

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Asam Asetilsalisilat (AAS) merupakan turunan dari asam salisilat yang ditemukan dari ekstraksi kulit pohon Willow Bark (Miller *et al.*, 1978). AAS diperoleh dengan mereaksikan asam 2-hidroksibenzoat dengan anhidrida asetat (Martak *et al.*, 2009). Obat ini dapat digunakan peroral pada pengobatan analgesik-antipiretik (Martak *et al.*, 2009). AAS mempunyai nilai LD50 oral sebesar 250mg/kgBB pada hewan tikus. Selain berfungsi sebagai obat analgesik-antipiretik AAS juga dapat digunakan sebagai anti agregasi trombosit dengan dosis 81-325 mg per hari (Carlo *et al.*, 2004). Pada tahun 2003 Vane menjelaskan mekanisme kerja AAS sebagai antiinflamasi, analgesik dan antipiretik (NSAID). Vane membuktikan bahwa AAS dan obat antiinflamasi non steroid lainnya (NSAIDs) menghambat aktivitas enzim siklooksigenase (COX) yang dapat mengurangi peradangan, rasa nyeri dan demam (Vane, 2003). AAS bekerja menghambat aktivitas dua jenis enzim siklooksigenase (COX) yaitu COX-1 dan COX-2.

COX-1 adalah isoform yang diekspresikan tanpa induksi (konstitutif) sedangkan COX-2 adalah isoform dengan adanya induksi seperti rangsangan inflamasi, hormon, dan faktor pertumbuhan (Ricciotti *et al.*, 2011). Ekspresi COX-1 mayoritas terletak pada lambung dan COX-2 di organ terletak pada ginjal dan otak. Apabila COX-1 dihambat menyebabkan iritasi pada lapisan lambung dan fungsi ginjal, tetapi juga menyebabkan penghambatan agregasi trombosit. Penghambatan COX-2 bertindak sebagai anti-inflamasi, antipiretik dan analgesik (Vane, 2003). Sebagai inhibitor agregasi trombosit, AAS bekerja dengan cara mengurangi produksi tromboksan A2 (TXA2)

(Warner *et al.*, 2011). 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. Sumbat atau agregat tersebut terbentuk dari agregat-agregat trombosit atau disebut trombus. Agregasi trombosit memegang peranan penting dalam patogenesis trombosis akut pada penyakit jantung koroner, stroke, dan penyakit arteri perifer (Jagroop *et al.*, 2007).

Berdasarkan penelitian Kanani *et al.*, (2015) AAS dengan dosis minimal 500mg/70KgBB digunakan sebagai analgesik. Efek samping dari AAS yang sering terjadi adalah induksi tukak lambung atau tukak peptik yang kadang-kadang disertai anemia sekunder karena perdarahan pada saluran pencernaan (Kimberly *et al.*, 1989). Untuk memperoleh obat analgesik-antipiretik sekaligus sebagai anti agregasi trombosit pengganti AAS dan tidak menimbulkan efek samping seperti tukak lambung, maka perlu dilakukan serangkaian uji agregasi trombosit menggunakan senyawa asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat atau 3KM.

Pengujian aktivitas analgesik senyawa asam 3KM oleh Pratiwi (2009) dengan cara pemaparan senyawa uji tersebut terhadap hewan uji mencit. Penelitian ini menunjukkan dosis efektif terhadap aktivitas analgesik, yang selanjutnya disingkat ED(50)*aktivitas analgesik*. Hasil penelitian menunjukkan ED(50) senyawa asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat sebesar 14,05mg/kgBB dimana lebih kecil dibandingkan dengan nilai ED(50) asam asetilsalisilat yaitu 20,83mg/kgBB. Berdasarkan data tersebut senyawa asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat lebih aktif dan berpotensi sebagai analgesik, dibandingkan dengan senyawa asam asetilsalisilat.

Pradipta (2016) dan Tulasi (2017) melakukan penelitian tentang uji toksisitas subkronis dengan senyawa uji asam 2-(3-(klorometil)benzoioksi)benzoat terhadap tikus wistar jantan dan betina dengan parameter uji aktivitas dan indeks organ. Pada parameter uji aktivitas menunjukkan bahwa senyawa asam 2-(3-(klorometil)benzoioksi)benzoat yang dipaparkan kepada tikus jantan dengan dosis 45 mg/kgBB dan 90 mg/kgBB tidak memberikan efek toksik, efek sedasi, efek relaksasi pada otot, serta tidak memberikan pengaruh terhadap saraf otonom. Pengujian aktivitas yang dilakukan oleh Pradipta (2016) menunjukkan bahwa senyawa asam 2-(3-(klorometil)benzoioksi)benzoat mempunyai efek sebagai obat analgesik.

Dalam diagnostik klinik, pemeriksaan agregasi trombosit bertujuan mendeteksi abnormalitas fungsi trombosit (Jagroop *et al.*, 2007). Pemeriksaan dapat dilakukan dengan berbagai cara seperti *Thrombocyte Aggregation Test* (TAT), Uji waktu perdarahan, dan *flow cytometry*. Uji waktu perdarahan dilakukan untuk melihat kemampuan fisiologis pembekuan darah (Kung *et al.*, 1998). Uji waktu perdarahan merupakan metode yang mudah dilakukan untuk uji hemostasis primer secara *in vivo*, parameter fungsi trombosit dan uji untuk mempelajari efek secara *in vivo* pada senyawa yang mengganggu adhesi dan agregasi trombosit (Praga *et al.*, 1972). Hasil yang diperoleh waktu pembentukan trombus dan waktu perdarahan (Soni *et al.*, 2014). Kelebihan dari metode ini selain lebih ekonomis juga lebih mudah di lakukan, namun kekurangannya yaitu banyaknya faktor pengendali (waktu perdarahan, standar deviasi, berat hewan coba, kecepatan agregasi, dll) dan kurangnya tingkat ketelitian.

Thrombocyte Aggregation Test (TAT) metode yang dikenal sejak tahun 1962 oleh Born 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).

Flow cytometry merupakan metode modern yang digunakan untuk mendeteksi dan melihat aktivitas agregasi trombosit dengan prinsip kerja berdasarkan perubahan transmisi cahaya (Penz *et al.*, 2010). Pada uji agregasi trombosit agonis yang digunakan yaitu kolagen, selain itu detektor molekuler yang digunakan adalah antibodi anti-murin CD-31 dengan penambahan penanda (fluorokrom) FITC (FITC-anti-murin-CD-31, BioLegend Inc, San Diego, USA) dan PE/CY7 (PE/CY7-anti-murin-CD-31, abcam, Pittsburgh, USA) yang spesifik terhadap protein CD-31 pada trombosit mencit. Protein CD-31 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 trombosit dan endotel manusia (Newman *et al.*, 1990). Rat anti murine CD-31 klon 390 dihasilkan pada tikus setelah di imunisasi dengan sel tikus 32D pada sel leukosit dan diseleksi melawan muPECAM-1 $\Delta 12,15$ (Edelman *et al.*, unpublished). *Flow cytometry* adalah alat yang dapat mendeteksi dua jenis fluorokrom berbeda. Keuntungan dari metode *flow cytometry* yaitu waktu yang dibutuhkan untuk analisis sangat singkat, hasil yang didapat juga cepat, dapat memproses hingga 100.000 partikel per detik, dapat memisahkan partikel tunggal dari campuran populasi, dan adanya komputer yang modern dapat melakukan analisis multiparameter (Robinson, 2006).

Berdasarkan penjelasan di atas diperlukan suatu eksperimen uji diagnostik untuk menguji senyawa asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat dosis 1,3mg/20gBB ($7,21 \times 10^{-3}$ molar) pada hewan coba mencit dengan

menggunakan metode uji waktu perdarahan dan *flow cytometry*. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan hasil positif terhadap senyawa uji asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat yang dapat menghambat agregasi trombosit, sehingga dapat dijadikan sebagai alternatif pengganti AAS.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh pemberian senyawa asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat dosis 1,3mg/20gBB ($7,21 \times 10^{-3}$ molar) terhadap pengujian perdarahan terhadap waktu dan jumlah volume perdarahan mencit jantan (*Mus musculus*)?
2. Bagaimana pengaruh pemberian senyawa asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat dosis 1,3mg/20gBB ($7,21 \times 10^{-3}$ molar) terhadap pengujian *flow cytometry* menggunakan antibodi spesifik dan agonis kolagen pada mencit jantan (*Mus musculus*)?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Menganalisis pengaruh pemberian senyawa asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat dosis 1,3mg/20gBB ($7,21 \times 10^{-3}$ molar) meliputi waktu dan volume perdarahan pada mencit jantan (*Mus musculus*).
2. Menganalisis pengaruh pemberian senyawa asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat dosis 1,3mg/20gBB ($7,21 \times 10^{-3}$ molar) dengan metode *flow cytometry* menggunakan antibodi spesifik dan agonis kolagen pada mencit jantan (*Mus musculus*).

1.4 Hipotesa Penelitian

1. Senyawa asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat dosis 1,3mg/20gBB ($7,21 \times 10^{-3}$ molar) terhadap pengujian perdarahan memberikan hasil signifikan terhadap waktu dan jumlah volume perdarahan mencit jantan (*Mus musculus*).
2. Senyawa asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat dosis 1,3mg/20gBB ($7,21 \times 10^{-3}$ molar) terhadap pengujian *flow cytometry* mempunyai pengaruh terhadap agregasi trombosit menggunakan antibodi spesifik dan agonis kolagen pada mencit jantan (*Mus musculus*).

1.5 Manfaat Penelitian

Data hasil penelitian ini, diharapkan dapat digunakan sebagai referensi ilmiah untuk mengembangkan senyawa asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat, sebagai calon obat baru pengganti senyawa turunan salisilat selain aktivitas analgesik juga efek agregasi anti trombosit dan efek samping obat dan toksisitas yang minimal.