

**PENGARUH ASAM 2-(3-  
(KLOROMETIL)BENZOILOKSI)BENZOAT  
TERHADAP RASIO LIMFOSIT-T CD3CD4 DAN  
CD3CD8 PADA LIMPA MENCIT SWISS WEBSTER  
METODE *FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL  
SORTING* (FACS)**



**NICO JAFET**

**2443019270**

**PROGRAM STUDI S1  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS KATOLIK WIDYA MANDALA SURABAYA  
2023**

**PENGARUH ASAM 2-(3-  
(KLOROMETIL)BENZOILOKSI)BENZOAT TERHADAP RASIO  
LIMFOSIT-T CD3CD4 DAN CD3CD8 PADA LIMPA MENCIT  
SWISS WEBSTER METODE *FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL  
SORTING (FACS)***

**SKRIPSI**

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

**OLEH:**

**NICO JAFET**

**2443019270**

Telah disetujui pada tanggal 14 Januari 2023 dan dinyatakan LULUS

Pembimbing I,



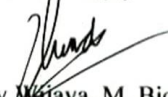
apt. Caroline, S.Si., M.Si.  
NIK. 241.00.0444

Pembimbing II,



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

Mengetahui,  
Ketua Penguji



(dr. Hendy Wijaya, M. Biomed.)  
NIK. 241.17.0973

**LEMBAR PERSETUJUAN**  
**PUBLIKASI KARYA ILMIAH**

Demi perkembangan ilmu pengetahuan, penulis menyetujui skripsi penulis, dengan judul: **Pengaruh Asam 2-(3-(klorometil)benzoioksi)benzoat terhadap Rasio Limfosit-T CD3CD4 dan CD3CD8 pada Limpa Mencit Swiss Webster Metode *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS)** untuk dipublikasikan atau ditampilkan di internet atau media lain yaitu *Digital Library* Perpustakaan Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya untuk kepentingan akademik sebatas sesuai dengan Undang-Undang Hak Cipta. Demikian pernyataan persetujuan publikasi karya ilmiah ini penulis buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 14 Januari 2023



Nico Jafet  
2443019270

Penulis menyatakan dengan sesungguhnya bahwa hasil tugas akhir ini adalah benar-benar merupakan karya penulis sendiri. Apabila di kemudian hari ditemukan bahwa skripsi ini merupakan hasil plagiarisme, maka penulis bersedia menerima sanksi berupa pembatalan kelulusan dan atau pencabutan gelar yang penulis peroleh.

Surabaya, 14 Januari 2023



Nico Jafet  
2443019270

## ABSTRAK

### PENGARUH ASAM 2-(3-(KLOROMETIL)BENZOILOKSI)BENZOAT TERHADAP RASIO LIMFOSIT-T CD3CD4 DAN CD3CD8 PADA LIMPA MENCIT SWISS WEBSTER METODE *FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL SORTING* (FACS)

NICO JAFET  
2443019270

Inflamasi merupakan sistem imunitas tubuh ketika mengalami induksi yang berbahaya seperti patogen, sel-sel rusak, ataupun senyawa beracun. Inflamasi terjadi karena terbentuknya mediator yaitu COX-2 yang dilepaskan ke matriks ekstraseluler sehingga sel-sel imunitas akan terstimulasi. OAINS memiliki mekanisme kerja yaitu dengan menghambat sintesis prostaglandin pada jalur asam arakidonat. Sel imunitas adaptif tubuh mengalami maturasi salah satunya pada organ limpa. Sel limfosit-T akan berikatan dengan reseptor  $\alpha\beta$  lalu berdiferensiasi menjadi CD4 dan CD8. Asam Asetilsalisilat (AAS) diketahui dapat meningkatkan ekspresi Foxp3 pada sel CD3<sup>pos</sup>CD4<sup>pos</sup>CD25<sup>pos</sup> dan CD3<sup>pos</sup>CD8<sup>pos</sup>CD25<sup>pos</sup> limfosit-T sehingga dapat menjadi sel T regulator (Treg) dan memiliki kemampuan dalam menekan proliferasi sel T CD4 sehingga memiliki keuntungan sebagai imunosupresan. Penelitian ini akan menggunakan hewan coba mencit *Swiss Webster* usia 12 minggu dan terbagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, AAS, 3-CH<sub>2</sub>Cl, dan Celecoxib. Hewan coba akan diinduksi inflamasi dengan senyawa Lipopolisakarida (LPS) lalu diikuti dengan pemberian senyawa uji selama 2 hari. Hasil yang didapatkan adalah pemberian asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat (3-CH<sub>2</sub>Cl) dosis 60 mg/KgBB dapat meningkatkan rasio sel limfosit-T CD3<sup>pos</sup>CD4<sup>pos</sup> dan menurunkan CD3<sup>pos</sup>CD8<sup>pos</sup> sehingga menunjukkan kemampuan serupa dengan senyawa AAS sebagai imunosupresan dengan metode *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS) setelah diinduksi lipopolisakarida.

**Kata kunci:** asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat (3-CH<sub>2</sub>Cl), *fluorescence-activated cell sorting* (FACS), inflamasi, lipopolisakarida, imunitas

## ***ABSTRACT***

### **THE EFFECT OF 2-(3-(CHLOROMETHYL)BENZOILOXY)BENZOATE ACID ON THE RATIO OF CD3CD4 AND CD3CD8 T-LYMPHOCYTES IN SWISS WEBSTER MICE'S SPLEEN WITH FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL SORTING (FACS) METHOD**

**NICO JAFET**  
**2443019270**

Inflammation is the body's immune system when subjected to harmful inductions such as pathogens, damaged cells, or toxic compounds. Inflammation occurs due to the formation of a mediator, namely COX-2 which is released into the extracellular matrix so that immune cells will be stimulated. NSAIDs have a mechanism of action, namely by inhibiting the synthesis of prostaglandins in the arachidonic acid pathway. The body's adaptive immune cells experience maturation, one of which is the spleen. T lymphocytes will bind to the receptor and then differentiate into CD4 and CD8. Acetylsalicylic Acid (ASA) is known to increase Foxp3 expression in CD3<sup>pos</sup>CD4<sup>pos</sup>CD25<sup>pos</sup> and CD3<sup>pos</sup>CD8<sup>pos</sup>CD25<sup>pos</sup> T-lymphocytes so that they can become regulatory T cells (Treg) and have the ability to suppress the proliferation of CD4 T cells so that they have the advantage of being an immunosuppressant. This study will use Swiss Webster mice aged 12 weeks and divided into 5 groups, namely negative control, positive control, ASA, 3-CH<sub>2</sub>Cl, and Celecoxib. Mice will be induced with Lipopolysaccharide compounds (LPS) then followed by administration of the test compound for 2 days. The results obtained are that the administration of 2-(3-(chloromethyl)benzoyloxy)benzoic acid (3-CH<sub>2</sub>Cl) at 60 mg/KgBW can increase the ratio of T-lymphocytes CD3<sup>pos</sup>CD4<sup>pos</sup> and decrease CD3<sup>pos</sup>CD8<sup>pos</sup> so that it shows a similar ability with ASA compounds as immunosuppressants using Fluoresce-Activated Cell Sorting (FACS) method after lipopolysaccharide induced.

**Keywords:** 2-(3-(chloromethyl)benzoyloxy)benzoic acid (3-CH<sub>2</sub>Cl), fluorescence-activated cell sorting (FACS), inflammation, lipopolysaccharide, immunity

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya, sehingga skripsi dengan judul **“Pengaruh Asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat Terhadap Rasio Limfosit-T CD3CD4 Dan CD3CD8 Pada Limpa Mencit Swiss Webster Metode *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS)”** dapat terselesaikan. Penyusunan skripsi ini dimaksudkan untuk memenuhi persyaratan 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 ingin mengucapkan rasa terima kasih sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Yudy Tjahjono, B.Sc.Biol., M.Sc.Biol. dan Ibu Catherine Caroline, S.Si., M.Si., Apt. Selaku pembimbing yang telah memberikan waktu, tenaga, petunjuk, saran, dan pemikirannya yang sangatlah berharga selama proses perancangan hingga terselesainya penyusunan naskah skripsi ini.
2. Bapak dr. Hendy Wijaya, M.Biomed. dan Ibu Dr. med. vet. drh. Hevi Wihadmadyatami, M.Sc. Selaku tim penguji yang telah memberikan waktu, petunjuk, saran, arahan, dan kritik yang sangat membantu dan bermanfaat bagi pengembangan skripsi ini.
3. Prof. Dr. dr. Jusak Nugraha, M.S., Sp.PK. Selaku penasihat dalam pembacaan dan intepretasi hasil *flow cytometer* di RSUD Dr. Soetomo Surabaya

4. Ibu Yufita Ratnasari W., S.Farm., M.Farm.Klin. Apt. Selaku penasihat akademik yang dengan sabar menuntun dan memberikan waktu, petunjuk, saran, serta arahan kepada penulis dari proses perancangan hingga penyelesaian skripsi ini.
5. Bapak Ari dan Bapak Dwi. Selaku laboran laboratorium penelitian yang telah memberikan waktu, tenaga, dan pikiran dalam pengerjaan skripsi ini di laboratorium.
6. Ibu Nita. Selaku laboran di laboratorium Litbang RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang telah membantu dan membimbing dalam pengerjaan skripsi ini dengan alat *flow cytometer*.
7. Orang tua dan keluarga besar penulis yang telah dengan sabar memberikan dukungan dan semangat agar skripsi ini dapat cepat terselesaikan dengan baik.
8. Teman-teman “Proyek pak Yudy” (Bara, Sindi, Echa, Shellin, Oryza, Karmila) yang telah bersama-sama berjuang untuk menyelesaikan proyek obesitas dan salisilat dan yang selalu memberikan semangat untuk menyelesaikan skripsi ini.
9. Teman-teman “Smartfriend” yang telah memberikan support dan doanya dalam menyelesaikan skripsi ini.
10. Teman-teman “BGM” yang telah memberikan semangat dalam menyelesaikan skripsi ini.



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, 14 Januari 2023

Nico Jafet  
2443019270

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
ABSTRAK.....	i
<i>ABSTRACT</i> .....	ii
KATA PENGANTAR .....	iii
DAFTAR ISI .....	vi
DAFTAR TABEL .....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN .....	xii
DAFTAR SINGKATAN .....	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang Penelitian .....	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 Pengertian Inflamasi.....	7
2.1.1 Induksi Inflamasi Oleh Lipopolisakarida .....	8
2.2 Obat Anti Inflamasi Non-Steroid (OAINS) .....	9
2.2.1 Senyawa Asam Asetilsalisilat (AAS).....	10
2.2.2 Senyawa Sintesis 3-CH <sub>2</sub> Cl .....	14
2.5.1 Celecoxib .....	19
2.3 Sistem Imunitas .....	21
2.3.1 Sel T-limfosit .....	21
2.4 Pemeriksaan Antibodi CD3, CD4, dan CD8 <i>Anti-Mouse</i> Menggunakan Metode <i>Flow Cytometry</i> .....	23

	<b>Halaman</b>
BAB 3. METODE PENELITIAN .....	25
3.1 Jenis Penelitian.....	25
3.2 Bahan, Alat, dan Hewan Coba Penelitian .....	25
3.2.1 Bahan Penelitian.....	25
3.2.2 Alat Penelitian.....	26
3.2.3 Hewan Coba.....	27
3.3 Metode Penelitian.....	28
3.4 Rancangan Penelitian.....	29
3.4.1 Skema Konsep Penelitian.....	29
3.5 Tahapan Penelitian.....	30
3.5.1 Prosedur Sintesis Asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat .....	31
3.5.2 Uji Kemurnian Senyawa Sintesis Asam 2-(3-( klorometil)benzoiloksi)benzoat .....	31
3.5.3 Perlakuan Hewan Coba .....	32
3.5.4 Penyiapan Larutan Stok LPS.....	33
3.5.5 Pembuatan Larutan PGA 3% .....	34
3.5.6 Pembuatan Suspensi AAS, 3-CH <sub>2</sub> Cl, dan Celecoxib .....	34
3.5.7 Pemberian Suspensi .....	34
3.5.8 Pengukuran Suhu Mencit .....	35
3.5.9 Pembuatan Larutan ACK Buffer ( <i>Ammonium-Chloride-         Potassium</i> ).....	35
3.5.10 Pembuatan PBS ( <i>Phosphate Buffer Saline</i> ).....	36
3.5.11 Prosedur Isolasi Organ Limpa (Splenektomi) .....	36
3.5.12 Prosedur Isolasi Sel Splenosit .....	37
3.5.13 Perhitungan Konsentrasi Sel .....	37
3.5.14 Pembuatan <i>Buffer</i> A, B, dan C .....	38

	<b>Halaman</b>
3.5.15	Prosedur Optimasi Antibodi.....38
3.5.16	Analisis Menggunakan <i>Flow Cytometry</i> .....39
3.6	Variabel Penelitian .....44
3.7	Analisis Statistika.....45
3.8	Hipotesis Statistika.....45
3.8.1	Hipotesis Nol ( $H_0$ ) .....45
3.8.2	Hipotesis Alternatif ( $H_A$ ).....46
<b>BAB 4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....47
4.1	Hasil .....47
4.1.1	Peningkatan Jumlah Absolut Sel pada Populasi Limfosit-T CD3 <sup>pos</sup> CD4 <sup>pos</sup> Akibat Pemberian Senyawa 3-CH <sub>2</sub> Cl pada Mencit yang Telah Diinduksi LPS .....47
4.1.2	Peningkatan Persentase Sel Limfosit-T CD3 <sup>pos</sup> CD4 <sup>pos</sup> Akibat Pemberian Senyawa 3-CH <sub>2</sub> Cl pada Mencit yang Telah Diinduksi LPS .....48
4.1.3	Penurunan Jumlah Absolut Sel pada Populasi Limfosit-T CD3 <sup>pos</sup> CD8 <sup>pos</sup> Akibat Pemberian Senyawa 3-CH <sub>2</sub> Cl pada Mencit yang Telah Diinduksi LPS .....51
4.1.4	Penurunan Persentase Sel Limfosit-T CD3 <sup>pos</sup> CD8 <sup>pos</sup> Akibat Pemberian Senyawa 3-CH <sub>2</sub> Cl pada Mencit yang Telah Diinduksi LPS .....52
4.2	Pembahasan.....54
<b>BAB 5.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....60
5.1	Kesimpulan .....60
5.2	Saran.....60
	DAFTAR PUSTAKA .....61
	LAMPIRAN .....66

## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
Tabel 3.1	Tabel perlakuan dan dosis .....33
Tabel 3.2	Tabel jenis variabel dan definisinya .....44

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
Gambar 2.1 Struktur AAS.....	10
Gambar 2.2 Mekanisme OAINS penyebab ulserasi mukosa .....	12
Gambar 2.3 Mekanisme kerja AAS sebagai imunosupresan .....	14
Gambar 2.4 Struktur 3-CH <sub>2</sub> Cl.....	14
Gambar 2.5 Struktur lapisan mukosa lambung .....	16
Gambar 2.6 Mekanisme kerja 3-CH <sub>2</sub> Cl menghambat COX-2 .....	18
Gambar 3.1 Skema konsep penelitian.....	30
Gambar 3.2 Skema kerja optimasi antibodi .....	39
Gambar 3.3 Spektrum fluoresensi.....	42
Gambar 3.4 Strategi <i>gating</i> menggunakan program <i>flowing software 2<sup>TM</sup></i> .....	44
Gambar 4.1 Diagram data dan analisis statistik jumlah absolut sel pada populasi limfosit-T CD3 <sup>pos</sup> CD4 <sup>pos</sup> setelah induksi LPS terhadap kontrol negatif. Analisis statistik menggunakan <i>Independent sample t Test</i> . .....	47
Gambar 4.2 Plot grafik representatif jumlah ekspresi sel limfosit-T CD3 <sup>pos</sup> CD4 <sup>pos</sup> terhadap keseluruhan jumlah sel limfosit-T setelah induksi LPS .....	49
Gambar 4.3 Diagram data persentase sel limfosit-T CD3 <sup>pos</sup> CD4 <sup>pos</sup> setelah induksi LPS terhadap kontrol negatif. Analisis statistik menggunakan <i>Independent sample t Test</i> . .....	49
Gambar 4.4 Diagram data dan analisis statistik jumlah absolut sel pada populasi limfosit-T CD3 <sup>pos</sup> CD4 <sup>pos</sup> setelah induksi LPS terhadap kontrol positif. Analisis statistik menggunakan <i>Independent sample t Test</i> . .....	51
Gambar 4.5 Plot grafik representatif jumlah ekspresi sel limfosit-T CD3 <sup>pos</sup> CD8 <sup>pos</sup> terhadap keseluruhan jumlah sel limfosit-T setelah induksi LPS .....	52
Gambar 4.6 Diagram data persentase sel limfosit-T CD3 <sup>pos</sup> CD8 <sup>pos</sup> setelah induksi LPS terhadap kontrol positif. Analisis statistik menggunakan <i>Independent sample t Test</i> . .....	53

Gambar 4.7. Ilustrasi penelitian pengaruh pemberian 3-CH<sub>2</sub>Cl pada sel limfosit-T CD3<sup>pos</sup>CD4<sup>pos</sup> dan CD3<sup>pos</sup>CD8<sup>pos</sup> mencit yang telah diinduksi LPS .....59

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Surat keterangan fasilitas laboratorium hewan.....	66
2. Surat keterangan kelaikan etik.....	67
3. Komposisi pakan standard Chow Diet .....	68
4. Katalog Antibodi PE Anti-Mouse CD3 .....	69
5. Katalog Antibodi PerCP/Cyanine5.5 Anti-Mouse CD4 .....	70
6. Katalog Antibodi PerCP/Cyanine5.5 Anti-Mouse CD8a .....	71
7. Protokol jumlah sampel Gpower .....	72
8. Tabel Pemantauan Suhu .....	73



## DAFTAR SINGKATAN

OAINS	: Obat Anti Inflamasi Non Steroid
AAS	: Asam Asetil Salisilat
3-CH <sub>2</sub> Cl	: Asam 2-(3-(klorometil)benzoioksi)benzoat
ACK	: Ammonium-Chloride-Potassium
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PGA	: <i>Pulvis Gummi Arabicum</i>
LPS	: Lipopolisakarida
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
COX-2	: <i>Cyclooxygenase-2</i>
PE	: <i>Phycoerythrin</i>
PerCP	: <i>Peridin Chlorophyll Protein</i>
FACS	: <i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
RA	: <i>Rheumatoid Arthritis</i>
TLR	: <i>Toll Like Receptor</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
MD	: <i>Myeloid Differentiation</i>
TNF	: Tumor Necrosis Factor
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>
NF- $\kappa$ $\beta$	: <i>nuclear factor kappa beta</i>
COX-1	: <i>Cyclooxygenase-1</i>

Foxp3	: Forkhead box P3
4-CH <sub>2</sub> Cl	: Asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat
HLA	: <i>Human Leukocyte Antigen</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
Th1	: T-Helper 1
Th2	: T-Helper 2
IACUCs	: <i>Institutional Animal Care and Use Committees</i>
AAALAC	: <i>The Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care</i>
UV	: Ultraviolet
KLT	: Kromatografi Lapis Tipis
V <sub>p</sub>	: Volume pemberian
TDS	: <i>Tandem dye system</i>
FITC	: <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
SSC	: <i>Side Scatter</i>
FSC	: <i>Forward Scatter</i>
FL	: <i>Fluorochrome</i>
ECD	: <i>Energy-coupled dye</i>
CyC	: <i>CyChrome</i>
SARS-CoV-2	: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
COVID-19	: Corona Virus Disease-19