

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Asam asetilsalisilat (AAS) atau yang biasa disebut aspirin merupakan obat yang sering digunakan masyarakat secara per oral. AAS diperoleh dengan mereaksikan asam 2-hidroksi benzoat dengan anhidrida asetat yang menghasilkan asam asetilsalisilat dan asam asetat yang disebut dengan reaksi anhidrida asam (Forsythe, 1991). AAS mempunyai nilai LD50 oral sebesar 250mg/kgBB pada hewan tikus. AAS selain berfungsi sebagai analgesik, antipiretik, dan antiinflamasi dapat berfungsi sebagai anti agregasi trombosit dengan dosis 81-325 mg per hari (Carlo *et al.*, 2004). Pada tahun 2003, Vane membuktikan bahwa 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).

AAS bekerja menghambat aktivitas dua jenis enzim siklooksigenase (COX) yaitu COX-1 dan COX-2. COX-1 merupakan isoform yang diekspresikan tanpa induksi (konstitutif) dan berfungsi untuk menjaga hemostasis sel dalam suatu jaringan, sedangkan COX-2 merupakan 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 terletak pada ginjal dan otak. Pada inhibisi COX-1 dapat berfungsi sebagai penghambatan agregasi trombosit, tetapi juga menyebabkan iritasi pada lapisan lambung dan fungsi ginjal. Inhibisi COX-2 bertindak sebagai anti inflamasi, antipiretik dan analgesik (Vane, 2003). AAS juga merupakan obat yang dapat menghambat agregasi trombosit pada

manusia dengan cara pengurangan produksi tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (Warner *et al.*, 2011).

Trombosit memiliki peran penting dalam hemostasis dan trombotik. Trombosit adalah sel darah yang terbentuk dari sitoplasma megakariosit. Megakariosit berasal dari megakarioblas yang merupakan hasil diferensiasi dari sel induk hematopoietik (Bluteau *et al.*, 2009). 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 peran penting dalam patogenesis trombotik akut pada penyakit jantung koroner, stroke, dan penyakit arteri perifer (Jagroop *et al.*, 2007).

Pada umumnya, dosis aspirin yang sering digunakan 500 mg/70 kgBB, karena dosis AAS yang umum digunakan untuk gejala pengobatan rasa sakit, demam dan flu biasa serta efektif adalah aspirin dengan dosis oral 500 mg (Kanani *et al.*, 2015). Selain itu AAS dapat menyebabkan meningkatkan resiko komplikasi tukak lambung berupa pendarahan atau perforasi (Lanas, 2007). Untuk mengetahui efek toksisitas yang tinggi pada aspirin maka dilakukan pengembangan obat baru untuk mengurangi toksisitas pada efek samping tukak lambung. Modifikasi yang telah dilakukan yaitu mereaksikan asam salisilat dengan asam 4-klorometil benzoil klorida melalui reaksi asilasi Schotten-Baumann menghasilkan senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat. Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan mengenai karakteristik senyawa tersebut, antara lain senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat memiliki log P sebesar 3,73 lebih tinggi dari log P AAS yaitu 1,2 maka senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat memiliki sifat lipofilik lebih besar dibandingkan dengan AAS (Martak, 2009).

Pada senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat dapat

dilihat bahwa senyawa tersebut memiliki potensi untuk memperoleh obat yang memiliki toksisitas yang rendah dan memiliki efek terapeutik yang sama dibandingkan dengan AAS yaitu dapat menurunkan agregasi trombosit atau antitrombosit. Dalam pengujian toksisitas subkronis senyawa asam 2-(4-klorometilbenzoiloksi)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-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoate sebanding dengan AAS yang memiliki kemampuan sebagai anti agregasi trombosit.

Pemeriksaan agregasi trombosit dapat dilakukan dengan berbagai cara seperti *Thrombocyte Aggregation Test* (TAT), Uji waktu pendarahan, dan *Immuno Flow-Cytometry*. Pada pengujian ini menggunakan dua metode penelitian, yaitu secara *ImmunoFlow cytometry* dan *Thrombocyte Aggregation Test*(TAT). Pada pengujian agregasi trombosit (TAT) menggunakan *Aggregation Remote Analyzer Module* (Aggram) (Helena Laboratories, Beaumont Texas, USA) menggunakan agonis kolagen yang spesifik untuk ditambahkan pada plasma manusia. Agonis kolagen berfungsi sebagai aktivator pada agregasi trombosit. Uji TAT akan dilakukan di Laboratorium Gleanegles Surabaya menggunakan *Trombosit Rich Plasma* (PRP) yang diletakan pada kuvet yang diberi *magnetic stirrer* sebagai pengaduk lalu kuvet tersebut diletakan antara sumber cahaya dan fotosel. Bila mengabsorpsi sedikit cahaya, maka transmisi cahaya akan meningkat dan hal ini terdeteksi oleh foto sel dan terekam dalam satuan waktu. Pemeriksaan agregasi trombosit sendiri bertujuan untuk mendeteksi abnormalitas fungsi dalam trombosit (Jagroop *et al.*, 2007), selain itu pemeriksaan agregasi trombosit juga dapat digunakan untuk

mengidentifikasi beberapa kelainan seperti *Glanzmann's* (afibrinogenaemia) dan *bernard-Soulier Syndrome* (*Von Willebrand Disease*) (Born, 1962).

*Immuno-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). Suspensi 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). Uji anti agregasi trombosit dilakukan dengan menggunakan kolagen sebagai stimulus karena pada uji *immuno-flow cytometry* kolagen merupakan substrat yang efisien pada adhesi trombosit dan pertumbuhan trombus. Kolagen mendorong aktivasi trombosit melalui reseptor GPIB/V/IX dan integrin  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 (Jackson *et al.*, 2003). Aktivasi integrin yang diinduksi agonis penting untuk pengikat fibrinogen sebagai penghubung antar trombosit yang berdekatan (Jackson, 2007). Detektor molekuler yang digunakan adalah antibodi *monoclonal anti human* GP IIIa klon AP-3 (Sintesis Petter Newman, Grune & Stratton, Inc, USA) dengan penanda alexa flour 488 *murin anti human* Fc IgG<sub>1</sub> dan PE F(ab')<sub>1</sub>- Goat *anti-mouse* igG (H+L) (Thermofisher, Scotland, UK) yang spesifik terhadap protein AP-3 pada trombosit manusia. Antibodi *anti human* AP-3 mengenali kompleks GPIIb/IIIa yang bergantung pada Ca<sup>2+</sup> dan memiliki massa sebesar 90 kDa. Pada antibodi AP-3 GPIIIa merupakan epitop yang dapat memperkaya trombosit dalam GpP IIB/IIIa (Newman *et al.*, 1983).

Pada pemeriksaan *Immuno-flowcytometry* jenis alat yang digunakan adalah BD FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, USA) milik Instalasi Patologi KlinikRSUD dr.Soetomo Surabaya yang dapat mendeteksi dua jenis fluorokrom berbeda. Keuntungan dari metode *Immuno-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 penelitian diatas akan melakukan eksperimen uji diagnostik untuk meguji senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoate dengan konsentrasi 277  $\mu\text{mol}$  pada plasma manusiadengan menggunakan metode *Thrombocyte Aggregation Test* (TAT) dan *Immuno-flowcytometry*. Pada penelitian ini diharapkan senyawa uji asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat dapat menghambat agregasi trombosit, sehingga dapat berpotensi memiliki aktivitas dengan mekanisme yang sama dengan AAS.

## **1.2 Rumusan Masalah**

1. Bagaimana pengaruh senyawa asam 2-(4-klorometilbenzoiloksi)benzoate dengan pemberian konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$  (277  $\mu\text{M}$ ) dibandingkan dengan senyawa AAS pada plasma manusia dengan metode uji *Thrombocyte Aggregation Test* (TAT).
2. Bagaimana pengaruh senyawa asam 2-(4-klorometilbenzoiloksi)benzoate dengan pemberian konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$  (277  $\mu\text{M}$ ) dibandingkan dengan senyawa AAS pada plasma manusia dengan metode uji *immuno-flow cytometry*.

## **1.3 Tujuan Penelitian**

1. Menganalisis pengaruh senyawa asam 2-(4-klorometilbenzoiloksi)benzoate dengan pemberian konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$  (277  $\mu\text{M}$ ) dibandingkan dengan senyawa AAS pada plasma manusia dengan metode uji *Thrombocyte Aggregation Test* (TAT).

2. Menganalisis pengaruh senyawa asam 2-(4-klorometilbenzoiloksi)benzoate dengan pemberian konsentrasi  $50\mu\text{g/ml}$  ( $277\ \mu\text{M}$ ) dibandingkan dengan senyawa AAS pada plasma manusia dengan metode uji *immuno-flow cytometry*.

#### **1.4 Hipotesis Penelitian**

1. Senyawa asam 2-(4-klorometilbenzoiloksi)benzoate menurunkan agregasi trombosit setelah pemberian konsentrasi  $50\mu\text{g/ml}$  ( $277\ \mu\text{M}$ ) dibandingkan dengan senyawa AAS pada plasma manusia dengan metode uji *Thrombocyte Aggregation Test* (TAT).
2. Senyawa asam 2-(4-klorometilbenzoiloksi)benzoate menurunkan agregasi trombosit setelah pemberian konsentrasi  $50\mu\text{g/ml}$  ( $277\ \mu\text{M}$ ) dibandingkan dengan senyawa AAS pada plasma manusia dengan metode uji *immuno-flow cytometry*.

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

Dari hasil penelitian ini, diharapkan dapat digunakan sebagai acuan dalam mengembangkan senyawa asam 2-(4-klorometilbenzoiloksi)benzoat sebagai obat analgesik-antipiretik sekaligus sebagai antitrombosit pengganti AAS melalui beberapa pengujian lebih lanjut yaitu uji praklinis dan klinis.