

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pada tahun 1897 Felix Hoffman dari perusahaan Bayer Jerman, mengubah asam salisilat menjadi asetat sehingga menghasilkan senyawa obat asam asetilsalisilat (AAS) yang diberi nama dagang "Aspirin" (Dresler, 1899). Vane (2003) membuktikan bahwa AAS memiliki mekanisme kerja sebagai antiinflamasi, analgesik dan antipiretik, AAS sebagai obat antiinflamasi non steroid (OAINS) menghambat aktivitas enzim siklooksigenase (COX) yang mengarah pada pembentukan prostaglandin (PG) yang menyebabkan radang, rasa nyeri dan demam (Vane, 2003). Kanani *et al.* (2015), mengemukakan bahwa dosis AAS 500 mg/KgBB merupakan dosis yang umum digunakan untuk pengobatan simptomatik rasa nyeri dan demam. Selain itu, pada dosis tersebut AAS juga memiliki kemampuan untuk menghambat aktivitas trombosit (anti-agregasi) yang suboptimal.

AAS menghambat aktivitas dua jenis COX yaitu COX-1 dan COX-2. COX-1 di dalam sel merupakan isoform yang diekspresikan tanpa induksi (konstitutif) dan berfungsi untuk menjaga hemostasis sel dalam suatu jaringan, sedangkan COX-2 merupakan isoform yang diekspresikan dengan adanya induksi yang memicu respons inflamasi, sekresi hormon dan faktor pertumbuhan (Ricciotti *et al.*, 2011). Inhibisi terhadap COX-1 selain bertindak sebagai antiinflamasi (OAINS), juga menyebabkan induksi tukak lambung dan gangguan fungsi ginjal, selain itu juga menyebabkan penghambatan agregasi trombosit. Inhibisi COX-2 bertindak sebagai antiinflamasi, antipiretik dan analgesik (Vane, 2003). Selain sebagai OAINS, AAS digunakan sebagai obat yang menghambat aktivasi trombosit

pada manusia dengan cara menghambat COX-1 pada trombosit, sehingga mengurangi produksi aktivator trombosit tromboxan A₂ (TXA₂) (Warner *et al.*, 2011). Namun efek samping dari AAS pada penggunaan jangka panjang adalah pendarahan pada gastrointestinal (Huang *et al.*, 2011) dan disertai anemia sekunder karena pendarahan pada saluran pencernaan (Kimberly and Plotz, 1989).

Trombosit merupakan salah satu komponen di dalam darah yang memiliki peranan penting dalam hemostatis. Trombosit akan membentuk agregasi atau menggumpal saat terjadi luka pada pembuluh darah. Sumbatan atau agregat tersebut terbentuk dari agregat-agregat trombosit atau disebut trombus. Agregasi trombosit memegang peranan penting dalam patogenesis trombotik akut pada penyakit jantung koroner, stroke, dan penyakit arteri perifer (Jagroop *et al.*, 2004; O'Donnell *et al.*, 2001), sehingga selain sebagai OAINS obat antitrombotik juga digunakan untuk mencegah komplikasi pada pembuluh darah.

Obat analgesik-antipiretik sekaligus sebagai antitrombotik pengganti AAS dan tidak menimbulkan efek samping seperti pendarahan pada gastrointestinal (Huang *et al.*, 2011), maka perlu dilakukan sintesis dan pengujian terhadap senyawa baru turunan AAS, yaitu asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat. Asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat merupakan modifikasi struktur asam salisilat dengan gugus asam 3-klorobenzoiloksi klorida melalui sintesis dengan reaksi *Schotten-Boumann* (Novitasari, 2007). Pada penelitian sebelumnya senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat telah diuji aktivitas analgesik pada mencit, dan diperoleh harga (*Effective Dose 50% of Respons*) ED₅₀ sebesar 20,09 mg/kgBB sedangkan harga ED₅₀ dari asam asetilsalisilat adalah 34,89 mg/kgB sehingga diketahui bahwa aktivitas analgesik dari asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat lebih tinggi dibandingkan dengan asam

asetilsalisilat (Novitasari, 2007). Pada pengujian toksisitas subkronis senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat tidak memberikan pengaruh terhadap perubahan organ tikus wistar jantan bila dibandingkan dengan asam asetilsalisilat (Sinaga, 2016), namun sampai sekarang ini masih belum jelas, apakah senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat sebanding dengan AAS yang memiliki kemampuan sebagai anti-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, dan *flow cytometry*.

Metode *Thrombocyte Aggregation Test* (TAT) merupakan metode yang paling sering digunakan di laboratorium klinik untuk pemeriksaan agregasi trombosit (Born, 1962), akan tetapi metode TAT memerlukan sampel dengan volume yang signifikan untuk dapat diuji (De Cuyper *et al.*, 2013). Uji waktu perdarahan merupakan metode sederhana untuk uji hemostasis primer secara *in vivo*, salah satu parameter yang digunakan adalah waktu perdarahan (Dejana *et al.*, 1979). Kekurangan dari uji perdarahan adalah parameter waktu perdarahan bukan hanya ditentukan oleh fungsi trombosit tetapi dapat dipengaruhi oleh faktor koagulasi dan komponen seluler pembuluh darah (Liebman *et al.*, 1983). Metode ini selain lebih ekonomis juga lebih mudah dilakukan. Pada uji *flow cytometry* merupakan metode modern yang menggunakan sampel dengan volume dan jumlah sel yang kecil (De Cuyper *et al.*, 2013). Kekurangan dari metode ini lebih mahal dibandingkan dengan dua metode di atas karena menggunakan penambahan penanda (fluorokrom) yaitu antibodi. Prinsip kerja *flow cytometry* berdasarkan perubahan transmisi cahaya (Penz *et al.*, 2010), menggunakan aliran sel secara otomatis yang dilewatkan pada suatu

detektor yang disambungkan dengan *software* untuk menganalisis sinyal dari aliran droplet yang ditembak dengan sinar laser selanjutnya sinar diteruskan dan ditangkap oleh detektor sehingga sel dapat dianalisis, dipisahkan, dan disimpan sebagai data. Visualisasi data memerlukan molekul penanda spesifik antara antibodi-trombosit dengan penambahan penanda (fluorokrom). Pada uji *flow cytometry* agonis yang digunakan yaitu kolagen yang merupakan induktor kuat untuk merangsang agregasi trombosit (Jennings, 2009), selain itu detektor molekuler yang digunakan adalah antibodi anti-murin CD-31 dengan penambahan penanda (fluorokrom) FITC (FITC-anti-mouse-CD31, BioLegend®, San Diego, CA) dan PE/CY7 (PE/CY7-anti-mouse-CD31, Abcam, Pittsburgh, USA) yang spesifik terhadap protein CD-31 pada trombosit mencit dihasilkan dari tikus yang diimunisasi dengan sel tikus 32D pada sel leukosit dan diseleksi melawan muPECAM- 1 Δ 12,15 (Baldwin *et al.*, 1994). Protein CD31 juga dikenal sebagai molekul adhesi sel trombosit-endothel (PECAM-1) yang diekspresikan pada permukaan trombosit, monosit, neutrofil, dan beberapa jenis sel T, dan sebagian besar pada sel endotel pada manusia. Pada darah, CD-31 diekspresikan secara dominan pada trombosit, sehingga dapat menjadi marker spesifik (Kiernan *et al.*, 1985). Alat *flow cytometry* yang digunakan dalam penelitian ini adalah BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA).

Berdasarkan penjelasan di atas peneliti akan melakukan uji pada senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat dengan dua metode yaitu uji waktu perdarahan dan *flow cytometry* yang dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr.Soetomo Surabaya untuk menyelidiki apakah senyawa tersebut juga memiliki aktivitas antitrombosit. Dosis yang digunakan adalah 500 mg/KgBB ($7,21 \times 10^{-3}$ molar), analog dengan dosis AAS sebagai OAINS (500 mg/KgBB atau $7,21 \times 10^{-3}$ molar).

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat terhadap agregasi trombosit setelah pemberian dosis 500 mg/KgBB ($7,21 \times 10^{-3}$ molar) dibandingkan dengan senyawa asam asetilsalisilat pada mencit dengan metode uji *flow cytometry*?
2. Bagaimana pengaruh senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat terhadap agregasi trombosit setelah pemberian dosis 500 mg/KgBB ($7,21 \times 10^{-3}$ molar) dibandingkan dengan senyawa asam asetilsalisilat pada mencit dengan metode uji waktu Perdarahan?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Menganalisis pengaruh senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat pada agregasi trombosit setelah pemberian dosis 500 mg/KgBB ($7,21 \times 10^{-3}$ molar) dalam pengujian *flow cytometry*.
2. Menganalisis pengaruh senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat pada agregasi trombosit setelah pemberian dosis 500 mg/KgBB ($7,21 \times 10^{-3}$ molar) dalam uji waktu Perdarahan.

1.4 Hipotesis Penelitian

1. Senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat mampu menurunkan agregasi trombosit setelah pemberian dosis 500 mg/KgBB ($7,21 \times 10^{-3}$ molar) dibandingkan dengan senyawa asam asetilsalisilat pada mencit dengan metode uji *flow cytometry*.
2. Senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat dapat menurunkan agregasi trombosit setelah pemberian dosis 500 mg/KgBB ($7,21 \times$

10^{-3} molar) dibandingkan dengan senyawa asam asetilsalisilat pada mencit dengan metode uji waktu Perdarahan.

1.5 Manfaat Penelitian

Dari hasil penelitian ini, diharapkan dapat digunakan sebagai acuan dalam mengembangkan senyawa asam 2-(3-klorobenzoiloksi)benzoat sebagai obat analgesik-antipiretik sekaligus sebagai antitrombosit pengganti AAS melalui beberapa pengujian lebih lanjut yaitu uji praklinis dan klinis.