

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pada tahun 1874, asam salisilat telah digunakan pada ramuan atau ekstrak dari tumbuhan pada daun atau kulit pohon willow, yang sukses diperkenalkan oleh Maclagan. Salicin atau asam salisilat digunakan untuk panas, nyeri, dan radang demam rematik (Maclagan, 1876). Felix Hoffman yang bekerja di Perusahaan Bayer Jerman, mengubah bentuk asetat dari asam salisilat pada tahun 1897, sehingga menghasilkan bentuk senyawa obat yang diberi nama "Aspirin" atau asam asetilsalisilat (AAS) (Dresler, 1899).

AAS dapat digunakan sebagai analgesik, antipiretik dan antitrombosit (Miner and Hoffhines, 2007). AAS merupakan Obat Anti Inflamasi Non Steroid (OAINS) yang menghambat enzim *cyclooxygenase* (COX) (Simmons *et al.*, 2004). AAS bekerja menghambat aktivitas dua jenis COX yaitu COX-1 dan COX-2. COX-1 adalah isoform yang diekspresikan tanpa induksi (konstitutif) sedangkan COX-2 adalah isoform yang diekspresikan dengan adanya induksi seperti rangsangan inflamasi, hormon, dan faktor pertumbuhan (Ricciotti and Garret, 2011). Apabila COX-1 dihambat, selain dapat berfungsi sebagai OAINS, juga memiliki efek samping yang menyebabkan iritasi pada lambung dan fungsi ginjal, serta penghambatan agregasi trombosit. Penghambatan COX-2 oleh AAS juga menguatkan efek anti-inflamasi, antipiretik dan analgesik (Vane and Botting, 2003).

AAS menghambat aktivitas COX-1 dengan asetilasi serin-530

(Roth and Philip, 1975). Serin-530 terletak pada sisi aktif COX-1 yang menghalangi substrat *arachidonic acid* (AA) ke sisi aktif (Picot *et al.*, 1994). AA tidak bisa menjadi prostaglandin H₂ (PGH₂) oleh COX-1 dan PGH₂ tidak dapat menjadi tromboksan A₂ (TXA₂) oleh tromboksan sintase. TXA₂ berperan penting pada pembentukan agregasi trombosit (Wu, 2003). Ekspresi COX-1 pada organ tubuh menghasilkan prostaglandin yang berkontribusi pada fungsi hemostasis pada organ tubuh seperti saluran pencernaan dan ginjal (Wallace, 1999) dan ekspresi COX-2 pada organ tubuh mayoritas terletak pada organ ginjal, khususnya di jaringan makula densa. Jaringan makula densa berperan penting dalam regulasi pelepasan renin, reabsorpsi pada tubulus proksimal, dan mengatur volume cairan tubuh (Dubois *et al.*, 1998).

Trombosit memiliki peran penting terhadap hemostasis dan trombosis. Ketika adanya luka pada pembuluh darah, trombosit dengan cepat menempel pada luka membentuk agregat atau penggumpalan (Rand *et al.*, 2003). Kemudian akan terbentuk trombus dari agregat-agregat trombosit dengan fibrin yang akan menyebabkan plak aterosklerotik dan akan berkembang menjadi atherothrombosis (Ruggeri, 2002).

AAS mempunyai nilai LD₅₀ oral sebesar 250mg/kgBB pada hewan tikus (Bekemeier, 1995). Pada dosis 500 mg/70KgBB (7,21 x 10⁻³ M) merupakan dosis yang umum untuk digunakan sebagai analgesik pada manusia (Kanani *et al.*, 2015). Selain memiliki manfaat terapeutik, AAS bersifat toksik yang menyebabkan tukak lambung (Hawkey and Lanas, 2001). Selain itu AAS dapat meningkatkan risiko komplikasi tukak lambung berupa perdarahan atau perforasi (Lanas and Scheiman, 2007).

Dengan mengetahui toksisitas yang tinggi pada AAS maka pengembangan obat baru yang dapat mengurangi toksisitas yaitu efek tukak

lambung perlu untuk dilakukan. Modifikasi yang telah dilakukan yaitu mereaksikan asam salisilat dengan asam 4-klorometil benzoil klorida melalui reaksi asilasi *Schotten-Baumann* menghasilkan asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi)benzoat (Martak *et al.*, 2009). Dan pada penelitian sebelumnya telah dilakukan mengenai karakteristik senyawa tersebut, antara lain: asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi) benzoat memiliki log P sebesar 3,73, lebih tinggi dari log P AAS yaitu 1,2. Maka asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat memiliki sifat lipofilik lebih besar dibandingkan dengan AAS (Martak *et al.*, 2009). Asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat telah dilakukan uji aktivitas analgesik terhadap mencit dan menunjukkan bahwa nilai ED₅₀ sebesar 11,31 mg/kg (Raniya *et al.*, 2009). Nilai ED₅₀ tersebut lebih kecil bila dibandingkan dengan harga ED₅₀ AAS yaitu sebesar 20,83 mg/kgBB (Tamayanti *et al.*, 2016). Senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat dan AAS memiliki nilai *Lethal Dose*₅₀ (LD₅₀) sebesar 2000 mg/kg BB pada mencit, sehingga senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat tidak lebih toksik daripada AAS (Tamayanti *et al.*, 2016).

Dengan melihat potensi yang dimiliki oleh senyawa asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi)benzoat memungkinkan memperoleh obat yang memiliki toksisitas yang rendah dan memiliki efek terapeutik yang sama dengan AAS yaitu sebagai antitrombosit. Dalam pengujian toksisitas subkronis pada senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat tidak memberikan pengaruh terhadap perubahan organ tikus wistar jantan bila dibandingkan dengan AAS (Woda, 2016). Namun sampai sekarang masih belum jelas, apakah asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat sebanding dengan AAS yang memiliki kemampuan dapat menurunkan agregasi trombosit.

Dalam diagnostik klinik, pemeriksaan agregasi trombosit bertujuan mendeteksi abnormalitas fungsi trombosit (Jagroop *et al.*, 2004). Pemeriksaan dapat dilakukan dengan berbagai cara seperti *Thrombocyte Aggregation Test* (TAT), uji waktu perdarahan (*Bleeding time*), dan uji *immuno-flow cytometry*. Pada pengujian ini menggunakan dua metode penelitian, yaitu secara uji waktu perdarahan (*Bleeding time*) dan uji *immuno-flow cytometry*.

Uji waktu perdarahan digunakan untuk melihat waktu pembekuan darah (Dejana *et al.*, 1979). Akan tetapi uji waktu perdarahan bukan indikator yang spesifik untuk melihat fungsi trombosit karena waktu perdarahan bukan hanya ditentukan oleh fungsi trombosit tetapi oleh faktor jaringan lokal dan komponen mekanisme koagulasi (Liebman *et al.*, 1983). Mengetahui keterbatasan dari uji tersebut maka perlu dilakukan uji lebih lanjut dengan metode yang mengacu pada agregasi trombosit yaitu dengan metode uji *immuno-flow cytometry* memungkinkan deteksi agregasi trombosit dengan volume kecil darah dan lebih sensitif terhadap agregasi trombosit (De Cuyper *et al.*, 2013).

Pada metode ini menggunakan jenis alat *flow cytometry* yang digunakan adalah BD FACSCalibur, (BD Biosciences, San Jose, CA). Pada alat FACS ini 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). Pada pengujian ini menggunakan pelabelan trombosit dengan dua zat warna berbeda menggunakan antibodi. Uji anti agregasi trombosit dilakukan dengan menggunakan kolagen sebagai stimulus karena pada uji *immuno-flow cytometry* bergantung pada fungsi integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ pada kolagen (De Cuyper *et al.*, 2013). Zat warna atau detektor molekuler yang

digunakan adalah antibodi anti-murin CD-31 dengan penanda (fluorokrom) FITC (Abcam, U.S) dan PE/Cy7(Bio Legend, San Diego, CA) yang spesifik terhadap protein CD-31 pada trombosit mencit.

Trombosit endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1) yang juga dikenal sebagai *cluster of differentiation 31* (CD31) merupakan jenis protein (Newman *et al.*, 1990). CD-31 ditemukan pada permukaan trombosit, monosit, neutrofil, beberapa jenis sel T, dan ada pada sebagian besar dari sel endotel (Albelda *et al.*,1990). Di darah, CD-31 diekspresikan secara dominan pada trombosit, sehingga dapat menjadi marker spesifik (Van Mourik *et al.*, 1985).

Berdasarkan hal tersebut di atas diperlukan suatu pengujian dengan menggunakan metode uji waktu perdarahan (*Bleeding time*) dan uji *immuno-flow cytometry* untuk mengetahui aktivitas agregasi trombosit pada senyawa uji. Sehingga diperoleh asam 2-(4-(klorometil)benzoioksi)benzoat sebagai antitrombosit dengan toksisitas yang lebih rendah dibanding AAS.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah adalah :

1. Bagaimana pengaruh senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoioksi) benzoat dibandingkan asam asetilsalisilat dengan pemberian dosis 1,3 mg/20gBB terhadap agregasi trombosit dengan metode pengujian *immuno-flow cytometry* dan uji waktu perdarahan ?
2. Bagaimana pengaruh senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoioksi) benzoat dibandingkan asam asetilsalisilat dengan pemberian dosis 1,3 mg/20gBB terhadap agregasi trombosit dengan uji waktu perdarahan ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat pada pemberian dosis 1,3 mg/20gBB terhadap agregasi trombosit dengan metode pengujian *immuno-flow cytometry*
2. Mengetahui pengaruh senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat pada pemberian dosis 1,3 mg/20gBB terhadap agregasi trombosit dengan uji waktu perdarahan.

2.4 Hipotesis Penelitian

1. Senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat pada dosis 1,3 mg/20gBB dengan metode pengujian *immuno-flow cytometry* dan uji waktu perdarahan dapat menurunkan agregasi trombosit sebanding dengan AAS.
2. Senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat pada dosis 1,3 mg/20gBB dengan uji waktu perdarahan dapat menurunkan agregasi trombosit sebanding dengan AAS.

1.5 Manfaat Penelitian

Dari hasil penelitian ini, diharapkan dapat digunakan sebagai acuan dalam mengembangkan senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat sebagai calon obat baru pengganti senyawa turunan salisilat dengan aktivitas antitrombosit dan efek samping yang minimal setelah melalui beberapa pengujian lebih lanjut yaitu uji praklinis dan klinis.