

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^(*), 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 μ M / Hep 50 mM) and test compound group (2-(4-chloromethylbenzoyloxy) benzoate 277 μ M added group / 50 mM fast). The concentration of the compound 277 μ 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 μ M/Hepes 50 mM) dan kelompok senyawa uji (ditambahkan asam 2-(4-klorometilbenzoiloksi) benzoat 277 μ M/Hepes 50 mM). Konsentrasi senyawa 277 μ 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.

¹ 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')₁-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 mrmpengaruhi 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.

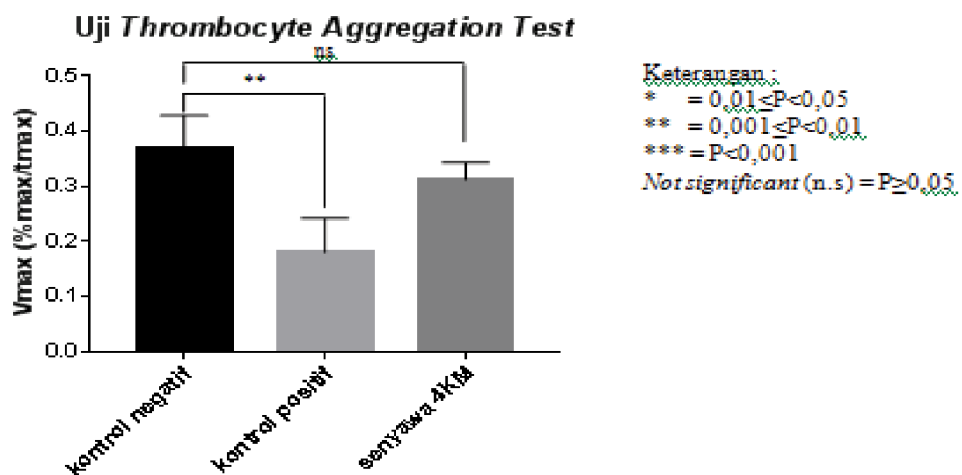
HASIL DAN PEMBAHASAN

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