

# Uji Efektivitas Kombinasi Ekstrak Kulit Kayu Manis (*Cinnamomum Verum J. Presl*) dan Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria Macrocarpa (Scheff.) Boerl.*) terhadap Penurunan Kadar Kolesterol Total dan LDL pada Tikus Putih Jantan yang Diinduksi Aloksan dan Pakan Hiperkolesterol

Hadi Sunaryo<sup>1</sup>, Dwitianti<sup>1</sup>, Cipto Suriantika<sup>1</sup>

**ABSTRACT:** Insulin deficiency caused increasing of lipid in diabetic. It happens because of the disruption of insulin function as a result complications of high blood fat levels, especially cholesterol and triglycerides. This research was conduct to determine effect of the combination of *Cinnamomum verum* extract (KM) and *Phaleria macrocarpa* extract (MD) on decreasing of total cholesterol and LDL in rat. The research divided into 8 treatment groups those are normal, negative, positive, dose combination 1 (KM 300 mg/kg BB+MD 1000 mg/kg BB), dose combination 2 (KM 300 mg/kg BB+MD 500 mg/kg BB), dose combination 3 (KM 300 mg/kg BB+MD 250 mg/kg BB), dose combination 4 (MD 1000 mg/kg BB+KM 150 mg/kg BB), dose combination 5 (MD 1000 mg/kg BB+KM 75 mg/kg BB). Tukey test results showed a decrease in the optimal combination 4 with a percentage decrease in total cholesterol and LDL by 42.83% and 35.01% but the decline is not comparable to the positive control (atorvastatin) amounted to 47.13% and 47.15%.

**Keywords:** Aloksan, total cholesterol, LDL, *Cinnamomum verum*, *Phaleria macrocarpa*.

**ABSTRAK:** Defisiensi insulin menyebabkan terjadinya peningkatan lipid pada penderita diabetes. Hal ini terjadi karena terganggunya fungsi insulin akibat komplikasi kadar lemak darah yang tinggi, khususnya kolesterol dan trigliserida. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas kombinasi ekstrak kulit kayu manis (KM) dan daging buah mahkota dewa (MD) terhadap penurunan kadar kolesterol total dan LDL pada tikus. Penelitian ini menggunakan 8 kelompok yaitu normal, negatif, positif, dosis kombinasi 1 (KM 300 mg/kg BB+D 1000 mg/kg BB), dosis kombinasi 2 (KM 300 mg/kg BB+MD 500 mg/kg BB), dosis kombinasi 3 (KM 300 mg/kg BB+MD 250 mg/kg BB), dosis kombinasi 4 (MD 1000 mg/kg BB+KM 150 mg/kg BB), dan dosis kombinasi 5 (MD 1000 mg/kg BB+KM 75 mg/kg BB). Hasil uji Tukey menunjukkan penurunan optimal terdapat pada kombinasi 4 dengan persentase penurunan kolesterol total sebesar 42,83% dan LDL sebesar 35,01% meskipun penurunannya belum sebanding dengan kontrol positif (atorvastatin) sebesar 47,13% dan 47,15%.

<sup>1</sup> Fakultas Farmasi dan Sains,  
Universitas Muhammadiyah  
Prof. DR. HAMKA, Jakarta

---

**Korespodensi :**

Hadi Sunaryo  
e-mail : [hadi\\_sunaryo@uhamka.ac.id](mailto:hadi_sunaryo@uhamka.ac.id)

**Kata kunci:** Aloksan, kolesterol total, LDL, kayu manis, mahkota dewa.

## PENDAHULUAN

Diabetes Millitus (DM) adalah suatu penyakit gangguan metabolisme karbohidrat, protein dan lemak. Semua hal di atas merupakan hasil dari defect sekresi insulin dan berkurangnya sensitivitas jaringan terhadap insulin atau keduanya(1). Saat insulin berkurang, tubuh mendapatkan energi dengan melakukan pemecahan lemak melalui mekanisme lipolisis, sehingga menyebabkan kadar lemak darah meningkat terutama kolesterol dan trigliserida(2).

Kolesterol adalah sterol yang sangat penting secara biologis dalam pembentukan membran sel dan prekursor hormon steroid serta garam-garam empedu yang digunakan untuk menyerap lemak(3). Peningkatan kadar kolesterol dalam darah disebabkan adanya gangguan metabolisme lemak dalam tubuh(4). Diketuinya faktor resiko ini telah terjadi dorongan perkembangan obat-obatan penurun kadar kolesterol, salah satu alternatifnya dengan menggunakan bahan alam(5).

Bahan alam yang dimanfaatkan sebagai penurun kadar kolesterol darah salah satunya yaitu kulit kayu manis (*Cinnamomum verum*) dan daging buah mahkota dewa (*Phaleria ma crocarpa*). Hasil penelitian sebelumnya menjelaskan bahwa ekstrak kulit kayu manis (KM) dosis 300 mg/kg BB selama 14 hari pada tikus diabetes dapat menurunkan kadar kolesterol sebesar 80,42%(6). Tumbuhan lainnya yaitu mahkota dewa (MD) dari hasil penelitian sebelumnya menjelaskan bahwa 1 mL infusa yang mengandung 194 mg MD mampu mencegah peningkatan kolesterol darah pada tikus putih jantan yang diberi diet lemak tinggi, dimana peningkatan kolesterol selama 14 hari pada tikus yang diberikan infusa MD sebesar 14,98% dibandingkan dengan tikus tanpa diberikan infusa MD peningkatan kadar kolesterolnya sebesar 58,22%(7).

Berdasarkan latar belakang tersebut dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efektivitas kombinasi dari kedua

ekstrak tersebut. Penelitian ini dilakukan dengan mengkombinasikan ekstrak etanol 70% kulit KM dan daging buah MD terhadap penurunan kadar kolesterol total dan LDL pada tikus putih jantan yang diinduksi aloksan dan pakan hiperkolesterol. Tujuan dilakukan kombinasi dari ekstrak KM dan MD untuk melihat efek yang dihasilkan apakah sinergis atau antagonis dalam menurunkan kadar kolesterol total dan LDL.

## METODE PENELITIAN

### Alat

Peralatan yang dibutuhkan adalah spektrofotometer klinikal varta, vortex mixer, Moisture Balance, centrifuge, mikropipet, seperangkat alat rotary evaporator, pisau/silet dan alat-alat gelas yang lazim digunakan di dalam laboratorium.

### Bahan

Bahan yang dibutuhkan adalah simplisia kulit kayu manis, simplisia daging buah mahkota dewa, etanol 70%, kit perekasi (Human), Na-CMC, aloksan monohidrat, tablet atorvastatin, NaCl 0,9%, pakan standar, pakan hiperkolesterol.

## Penetapan Dosis

### 1. Dosis Kayu Manis

Dari hasil penelitian sebelumnya ekstrak kayu manis dengan dosis 300 mg/kg BB selama 14 hari pada tikus diabetes dapat menurunkan kadar glukosa darah sebesar 12,25% dan kadar kolesterol sebesar 80,42%(6). Dosis yang digunakan pada penelitian ini menggunakan tiga variasi dosis: Dosis I: 300 mg/kg BB, Dosis II: 150 mg/kg BB, Dosis III: 75 mg/kg BB.

### 2. Dosis Mahkota Dewa

Dari hasil penelitian sebelumnya ekstrak metanol buah mahkota dewa dosis 1 g/kg BB selama 12 hari pada tikus diabetes dapat menurunkan kadar gula darah sebesar 58,33% (Rabyah et al. 2012). Dosis yang digunakan pada

penelitian ini menggunakan tiga variasi dosis: Dosis I: 1000 mg/kg BB, Dosis II: 500 mg/kg BB, Dosis III: 250 mg/kg BB.

### 3. Dosis Kombinasi Ekstrak

Dosis kombinasi yang digunakan yaitu, Kombinasi 1: (KM 300 mg/kg BB + MD 1000 mg/kg BB), Kombinasi 2: (KM 300 mg/kg BB + MD 500 mg/kg BB), Kombinasi 3: (KM 300 mg/kg BB + MD 250 mg/kg BB), Kombinasi 4: (MD 1000 mg/kg BB + KM 150 mg/kg BB), Kombinasi 5: (MD 1000 mg/kg BB + KM 75 mg/kg BB).

### 4. Dosis Aloksan

Dosis yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 150 mg/kg BB secara intraperitoneal pada tikus(8).

### 5. Dosis Atorvastatin

Atorvastatin digunakan sebagai pembanding. Dosis yang digunakan yaitu 20 mg/hari dan dikonversi ke hewan menjadi 2,05 mg/kg BB.

### Pembuatan Sediaan Uji

#### 1. Larutan Aloksan

Aloksan monohidrat dengan dosis 150 mg/kg BB dilarutkan dalam larutan Natrium Klorida 0,9%.

#### 2. Pakan Hiperkolesterol

Pakan hiperkolesterol terdiri dari campuran kuning telur ayam 30%, minyak 20%, dan makanan standar 50%, diaduk sampai homogen dan tercampur merata, lalu dikeringkan(9).

#### 3. Pembagian Kelompok

Terdiri dari 8 kelompok yaitu, normal:

tanpa perlakuan, negatif: perlakuan patologi dan tanpa pemberian obat, positif: pemberian obat atorvastatin dosis (2,05 mg/kg BB), kombinasi 1: (Kayu Manis 300 mg/kg BB + Mahkota Dewa 1000 mg/kg BB), kombinasi 2: (Kayu Manis 300 mg/kg BB + Mahkota Dewa 500 mg/kg BB), kombinasi 3: (Kayu Manis 300 mg/kg BB + Mahkota Dewa 250 mg/kg BB), kombinasi 4: (Mahkota Dewa 1000 mg/kg BB + Kayu Manis 150 mg/kg BB), kombinasi 5: (Mahkota Dewa 1000 mg/kg BB + Kayu Manis 75 mg/kg BB).

### Perlakuan Patologi Hewan Uji

Hewan uji diberikan pakan hiperkolesterol selama 30 hari, pada hari ke 24 diinduksi dengan larutan aloksan (1 kali) dengan rute pemberian injeksi intraperitoneal (ip).

### Pemeriksaan Kadar Kolesterol Total dan LDL

#### 1. Kolesterol Total

Serum diambil sebanyak 10 µL, dicampur reagen enzim (kit) sebanyak 1000 µL, dihomogenkan dengan menggunakan alat vorteks dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37 °C, dibaca dengan fotometer klinikal<sup>10</sup>.

#### 2. Kolesterol LDL

Serum diambil 100 µL dimasukkan ke dalam mikrotube ditambah 1000 µl reagen pengendap LDL, dicampur dengan menggunakan alatvorteks, diinkubasi selama 5 menit dengan temperatur 37 °C, disentrifugasi selama 10 menit, didiamkan selama 1 jam, diambil supernatan sebanyak 100 µL masukkan ke dalam mikrotube, dicampur dengan 1000 µL reagen enzim (kit), homogenkan

**Tabel 1.** Hasil uji penapisan fitokimia kulit kayu manis dan daging buah mahkota dewa.

No.	Penapisan	Kulit kayu manis		Buah mahkota dewa	
		Serbuk	Ekstrak	Serbuk	Ekstrak
1.	Alkaloid	+	+	-	-
2.	Flavonoid	+	+	+	+
3.	Saponin	+	+	+	+
4.	Tanin	+	+	+	+
5.	Triterpenoid	-	-	-	-
6.	Steroid	-	-	-	-

campuran menggunakan alat vorteks, dibaca dengan fotometer klinikal. Kadar kolesterol LDL dihitung sebagai selisih dari kolesterol total dan kolesterol di dalam supernatan(10).

### Analisis Data

Data persentase penurunan kadar kolesterol total dan LDL yang diperoleh ditentukan terlebih dahulu normalitas dan homogenitasnya dan dilanjutkan dengan uji ANOVA satu arah dengan taraf signifikansi 95% ( $\alpha = 0,05$ ) untuk mengetahui ada atau tidaknya pengaruh perlakuan. Data kemudian dilanjutkan dengan uji Tukey untuk melihat ada tidaknya perbedaan yang bermakna(11).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil Uji Penapisan Fitokimia

Hasil penapisan fitokimia kulit kayu manis dan daging buah mahkota dewa dapat dilihat pada Tabel 1. Berdasarkan literatur kandungan kimia dari kulit batang kulit kayu manis mengandung: minyak atsiri, saponin, tanin dan flavonoid. Kandungan kimia dari kulit buah mahkota dewa mengandung: alkaloid, saponin, dan flavonoid(12).

### Karakteristik Ekstrak

Hasil pemeriksaan karakteristik ekstrak kulit kayu manis dan daging buah mahkota dewa dapat dilihat pada Tabel 2 dan Tabel 3.

Berdasarkan literatur pemerian ekstrak kental kulit kayu manis; cokelat kemerahan; bau khas; rasa pedas; dan agak panas. Pemerian ekstrak kental daging buah mahkota dewa; cokelat; bau khas; rasa pahit(12). Berdasarkan literatur ekstrak kulit kayu manis memiliki susut pengeringan tidak lebih dari 12% dan rendemen tidak kurang dari 27,5%, ekstrak daging buah mahkota dewa susut pengeringan tidak lebih dari 10% dan rendemen tidak kurang dari 29,3%(11).

### Pengukuran Kadar Kolesterol Total dan LDL

#### 1. Pengukuran Kadar Kolesterol Total

Hasil data yang diperoleh merupakan persen penurunan kadar kolesterol total tikus. Data persentase penurunan kadar kolesterol total dapat dilihat pada Tabel 4.

#### 2. Pengukuran Kadar Kolesterol LDL

Hasil data yang diperoleh merupakan persen penurunan kadar kolesterol LDL tikus. Data persentase penurunan kadar kolesterol

**Tabel 2.** Hasil pemeriksaan karakteristik ekstrak kulit kayu manis dan daging buah mahkota. **Dewa**

No.	Jenis ekstrak	Uji organoleptis			
		Bentuk	Bau	Rasa	Warna
1.	Kayu manis	Kental	Khas	Pedas	Cokelat kemerahan
2.	Mahkota dewa	Kental	Khas	Pahit	Cokelat

**Tabel 3.** Hasil rendemen dan susut pengeringan ekstrak kulit kayu manis dan daging buah mahkota dewa.

No.	Jenis uji	Hasil (%)	
		Kulit kayu manis	Buah mahkota dewa
1.	Rendemen	30,36	31,27
2.	Susut Pengeringan	10,02	8,06

LDL dapat dilihat pada Tabel 5.

Data persentase penurunan kadar kolesterol total dan LDL dilakukan uji statistik. Uji statistik yang dilakukan meliputi uji normalitas dan homogenitas, uji ANOVA 1 arah dan dilanjutkan dengan uji Tukey. Berdasarkan hasil uji statistik persentase penurunan kadar kolesterol total diperoleh uji normalitas ( $p=0,139$ ) dan uji homogenitas ( $p=0,459$ ), sedangkan persentase penurunan kadar kolesterol LDL diperoleh uji normalitas

( $p=0,819$ ) dan uji homogenitas ( $p=0,108$ ).

Hasil ini menunjukkan data persentase penurunan kadar kolesterol total dan LDL terdistribusi normal dan homogen karena nilai ( $p>0,05$ ). Hasil uji ANOVA 1 arah menunjukkan persentase penurunan kadar kolesterol total ( $p=0,000$ ) dan kolesterol LDL ( $p=0,000$ ), hasil ini menunjukkan adanya pengaruh perlakuan terhadap efektivitas antikolesterol karena nilai  $p<0,05$ ).

Dilihat dari hasil data persentase penurunan kadar kolesterol total dan LDL

**Tabel 4.** Data persentase penurunan kadar kolesterol total tikus.

Kelompok Perlakuan	Tikus ke-				Rerata (%)
	1	2	3	4	
Normal	-3,36	-6,86	7,76	6,61	1,04 ± 7,26
Negatif	3,79	6,77	4,52	5,46	5,13 ± 1,29 <sup>a</sup>
Positif	48,02	46,77	44,89	48,86	47,13 ± 1,72 <sup>c</sup>
Kombinasi 1	42,02	40,00	42,69	41,43	41,53 ± 1,14 <sup>b</sup>
Kombinasi 2	24,88	25,61	27,96	24,49	25,73 ± 1,55 <sup>ab</sup>
Kombinasi 3	18,49	21,41	21,09	19,20	20,05 ± 1,42 <sup>ab</sup>
Kombinasi 4	43,75	41,90	43,49	42,18	42,83 ± 0,92 <sup>b</sup>
Kombinasi 5	30,35	30,38	29,92	31,36	30,50 ± 0,61 <sup>ab</sup>

**Tabel 5.** Data persentase penurunan kadar kolesterol LDL tikus.

Kelompok perlakuan	Tikus ke-				Rerata (%)
	1	2	3	4	
Normal	1,81	-9,30	4,08	5,56	0,54 ± 6,74
Negatif	4,09	3,98	2,02	3,06	3,29 ± 0,96 <sup>a</sup>
Positif	47,56	48,99	46,47	45,59	47,15 ± 1,47 <sup>c</sup>
Kombinasi 1	33,99	31,55	33,50	31,82	32,71 ± 1,21 <sup>b</sup>
Kombinasi 2	19,25	18,87	22,95	21,46	20,63 ± 1,92 <sup>ab</sup>
Kombinasi 3	17,71	18,30	17,92	17,08	17,75 ± 0,51 <sup>ab</sup>
Kombinasi 4	34,52	33,33	36,31	35,91	35,01 ± 1,36 <sup>b</sup>
Kombinasi 5	30,86	24,85	29,28	29,51	28,62 ± 2,61 <sup>b</sup>

**Keterangan**

- Normal : Tanpa Perlakuan
- Negatif : Perlakuan Patologi dan Tanpa Pemberian Obat
- Positif : Pemberian Obat Atorvastatin Dosis (2,05 mg/kg BB)
- Kombinasi 1 : (Kayu Manis 300 mg/kg BB + Mahkota Dewa 1000 mg/kg BB)
- Kombinasi 2 : (Kayu Manis 300 mg/kg BB + Mahkota Dewa 500 mg/kg BB)
- Kombinasi 3 : (Kayu Manis 300 mg/kg BB + Mahkota Dewa 250 mg/kg BB)
- Kombinasi 4 : (Mahkota Dewa 1000 mg/kg BB + Kayu Manis 150 mg/kg BB)
- Kombinasi 5 : (Mahkota Dewa 1000 mg/kg BB + Kayu Manis 75 mg/kg BB)



terlihat bahwa semua dosis kombinasi ekstrak kulit kayu manis (KM) dan daging buah mahkota dewa (MD) mampu menurunkan kadar kolesterol total dan LDL tetapi penurunannya tidak sebanding dengan kontrol positif (atorvastatin).

Atorvastatin dosis 2,05 mg/kg BB pada tikus mampu menurunkan kolesterol total sebesar 47,13% dan menurunkan kolesterol LDL sebesar 47,15%. Atorvastatin memiliki waktu paruh lebih lama yaitu 20 jam sehingga memungkinkan berperan dalam efikasi penurunan kolesterol yang lebih besar dibandingkan golongan statin lainnya. Berdasarkan hasil uji Tukey menyatakan bahwa kelompok kontrol positif (atorvastatin) berbeda bermakna dengan semua kelompok perlakuan lainnya. Atorvastatin menurunkan kadar kolesterol plasma dan lipoprotein dengan menghambat HMG-CoA reduktase dan sintesis kolesterol pada hati dengan meningkatkan jumlah reseptor LDL hati pada permukaan sel untuk memperbaiki pengambilan dan katabolisme LDL(13).

Dilihat dari efektivitas kombinasi ekstrak KM dan MD dalam menurunkan kadar kolesterol total dan LDL, penurunan paling optimal terlihat pada dosis kombinasi 4 (MD 1000 mg/kg BB + KM 150 mg/kg BB) dengan persentase penurunan kolesterol sebesar 42,83% dan LDL sebesar 35,01% dibandingkan dosis kombinasi 1 (MD 1000 mg/kg BB + KM 300 mg/kg BB) dengan persentase penurunan kolesterol sebesar 41,53% dan LDL sebesar 32,71%. Pemilihan dosis kombinasi 4 sebagai kombinasi yang paling optimal, tidak hanya dilihat dari besarnya persentase penurunan kolesterol total dan LDL, tetapi juga dapat dilihat dari dosis ekstrak yang digunakan. Kombinasi 4 menggunakan dosis ekstrak KM (150 mg/kg BB) lebih kecil dibandingkan dosis kombinasi 1 (KM 300 mg/kg BB), selain itu pada kombinasi 1 dosis yang digunakan merupakan dosis yang optimal semua (KM 300 mg/kg BB + MD 1000 mg/kg BB). Semua respons farmakologik harus memiliki efek maksimal ( $E_{max}$ ), berapapun tinggi konsentrasi

yang terjadi, akan tercapai suatu titik saat penambahan konsentrasi tidak meningkatkan respon(14). Hal ini terjadi pada dosis kombinasi 4 yang memiliki dosis lebih kecil dibandingkan dengan dosis kombinasi 1, tetapi kombinasi 4 memberikan efek penurunan yang lebih besar dibandingkan dosis kombinasi 1, hal ini dapat disimpulkan bahwa efek maksimal telah terjadi pada dosis kombinasi 4, walaupun pada kombinasi 1 dosisnya lebih besar. Tujuan dilakukan kombinasi yaitu untuk mendapatkan efek yang sinergis dan dapat memperkecil dosis pemberian, tetapi tetap efektif dalam menurunkan kolesterol total dan LDL. Berdasarkan uji statistik yaitu uji Tukey menyatakan bahwa pada persentase penurunan kadar kolesterol total dan LDL, dosis kombinasi 4 berbeda bermakna dengan semua dosis kombinasi lainnya kecuali pada dosis kombinasi 1. Hal ini dapat disimpulkan bahwa efektivitas kombinasi 4 dengan kombinasi 1 memberikan efek penurunan yang sama.

Efektivitas kombinasi ekstrak KM dan MD jika dibandingkan dengan bentuk ekstrak tunggalnya tidak memberikan efek yang lebih baik atau efek yang lebih besar, dimana hasil kombinasi ekstrak KM dan MD (kombinasi 4) penurunan kadar kolesterol yang paling optimal sebesar 42,83%, sedangkan dari hasil penelitian sebelumnya ekstrak tunggal KM dosis 300 mg/kg BB dapat menurunkan kadar kolesterol sebesar 80,42%<sup>6</sup>. Selain itu dari hasil penelitian sebelumnya 1 mL infusa yang mengandung 194 mg MD mampu mencegah peningkatan kolesterol darah pada tikus putih jantan yang diberi diet lemak tinggi, dimana peningkatan kolesterol selama 14 hari pada tikus yang diberikan infusa MD sebesar 14,98% dibandingkan dengan tikus tanpa diberikan infusa MD peningkatan kadar kolesterolnya sebesar 58,22%(15).

Kemampuan ekstrak KM dan MD dalam menurunkan kadar kolesterol total dan LDL tidak terlepas dari kandungan senyawa aktif yang terdapat di dalam ekstrak tersebut. Kandungan senyawa aktif yang diduga terdapat dalam ekstrak KM dan memiliki peran dalam

menurunkan kadar kolesterol yaitu fenol berupa *cinnamate*. *Cinnamate* dalam menurunkan kadar kolesterol memiliki mekanisme dengan cara menghambat aktivitas HMG-CoA reduktase yang berperan penting dalam sintesis kolesterol dan menurunkan peroksidasi lipid di hepar(16). HMG-CoA reduktase adalah suatu enzim untuk sintesa kolesterol dimana enzim ini mengubah HMG KoA menjadi asam mevalonat yang merupakan prekursor kolesterol(1). Kandungan ekstrak KM selain mampu menurunkan kadar kolesterol juga memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang berfungsi untuk menangkal radikal bebas terutama pada sel  $\beta$  pankreas yang timbul akibat terbentuknya oksigen reaktif dari senyawa aloksan(17). Antioksidan juga berperan dalam menurunkan peroksidasi lipid dihepar.

Peroksidasi lipid merupakan proses yang bersifat kompleks akibat reaksi asam lemak tak jenuh ganda penyusun fosfolipid membran sel dengan senyawa oksigen reaktif (SOR), membentuk hidroperoksida(17). Kemampuan ekstrak MD dalam menurunkan kadar kolesterol total dan LDL juga tidak terlepas dari kandungan senyawa aktif yang terdapat di dalamnya. Kandungan senyawa aktif yang terdapat didalam ekstrak MD dan diduga mampu mengatur keseimbangan jumlah kolesterol dalam tubuh yaitu asam galat. Asam galat menurunkan jumlah kolesterol dalam tubuh dengan cara meningkatkan jumlah reseptor LDL(18). Hati dan sel-sel lain memiliki reseptor LDL yang fungsinya untuk menyingkirkan LDL dari plasma melalui endositosis. Penyingkiran LDL yang diperantarai reseptor hati merupakan mekanisme utama untuk mengendalikan kadar LDL plasma(4). Kandungan ekstrak MD selain mampu menurunkan kadar kolesterol juga memiliki aktivitas sebagai antioksidan(19).

Hiperkolesterol dapat disebabkan oleh penyakit lain salah satunya diabetes millitus (DM). DM merupakan gangguan metabolisme karbohidrat, protein dan lemak. Komplikasi DM dengan hiperkolesterol dapat memperberat ketidaknormalan lemak dalam plasma(1). Pengobatan penyakit DM dengan komplikasi

hiperkolesterol dapat dilakukan dengan meningkatkan kadar insulin dalam tubuh. Kemampuan ekstrak KM dan MD selain mampu menurunkan kadar kolesterol dan LDL, keduanya memiliki kemampuan untuk meningkatkan kadar insulin dalam tubuh. Senyawa yang diduga mampu meningkatkan kadar insulin yaitu flavonoid. Senyawa flavonoid yang terdapat dalam ekstrak KM yaitu *methylhydroxy chalcone polymer* (MHCP).

Senyawa MHCP merupakan suatu polifenol (flavonoid) yang mempunyai mekanisme kerja seperti insulin, dengan meningkatkan sensitivitas reseptor insulin, mengaktifkan reseptor P1 3-kinase, mengaktifkan sintesa glikogen dan menstimulasi pengambilan glukosa(20). Senyawa flavonoid yang terdapat dalam ekstrak MD yang dapat meningkatkan sekresi insulin yaitu *quercetin*. *Quercetin* meningkatkan pengeluaran insulin dari sel pulau Langerhans melalui perubahan metabolisme  $Ca^{2+}$ (21). Insulin memiliki peran penting dalam metabolisme lemak diantaranya yaitu meningkatkan transfortasi glukosa ke dalam sel jaringan adiposa, mengaktifkan enzim-enzim yang mengkatalase pembentukan asam lemak dari glukosa, meningkatkan masuknya asam lemak dari darah ke jaringan adiposa, dan menghambat terjadinya lipolisis.

## KESIMPULAN

Dari hasil penelitian efektivitas kombinasi ekstrak kulit kayu manis dan daging buah mahkota dewa dapat disimpulkan bahwa semua dosis kombinasi mampu menurunkan kadar kolesterol total dan LDL tetapi penurunannya tidak sebanding dengan kontrol positif (atorvastatin) sebesar 47,13% dan 47,15%. Efektivitas penurunan kadar kolesterol total dan LDL pada kombinasi ekstrak kulit kayu manis dan daging buah mahkota dewa paling optimal terlihat pada dosis kombinasi 4 (MD 1000 mg/kg BB + KM 150 mg/kg BB) dengan persentase penurunan kolesterol sebesar 42,83% dan LDL sebesar 35,01%.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Priyanto. *Farmakoterapi dan Terminologi Medis. Leskonfi*, Depok. 2009. Hlm. 157
2. Rahardjo Rio. Kumpulan Kuliah Farmakologi, Ed 2. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta. 2009. Hlm 709.
3. Sacher Ronal A, Richard A MC Pherson. *Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium*. Edisi 2. Diterjemahkan oleh Brahm U, Pendit dan Dewi Wulandari. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 2002. Hlm. 300
4. Neal, M.J. At a Glance : *Farmakologi Medis. Diterjemahkan oleh Juwalita Surapsari*. Gelora Aksara Asrama Pratama, Jakarta. 2006. Hlm 46-47, 78-79
5. Bjornson E, Jacobsen EI, Kalaitzakis E. *Hepatotoxicity associated with statins: Reports of idiosyncratic liver injury post-marketing*. Dalam: Journal of hepatology. 2011;56:374-380
6. Hermansyah. *Efek Ekstrak Kayu Manis (Cinnamomum cassia) Terhadap Kadar Glukosa Darah, Berat Bada, dan Kolesterol Pada Tikus Jantan Strain Sprague Dawley Yang Diinduksi Aloksan*. Skripsi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatulla, Jakarta. 2014. Hlm. 32
7. Julizar, Lili Irawati, Erlina Rustam. Uji Efek Infusa Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) Terhadap Pencegahan Peningkatan Kolesterol Darah Pada Tikus Putih Jantan (*Rattus Novergicus*) yang diberi diet lemak tinggi. Dalam: Majalah Kedokteran Andalas 2012;1(36). Januari-Juni 2012.
8. Szukudelski T. The Mecanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cels of The Rat Pancreas. Dalam: Journal Review. 2001.
9. Syahputra O. *Uji Aktivitas Fraksi Etanol 70% Ekstrak Buah Makasar (Brucea javanica (L.) Merr) Terhadap Penurunan Kadar Kolesterol Total Darah Pada Tikus Yang Diinduksi Aloksan Dan Diet Tinggi Kolesterol*. Skripsi. Fakultas Farmasi dan Sains UHAMKA, Jakarta. 2015. Hlm. 15.
10. Gandasoebrata. *Penuntun Laboratorium Klinik*. Dian Rakyat. Jakarta. 2004.
11. Santoso S. *Statistik Deskriptif: Konsep dan Aplikasi dengan Microsoft Excel dan SPSS*, Ed 1. Andi. Yogyakarta. 2003.
12. Departemen Kesehatan RI. *Farmakope Herbal. Edisi Pertama. Departemen Kesehatn Republik Indonesia, Jakarta*. 2008. Hlm 40,49,88,91-93, 174-175
13. Ganiswara S. *Farmakologi dan Terapi*, Edisi V. UI-Press. Jakarta. 2009. Hlm 374-376
14. Bertram G, Katzung. Susan B, Amthony J. *Farmakologi Dasar Dan Klinik Ed 12*. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta. 2014. Hlm 54
15. Rahman Sonia, Halima B, Zaida R, Ferdous A, Md. Jalaludin I, Abdul K.M.Y. *Effect of Cinnamon (Cinnamomum cassia) as a Lipid Lowering Agent on Hypercholesterolemic Rats*. Dalam: Journal of Enam Medical College. 2013;3(2 )
16. Yang Cheng-Hong, Rong-Xian Li, Li Yeh-Chuang. *Antioxidant Activity of Various Part of Cinnamomum cassia Extracted with Different Extraction Methods*. Dalam: Molecules 2012;17: 7294-730.
17. Setiawan B dan Eko S. *Peroksidasi Lipid dan Penyakit Terkait Stres Oksidatif pada Bayi Prematur*. Dalam: Maj Kedokt Indon, 2007;57(1)
18. Altaf Rabia, M. Zaini Bin Asmawi, Aidiahmad Dewa, Amirin Sadikun, M. Ihtisham Umar. *Phytochemistry and medicinal properties of Phaleria macrocarpa*(Scheff.) Boerl. Extracts. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3731883/?report=classic#ref35>. Diakses 20 Agustus 2016
19. Andrean David, Susiana Prasetyo, Anastasia Prima Kristijarti, Tedi Hudaya. *The Extraction and Activity Test of Bioactive Compounds in Phaleria macrocarpa as Antioxidants*. Dalam: Procedia Chemistry. 2014;9:94 – 101
20. Djaya N, Jenny H, Veronika M. S, Natalia P, Aylly M, Maria D. Pengaruh Ekstrak Kayu Manis Terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus. Dalam: Damianus Journal of Medicine. 2011;10(3):121-124. Diakses 9 Oktober 2015
21. Arjadi Fitranto dan Priyo Susatyo. *Regenerasi Sel Pulau Langerhans Pada Tikus Putih (Rattus norvegicus) Diabetes Yang Diberi Rebusan Daging Mahkota Dewa (Phaleria macrocarp (scheff.) Boerl.)*. Dalam: Medical Faculty of Jendral Soedirman University, Purwokerto. 2010;2(2), Juli-Desember 2010. Diakses 9 Oktober 2015.



# Pengaruh Senyawa Asam 2-(4-(Klorometil) Benzoiloksi) Benzoat Terhadap Agregasi Trombosit dengan Metode Pengujian *Thrombocyte Aggregation Test* dan *Flow Cytometry* Pada Plasma Manusia

Febrina Fatkiyah Jarra, Caroline<sup>(\*)</sup>, YudyTjahjono

**ABSTRACT:** *Acetylsalicylic acid (AAS) is a compound that is often used orally as an analgesic and platelet anti-aggregation drug. This study aims to examine the effect of 2-(4-chloromethylbenzoyloxy) benzoic acid on human platelet aggregation processes using human PRP (rich plasma platelets) by the Thrombochyte Aggregation Test (TAT) method and Immuno-flow cytometry. It is expected that the data obtained can be used for the development of new compounds that are more effective and less toxic compared to acetylsalicylic acid. In this study, blood was taken through venipuncture in the arm of a normal patient, or aortapunk in mice. After PRP was isolated by blood centrifugation, it was then classified into several groups: negative control (50 mM Hep Buffer added), positive control (added AAS 277 $\mu$ M / Hep 50 mM) and test compound group (2-(4-chloromethylbenzoyloxy) benzoate 277 $\mu$ M added group / 50 mM fast). The concentration of the compound 277  $\mu$ M is equivalent to the dose of AAS 500 mg / Kg BB. After addition and incubation, a TAT test and Immuno-Flow Cytometry test were performed (including platelet antibody reactivity tests and platelet aggregation tests) with the addition of Collagen agonists. Immuno-flow cytometry test using AP-3 anti-human PE antibodies and AP-3 anti-human Alexa Flour 488. In the TAT test the average aggregation value (vmax) was obtained on the test compound (2- acid (4- (chloromethyl) benzoyloxy) benzoate + 50 mM fast buffer) (0.311  $\pm$  0.031% seconds), proportional to the negative control group (Buffer 50 mM) was (0.367  $\pm$  0.061% seconds) and under positive control (0.179  $\pm$  0.062% seconds). In the Immuno-Flow Cytometry test, the average% of aggregation in the test compounds was 17.02  $\pm$  1.44%, slightly above the negative control ((16.18  $\pm$  1.07%) and significantly under positive control (10, 57  $\pm$  2.13%) From the two experiments above, it can be concluded that 2-(4-chloromethylbenzoyloxy) benzoate acid compound does not show anti-platelet aggregation effect in invitro examination method*

**Keywords:** 2- acid (4-chloromethylbenzoyloxy) benzoate, acetyl salicylate, test thrombochyte aggregation test, Immuno-Flow Cytometry test

**ABSTRAK:** Asam asetilsalisilat (AAS) merupakan senyawa yang sering digunakan secara per-oral sebagai analgetika dan obat anti-agregasi trombosit. Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh asam 2-(4-klorometilbenzoiloksi)benzoat terhadap proses agregasi trombosit manusia menggunakan PRP (trombosit rich plasma) manusia dengan metode Thrombochyte Aggregation Test (TAT) dan Immuno-flow cytometry. Diharapkan data yang diperoleh dapat digunakan untuk pengembangan senyawa baru yang lebih efektif dan kurang toksik jika dibandingkan dengan asam asetilsalisilat. Pada penelitian ini, darah diambil melalui venipunktur pada lengan pasien normal, atau aortapunktur pada mencit. Setelah PRP diisolasi dengan sentrifugasi darah, kemudian diklasifikasikan dalam beberapa kelompok: kontrol negatif (ditambahkan Buffer Hepes 50 mM), kontrol positif (ditambahkan AAS 277 $\mu$ M/Hepes 50 mM) dan kelompok senyawa uji (ditambahkan asam 2-(4-klorometilbenzoiloksi) benzoat 277 $\mu$ M/Hepes 50 mM). Konsentrasi senyawa 277  $\mu$ M ekuivalen dengan dosis AAS 500mg/Kg BB. Setelah penambahan dan inkubasi, dilakukan uji TAT dan uji Immuno-Flow Cytometry (meliputi uji reaktivitas antibodi pada trombosit dan uji agregasi trombosit) dengan penambahan agonis Kolagen. Uji immuno-flow cytometry menggunakan antibodi PE anti human AP-3 dan Alexa Flour 488 anti human AP-3. Pada uji TAT diperoleh nilai rata-rata agregasi (vmax) pada senyawa uji (Asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat+Buffer Hepes 50 mM) (0,311 $\pm$ 0,031% detik), dibanding dengan kelompok kontrol negatif adalah (Buffer Hepes 50 mM) adalah (0,367 $\pm$ 0,061% detik) dan dibawah kontrol positif (0,179 $\pm$ 0,062% detik). Pada uji Immuno-Flow Cytometry diperoleh rata-rata % agregasi pada senyawa uji sebesar 17,02  $\pm$  1,44%, sedikit diatas kontrol negatif ((16,18  $\pm$  1,07%) dan signifikan di bawah kontrol positif (10,57  $\pm$  2,13%). Dari kedua eksperimen diatas, dapat disimpulkan bahwa senyawa asam 2-(4-klorometilbenzoiloksi)benzoat tidak menunjukkan efek anti agregasi trombosit dalam metode pemeriksaan invitro.

<sup>1</sup> Fakultas Farmasi, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, Indonesia

## Korespondensi :

Caroline  
catcarol\_2000@yahoo.com

**Kata Kunci :** Asam 2-(4-klorometilbenzoiloksi)benzoat, asam asetil salisilat, uji thrombochyte aggregation test, uji Immuno-Flow Cytometry

## PENDAHULUAN

Asam asetilsalisilat (AAS) yang terkenal dengan merk dagang aspirin merupakan obat yang sering digunakan masyarakat secara per oral sebagai obat analgesika. Selain berfungsi sebagai analgesik-antipiretik, AAS dapat berfungsi sebagai anti agregasi trombosit dengan mekanisme aksi penghambatam COX secara nonspesifik (1). Pada umumnya dosis aspirin yang sering digunakan untuk analgesika-antipiretika sebesar 500 mg/hari/70 kgBB (2). Namun, konsumsi AAS secara terus menerus dapat menyebabkan peningkatan resiko tukak lambung dan tromboemboli (3). Untuk meminimalisir resiko tersebut pada AAS, maka dilakukan berbagai pengembangan obat baru yang berasal dari modifikasi AAS. 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 namun sampai sekarang ini masih belum jelas, apakah senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat sebanding dengan AAS sebagai "Pedang bermata dua", satu sisi memiliki manfaat sebagai anti agregasi trombosit (sebagai obat anti stroke) dan sisi lain memiliki resiko dapat meningkatkan resiko pendarahan pada pasien.

Pemeriksaan agregasi trombosit dapat dilakukan dengan berbagai cara seperti *Thrombocyte Aggregation Test* (TAT) dan *Immuno Flow-Cytometry*. TAT merupakan metode klasik yang digunakan secara umum di seluruh laboratorium hematologi, karena kecepatannya untuk dapat mendeteksi agregasi-anti agregasi trombosit secara cepat. *Immuno-flow cytometry* merupakan metode modern yang digunakan untuk mendeteksi dan melihat aktivitas agregasi trombosit dengan prinsip kerja berdasarkan perubahan transmisi cahaya yang dihasilkan dari ikatan antara sebuah objek (sel trombosit) dengan antibodi yang berfluoresensi. (4). Suspensi trombosit akan diidentifikasi saat melewati zona iluminasi/deteksi dan menjadi droplet. Droplet

yang mengandung sel akan diurutkan saat akan melewati antara *deflecting plates* (5). Untuk mengaktivasi Trombosit, digunakan kolagen sebagai substrat yang sudah diketahui sebagai agonis kuat untuk aktivasi trombosit melalui ikatannya dengan permukaan trombosit.

Berdasarkan uraian diatas maka peneliti akan melakukan eksperimen uji diagnostik untuk meguji senyawa asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi)benzoate dengan konsentrasi sebesar 50 µg/mL (277µM) pada plasma manusia dengan menggunakan metode *Thrombocyte Aggregation Test* (TAT) dan *Immuno-Flow cytometry*. Pada penelitian ini senyawa uji asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat disinyalir dapat menghambat agregasi trombosit, karena merupakan turunan dari AAS. Namun kenyataan hasil yang didapatkan berbeda

## METODOLOGI PENELITIAN

### Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain Asam Asetil Salisilat, asam 2-(4-Klorometil) Benzoiloksi)Benzoat, antibodi monoklonal anti-human GP-IIIa klon AP-3, PE F(ab')<sub>1</sub>-Goat anti-mouse igG (H+L), Alexa Flour 488-murine anti-human Fc igG, Buffer Hepes 1M. Alat yang digunakan yaitu timbangan digital, mortir-stamper, gelas ukur, beaker glass, cawan petri, Aggregation Remote Analyzer Module (Aggram), BD Facs Calibur.

Pada percobaan ini digunakan plasma manusia yang diambil melalui lengan pasien.

### Tahap Penelitian

#### Perlakuan pada Plasma Subyek secara *In Vitro*.

Pada penelitian ini terdapat tiga perlakuan dengan memberikan konsentrasi sebesar 50µg/mL (277µM). Perlakuan pertama adalah kontrol negatif, plasma manusia akan diberikan Buffer Hepes 50 mM. Perlakuan kedua adalah kontrol positif diberikan AAS dan Buffer Hepes 50 mM. Perlakuan yang ketiga, plasma subyek akan diberikan senyawa uji asam

2-(4-klrometilbenzoiloksi)benzoate dan Buffer Hepes 50 mM. Semua perlakuan akan dilakukan replikasi sebanyak tiga kali.

### **Prosedur Kerja Isolasi Darah dan Pembuatan PRP.**

Penelitian ini menggunakan sampel darah dari 3 subyek pasien sehat dengan dilakukan pengambilan darah dari vena pada anterior lengan pasien (sisi dalam lipatan siku), kemudian ditampung dalam tabung vacutainer yang berisi antikoagulan Natrium Sitrat 3,2%. Darah yang telah ditampung selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 54 g (1000 rpm, diameter rotor 54 mm) selama 10 menit untuk mendapatkan Platelet rich plasma (PRP), yaitu plasma darah yang memiliki konsentrasi trombosit tinggi. selanjutnya PRP disentrifuse dengan kecepatan 1000 g (3000 rpm, diameter rotor 54 mm) selama 10 menit untuk mendapatkan PPP (Trombosit Poor Plasma). Selanjutnya PRP diberi AAS dan senyawa uji diinkubasi selama 25 menit, lalu ditambahkan agonis kolagen.

### **Prosedur Uji Agregasi Trombosit (TAT).**

Pada uji TAT, 175 µl PRP dipipet ke dalam kuvet TAT, kemudian ditambahkan dengan 50 µl senyawa uji asam 2-(4-Klorometil benzoiloksi) benzoat atau AAS dengan konsentrasi sebesar 277µM, dilanjutkan dengan penambahan agonis kolagen (konsentrasi 5 µg/ml) sebanyak 25 µl dan magnet pengaduk (stirrer) ke dalam kuvet untuk menggerakkan plasma supaya tidak statis. Sebagai blanko negatif pada alat TAT, digunakan PPP (Platelet poor plasma), yaitu plasma darah yang memiliki konsentrasi trombosit yang sangat minim, dihasilkan dengan cara resentrifus PRP. Kemudian subjek uji dibaca pada Aggregation Remote Analyzer Module (Aggram) (Helena Laboratories, Beaumont Texas, USA) dengan kisaran waktu pengamatan 9-10 menit suhu 37°C.

### **Prosedur Immuno Flow cytometry.**

Uji Immuno Flow cytometry ini digunakan untuk memastikan apakah dengan penambahan induktor kolagen dapat mempengaruhi agregasi

trombosit, dengan penambahan penanda antibodi yang spesifik berikatan pada trombosit manusia. Namun sebelumnya, perlu dilakukan identifikasi apakah antibodi yang digunakan reaktif terhadap darah subjek, dengan uji reaktivitas antibodi.

### **Uji reaktivitas antibodi.**

Uji ini bertujuan untuk mengetahui apakah antibodi yang digunakan dapat bereaksi dengan trombosit pasien subjek yang sudah diisolasi. Pada uji ini hanya menggunakan PRP manusia tanpa diberi perlakuan apapun. PRP dibagi dalam 5 tabung sama rata yaitu tabung 1 (Tidak diberi antibodi), tabung 2 tambahkan antibodi PE-goat anti mouse Fc-IgG (10µL konsentrasi 0,2 µg/ µL), inkubasi selama 30 menit suhu ruangan, tabung 3 tambahkan Antibodi Alexa Flour 488 goat anti mouse Fc-IgG (25µL konsentrasi 2 mg/ µL), inkubasi selama 30 menit (suhu ruang) dan masing-masing tabung 4 dan 5, dtambahkan antibodi mouse anti-human Ap-3 (20 µL konsentrasi 20µg/ml) lalu inkubasi 40 menit dan kemudian ditambahkan antibodi sekunder Alexa Flour 488- goat anti mouse Fc-IgG(tabung 4) atau PE goat anti mouse Fc-IgG (tabung 5) masing-masing sebanyak 10µl, inkubasi selama 40 menit (37°C) selanjutnya lakukan pengukuran dengan alat Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Calibur (BD Biosciences, USA) milik Instalasi Patologi Klinik RSUD dr. Soetomo Surabaya.

### **Uji Anti-agregasi Trombosit.**

PRP dari darah subyek yang sudah diberi perlakuan, setelah didapatkan PRP selanjutnya di bagi 3 tabung sama rata yaitu Tabung 1, PRP ditambahkan Antibodi anti-human Ap-3 25µl (konsentrasi 20 µg/ µL), inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang (digoyang- goyangkan pelan) lalu ditambahkan antibody sekunder yaitu alexa flour 488 sebanyak 10 µl (konsentrasi 2mg/ml) dan Tabung 2, PRP ditambahkan Antibodi Ap-3 sebanyak 25 µL (konsentrasi 2 mg/ µL), inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang (digoyang- goyangkan pelan). Kemudian masing-masing tabung 1 dan 2 diambil sebanyak 85 µl. Pada tabung A berisi 85 µl

Ap-3 Alexa Flour 488 dan Ap-3 PE sebanyak 85 µl selanjutnya ditambahkan senyawa uji sebanyak 10 µl (konsentrasi 50 µg/mL) lalu inkubasi selama 45 menit selanjutnya ditambahkan kolagen sebanyak 10 µl inkubasi selama 10 menit m(37°C). Pada tabung B berisi 85 µl Ap-3 Alexa Flour 488 dan Ap-3 PE sebanyak 85 µl tambahkan kolagen 5 µl inkubasi selama 30 menit dan tambahkan buffer hepes sebanyak 20 µl inkubasi 45 menit (37°C). Lakukan pengukuran dengan alat Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Calibur milik Instalasi Patologi Klinik RSUD dr. Soetomo Surabaya.

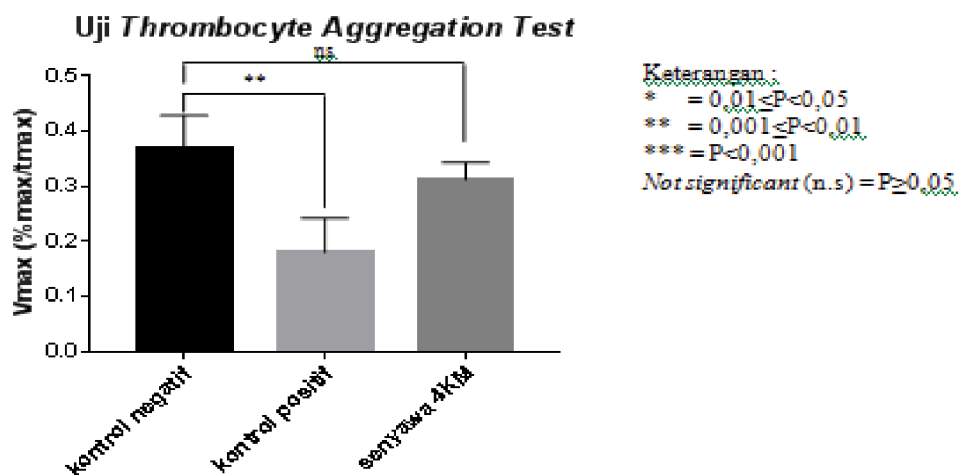
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada pengujian ini menggunakan metode uji thrombocyte aggregation test (TAT) (Gambar 1) dan uji immuno-flow cytometry untuk melihat pengaruh senyawa asam 2-(4-klorometilbenzoiloksi)benzoat terhadap agregasi trombosit. Subjek pada penelitian ini menggunakan plasma manusia yang telah diberikan perlakuan secara in vitro yaitu, kontrol

negatif (*Buffer* HEPES 50 mM), kontrol positif (AAS + *Buffer* hepes 50mM) dan senyawa uji (asam 2-(4-klorometilbenzoiloksi)benzoat + *Buffer* HEPES 50 mM).

Pada metode Uji *Thrombocyte Aggregation Test* (TAT) menggunakan metode ini sederhana yaitu PRP yang diperoleh akan diberi penambahan jenis agonis pada sampel yang nantinya akan meningkatkan aktivasi trombosit, sedangkan uji *flow cytometry* merupakan uji untuk melihat adanya agregasi trombosit yang lebih akurat menggunakan antibodi spesifik Anti human AP-3.

Pada metode TAT semakin rendah jumlah Vmax maka semakin banyak trombosit yang beragregasi. Hasil uji TAT pada Gambar 1. menunjukkan bahwa senyawa asam 2-(4-klorometilbenzoiloksi)benzoat memiliki nilai rata-rata Vmax pada kelompok kontrol negatif adalah (0,367±0,061% detik), kontrol positif (0,179±0,062% detik) dan senyawa uji (Asam 2-(4 (klorometil)benzoiloksi)benzoat+*Buffer* HEPES 50 mM) (0,311±0,031% detik).



**Gambar 1.** Uji *Thrombocyte Aggregation Test* (TAT). Replikasi dilakukan 3x dengan konsentrasi 50 µg/mL (277 µM) perlakuan : kontrol negatif (*Buffer* HEPES 50 mM), kontrol positif (AAS + *Buffer* hepes 50 mM) dan senyawa uji (asam 2-(4-klorometilbenzoiloksi)benzoat + *Buffer* HEPES 50 mM). Analisis statistik kontrol negatif dengan kontrol positif didapatkan P=0,0094 sedangkan antara kontrol negatif dengan senyawa uji P=0,4002.



Hasil analisis statistik  $V_{max}$  dari uji TAT antara kontrol negatif dan kontrol positif menunjukkan hasil ( $P < 0,05$ ), sedangkan kontrol negatif dan senyawa asam 2-(4-klorometilbenzoiloksi) benzoat menunjukkan hasil ( $P > 0,05$ ), tetapi pada lampiran bahwa terlihat adanya perbedaan antara kelompok senyawa uji, kontrol negatif dan kontrol positif. Nilai rata-rata hasil uji TAT pada menunjukkan bahwa kelompok negatif lebih tinggi dibandingkan kontrol positif dan senyawa uji, sedangkan pada kontrol positif lebih rendah dibandingkan kontrol negatif dan senyawa uji. Senyawa uji lebih rendah dibandingkan kontrol negatif dan lebih tinggi dari kontrol positif.

Hasil uji *immuno-flow cytometry* menunjukkan bahwa senyawa asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi)benzoat memiliki nilai rata-rata nilai %total event (Upper Right) ( $16,18 \pm 1,07\%$ ), kontrol positif ( $10,57 \pm 2,13\%$ ), dan kontrol negatif ( $17,02 \pm 1,44\%$ ). Hasil analisis statistik dari uji *immuno-flow cytometry* pada tiap kelompok perlakuan menunjukkan hasil  $P \geq 0,05$ , sedangkan pada Gambar 2. agregasi trombosit pada kelompok senyawa uji ditunjukkan dengan rata-rata nilai %total event (*Upper Right*) yang diinterpretasikan sebagai prosentasi agregasi lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol positif dan hampir sama dengan kontrol negatif.

Hasil dari data yang ada dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata jumlah % total agregasi trombosit, dimana senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat tidak berpotensi sebagai senyawa pemicu anti-agregasi trombosit, bila dibanding dengan AAS. Telah diketahui (Caroline et al.,

belum dipublikasikan) bahwa senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat dapat digunakan sebagai analgesika yang efektif menggantikan AAS, karena struktur molekulnya yang memiliki kesesuaian pada sisi aktif COX, sehingga berpotensi menghambat enzim COX. Walaupun hambatan COX selalu diasosiasikan dengan anti-agregasi trombosit (6), namun diskrepansi hasil yang diamati dalam jurnal ini menunjukkan adanya mekanisme hambatan COX yang berbeda antara senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi) benzoat dengan senyawa turunannya asam asetilsalisilat. Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini mempresentasikan potensi asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi)benzoat yang dengan AAS, yaitu sebagai obat analgesika tanpa menimbulkan efek samping apapun pada pasien, seperti tukak dan pendarahan.

## KESIMPULAN DAN SARAN

Pemberian senyawa asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi) benzoat pada darah manusia secara invitro tidak memicu agregasi trombosit menggunakan metode *Thrombocyte Aggregation Test* (TAT). Pemberian senyawa asam 2-(4-(klorometil)benzoiloksi) benzoat pada darah manusia secara invitro tidak memicu agregasi trombosit menggunakan metode uji *immuno-flow cytometry*. Asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi)benzoat memiliki potensi yang berbeda dengan AAS, yaitu sebagai obat analgesika tanpa menimbulkan efek samping apapun pada pasien, seperti tukak dan pendarahan.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Carlo Patrono. MD; Colin Baigent. MD; Jack Hirsh. MD. FCCP; and Gerald Ruth. MD. Anti trombosit Drugs. CHEST; 2008;133:1998-233.
2. D. Sils', S. E. Rodgers', J. V. Lloyd2, K. M. Wilson', D. M. Siebert', And F. Bochner. Inhibition of trombosit aggregation and thromboxane production by low concentrations of aspirin in vitro. 1998;74:491-497
3. Lanas AS, James. Low-dose aspirin and upper gastrointestinal damage: epidemiology, prevention and treatment. Current Medical Research And Opinion. 2007;23: 163-173.
4. Penz. S. M.. Bernlochner. I.. Toth. O.. Lorenz. R.. Calatzis. A.. Siess. W. Selective and Rapid



- Monitoring of Dual Trombosit Inhibition by Aspirin and P2Y12 antagonists by Using Multiple Electrode Aggregometry. *Thrombosis Journal*. 2010;8(9): 1-8.
5. Forsythe, N. *Fundamentals of Chemistry: General, Organic and Biological*. 2nd ed. A Division of Simon dan Schuster, Inc. United States of America. P. 1991;415.
  6. Nagelschmitz, J., Blunck, M., Kraetzschmar, J., Ludwig, M., Wensing, G. and Hohlfeld, T. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of acetylsalicylic acid after intravenous and oral administration to healthy volunteers, *Clinical Pharmacology*. 2014; 4(6): 51-59.