pada FACSCalibur	39
4.4 Uji Reaktivitas Pada Populasi Platelet dengan <i>Flow cytometry</i>	40
4.5 Hasil Flow Cytometry Agregasi Platelet Plasma Manusia	42
4.6 Analisis Uji Statistik Uji <i>Flow cytometry</i>	43

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1	Bahan Penelitian yang Digunakan..... 22
3.2	Alat Penelitian yang Digunakan 23
3.3	Tabel Perlakuan dan Dosis 27
4.1	Uji Organoleptis Senyawa 2-(3-(Klorometil)Benzoiloksi)Benzoat dan Asam 2-(4-(Klorometil)Benzoiloksi)Benzoat..... 35
4.2	Titik Leleh Senyawa Asam 2-(3-(Klorometil)Benzoiloksi) Benzoat..... 36
4.3	Titik Leleh Senyawa Asam 2-(3-(Klorometil)Benzoiloksi) Benzoat..... 36
4.4	Uji KLT Senyawa Asam 2-(3-(Klorometil)Benzoiloksi)Benzoat dengan Beberapa Pembanding Menggunakan 3 Fase Gerak 37
4.5	Uji KLT Senyawa Asam 2-(4-(Klorometil)Benzoiloksi)Benzoat dengan Beberapa Pembanding Menggunakan 3 Fase Gerak 37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
A Hasil Uji <i>Immuno-Flow cytometry</i>	56
B Rangkuman Hasil Uji <i>Immuno-Flow cytometry</i>	60
C Surat Komite Etik	61
D Surat Informed Consent.....	62