

SKRIPSI

**UJI AKTIVITAS ANTI AGREGASI TROMBOSIT
EKSTRAK METANOL ALGA COKLAT
(*Padina australis*) SECARA IN VITRO**

**IN VITRO TEST OF ANTI PLATELET AGGREGATION
ACTIVITY METANOL EXTRACT BROWN ALGAE
(*Padina australis*)**

Disusun dan diajukan oleh

ACHMAD LUTHFI

N011 17 1058



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**UJI AKTIVITAS ANTI AGRGASI TROMBOSIT EKSTRAK METANOL
ALGA COKLAT (*Padina australis*) SECARA IN VITRO**

**IN VITRO TEST OF ANTI PLATELET AGGREGATION ACTIVITY
METANOL EXTRACT BROWN ALGAE (*Padina australis*)**

SKRIPSI

untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana

**ACHMAD LUTHFI
N011 17 1058**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

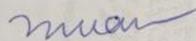
UJI AKTIVITAS ANTI AGREGASI TROMBOSIT EKSTRAK METANOL
ALGA COKLAT (*Padina australis*) SECARA IN VITRO

ACHMAD LUTHFI

N011 17 1058

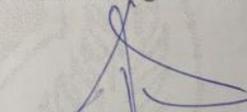
Disetujui oleh :

Pembimbing Utama



Prof. Dr. rer.nat. Marianti A, Manggau, Apt.
NIP. 19670319 199203 2 002

Pembimbing Pendamping



Ismail, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19850805 201404 1 001

Pada tanggal 07 06 2021

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANTI AGREGASI TROMBOSIT EKSTRAK METANOL
ALGA COKLAT (*Padina australis*) SECARA IN VITRO

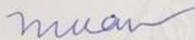
Disusun dan diajukan oleh :

ACHMAD LUTHFI
N011 17 1058

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Farmasi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
pada tanggal 07/06/2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

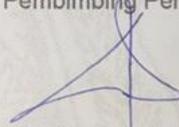
Menyetujui,

Pembimbing Utama



Prof. Dr. rer.nat. Marianti A. Manggau, Apt.
NIP. 19670319 199203 2 002

Pembimbing Pendamping



Ismail, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19850805 201404 1 001

Plt. Ketua Program Studi S1 Farmasi,
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin



Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19820810 200801 1 012

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini ;

Nama : Achmad Luthfi
NIM : N011171058
Program Studi : Farmasi
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul Uji Aktivitas Anti Agregasi Trombosit Ekstrak Metanol Alga Coklat (*Padina australis*) Secara In Vitro adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila dikemudian hari skripsi karya saya ini terbukti bahwa sebagian atau keseluruhannya adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 02 06 2021

Yang Menyatakan



Achmad Luthfi

UCAPAN TERIMA KASIH

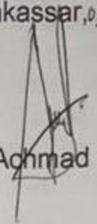
Subhanallahu Wal Hamdulillahu. Tiada kata kata yang patut diucapkan selai ungakapan syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada penulis sehingga skripsi ini bisa terselesaikan. Shalawat beserta salam tercurahkan kepada baginda Rasulullah Muhammad SAW yang selalu menjadi semangat perjuangan kita dalam setiap langkah kita menuju ke kehidupan yang lebih bermakna kedepannya. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada seluruh pihak khususnya kedua orang tua dan seluruh keluarga yang telah tulus dan ikhlas memberikan bantuan, dorongan, dan bimbingan baik moril maupun materil kepada penulis dalam menyelesaikan studi dan skripsi ini serta terkhusus kepada:

1. Ibu Prof. Dr. rer. nat. Marianti A. Manggau, Apt. selaku pembimbing utama sekaligus penasehat akademik penulis yang telah meluangkan waktu untuk memberikan ilmu, nasehat, arahan, masukan, dan bimbingan selama penulis menempuh pendidikan S1.
2. Bapak Ismail, S.Si., M.Si., Apt. selaku pembimbing pendamping penulis yang telah meluangkan waktu untuk memberikan ilmu, nasehat, arahan, masukan, dan bimbingan kepada penulis.
3. Bapak Muh. Aswad, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt. dan bapak Muh. Akbar Bahar, S.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt. selaku tim penguji yang telah memberikan masukan dan saran.

4. Dekan Fakultas Farmasi beserta jajarannya, staf dosen Fakultas Farmasi atas segala ilmu, nasehat, dan saran yang telah diberikan selama penulis menjalani kehidupan perkuliahan dan juga kepada seluruh tenaga kependidikan Fakultas Farmasi yang telah membantu penulis selama menempuh pendidikan di Fakultas Farmasi.
5. Unit Transfusi Darah PMI Kota Makassar yang telah membantu selama penelitian ini berlangsung.
6. Korps Asisten Laboratorium Biofarmasi-Farmokologi Toksikologi terima kasih telah menjadi keluarga serta atas segala ilmu yang telah diberikan selama menempuh pendidikan di Fakultas Farmasi terkhusus kepada ibu Syamsiyah, pak Muh. Nur Amir, kak Rudi Arfiansyah terima kasih yang sebesar-besarnya atas segala nasehat, dukungan dan arahan kepada Penulis.
7. Saudara-saudariku CLOSTRIDIUM (Farmasi Unhas 2017), terima kasih atas persaudaraan dan persahabatan yang telah kalian berikan sejak menginjakkan kaki di Fakultas Farmasi.
8. Saudara-saudariku Exynos 26 yang selalu ada memberikan bantuan dan dukungan kepada penulis semoga tetap dapat *Survive the Storms Together*.
9. Keluarga Mahasiswa Farmasi (Kemafar-UH) yang telah memberikan pengalaman yang sangat berarti kepada penulis selama menjalani kehidupan kampus.

Penulis sangat menyadari dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan dan jauh dari kesempurnaan sehingga saran dan kritikan yang membangun sangat diharapkan untuk penulis kedepannya. Akhir kata semoga apa yang penulis persembahkan ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan kedepannya. *Aamiin.*

Makassar, 02 06 2020



Achmad Luthfi

ABSTRAK

ACHMAD LUTHFI Uji Aktivitas Anti Agregasi Trombosit Ekstrak Metanol Alga Coklat (*Padina australis*) Secara In Vitro (dibimbing oleh Marianti A Manggau dan Ismail)

Alga coklat (*Padina australis*) salah satu jenis alga yang mengandung flavonoid yang berpotensi sebagai alternative pengobatan untuk penyakit kardiovaskular karena memiliki aktifitas sebagai anti agregasi trombosit. Aspirin merupakan obat yang paling umum digunakan dalam terapi anti agregasi trombosit namun efek samping yang disebabkan dapat meningkatkan perdarahan intrakranial dan gastrointestinal. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui golongan metabolit sekunder serta aktifitas anti agregasi trombosit dari ekstrak methanol alga coklat (*Padina australis*). Identifikasi senyawa dilakukan untuk memastikan kandungan senyawa dari ekstrak ini, kemudian dilanjutkan dengan pengujian aktivitas anti agregasi trombosit dari ekstrak alga coklat (*Padina australis*) secara in vitro pada *Platelet Rich-Plasma* (PRP) menggunakan metode *Light Transmission Aggregation* (LTA) pada konsentrasi 40 ppm, 80 ppm, dan 160 ppm serta menggunakan aspirin sebagai kontrol positif. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak metanol alga coklat (*Padina australis*) mengandung senyawa golongan saponin, terpenoid, dan flavonoid dengan persen agregasi trombosit pada ekstrak konsentrasi 40 ppm, 80 ppm, dan 160 ppm berturut-turut sebesar $29,995 \pm 0,471\%$, $30,009 \pm 0,647\%$, dan $30,232 \pm 0,673\%$ serta kontrol negatif sebesar $59,917 \pm 7,882\%$ dan kontrol positif $10,619 \pm 1,291\%$. Persen agregasi trombosit ekstrak metanol alga coklat (*Padina australis*) konsentrasi 40 ppm, 80 ppm, dan 160 ppm tidak berbeda nyata. Namun, persen agregasi trombosit antara ketiga kelompok uji dengan kontrol positif dan kontrol negatif berbeda nyata. Sehingga dari penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol alga coklat (*Padina australis*) yang mengandung metabolit sekunder golongan flavonoid, terpenoid dan saponin memiliki aktivitas anti agregasi trombosit pada PRP yang diinduksi dengan ADP.

Kata Kunci: ekstrak metanol alga coklat, *Padina australis* Hauck, metabolit sekunder, anti agregasi trombosit, aspirin.

ABSTRACT

ACHMAD LUTHFI In Vitro Test of Anti Platelet Aggregation Activity Metanol Extract Brown Algae (*Padina australis*) (guided by Marianti A Manggau dan Ismail)

Brown algae (*Padina australis*) is a species of algae that contains flavonoids is potentially as an alternative treatment for cardiovascular disease because of their anti-platelet aggregation activity. Aspirin is the most commonly used drug in anti-platelet aggregation therapy, but its side effects can increase intracranial and gastrointestinal bleeding. The aim of this study was to determine secondary metabolites and anti-platelet aggregation of brown algae methanol extract (*Padina australis*). Secondary metabolites identification was carried out to ensure the compound content of this extract, then continued with testing the anti-aggregation activity of platelets from brown algae methanol extract (*Padina australis*) in vitro on Platelet Rich-Plasma (PRP) using the Light Transmission Aggregation (LTA) method at a concentration of 40, 80, and 160 ppm and in this study aspirin was used as a positive control whereas deionitation water as negative control. The results showed that the metanol extract of brown algae (*Padina australis*) contained saponins, terpenoids, and flavonoids with percent platelet aggregation in extracts with concentrations 40 ppm, 80 ppm, and 160 ppm, respectively $29.995 \pm 0.471\%$, $30.009 \pm 0.647\%$, and $30.232 \pm 0.673\%$ and negative control at $59.917 \pm 7.82\%$ and $10.619 \pm 1.291\%$ positive control. The platelet aggregation percentages of metanol extract of brown algae (*Padina australis*) concentrations of 40 ppm, 80 ppm, and 160 ppm were not significantly different. However, the percent of platelet aggregation between the three test groups with positive control and negative control were significantly different. So from this study, it can be concluded that the metanol extract of brown algae (*Padina australis*) has anti-platelet aggregation activity on ADP-induced PRP.

Keywords: extract methanol of brown algae, *Padina australis* Hauck, secondary metabolites, anti platelet aggregation, aspirin.

DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	v
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	3
I.3 Tujuan Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1 Alga Coklat (<i>Padina Australis</i>)	4
II.1.1 Klasifikasi Alga Coklat (<i>Padina australis</i>)	4
II.1.2 Deskripsi Alga Coklat (<i>Padina australis</i>)	4
II.1.3 Kandungan Kimia	5
II.2 Ekstraksi	5
II.2.1 Metode Ekstraksi	6
II.3 Senyawa Metabolit Sekunder	8
II.3.1 Alkaloid	9

II.3.2 Flavonoid	10
II.3.3 Saponin	10
II.3.4 Terpenoid	11
II.4 Kromatografi Lapis Tipis	11
II.5 Trombosit	12
II.5.1 Anatomi Trombosit	12
II.5.2 Agregasi Trombosit	13
II.5.3 Terapi Anti Agregasi Trombosit	16
II.6 Pengujian Anti Agregasi Trombosit	19
II.6.1 <i>Light Transmission Aggregometry</i>	19
II.6.2 Impendensi Analisis Darah Utuh	20
II.6.3 Lumiagregometer	21
BAB III METODE KERJA	22
III.1 Alat dan Bahan	22
III.2 Metode Kerja	22
III.2.1 Penyiapan Simplisia	22
III.2.2 Proses Ekstraksi	23
III.2.3 Uji Pendahuluan	23
III.2.3.1 Uji Alkaloid	23
III.2.4 Uji Anti Agregasi Trombosit	24
III.2.5 Analisis Statistik	26
III.2.6 Pembahasan	26
III.2.7 Kesimpulan	26

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	27
IV.1 Ekstraksi dan Uji Pendahuluan	27
IV.2 Aktivitas Anti Agregasi trombosit	29
BAB V PENUTUP	34
V.1 Kesimpulan	34
V.2 Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	40

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil Ekstraksi Alga Coklat (<i>Padina australis</i>)	27
2. Hasil Uji Pendahuluan	28
3. Aktifitas Agregasi Trombosit Ekstrak Metanol Alga Coklat (<i>Padina australis</i>)	30
4. Perbandingan Aktifitas Agregasi Trombosit Kontrol Terhadap Ekstrak Uji	31

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Alga coklat (<i>Padina australis</i>)	4
2. Hasil pengujian identifikasi golongan Senyawa metabolit sekunder	44
3. Proses pengambilan sampel alga coklat (<i>Padina australis</i>)	47
4. Proses sortasi basah dan pencucian sampel	47
5. Proses pengeringan sampel	47
6. Proses penghalusan sampel	47
7. Penimbangan sampel	47
8. Proses ekstraksi	47
9. Penyaringan hasil maserasi	48
10. Proses penguapan	48
11. Ekstrak kental metanol alga coklat (<i>Padina australis</i>)	48
12. Proses metanol pada lempeng KLT	48
13. Lempeng dielusi	48
14. Pembuatan larutan ADP 5 μ M	48
15. Pembuatan larutan uji (40 ppm, 80 ppm, dan 160 ppm)	49
16. Pembuatan larutan aspirin	49
17. Proses inkubasi sebelum dan setelah penambahan ADP	49
18. Proses pengukuran agregasi platelet	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Penyiapan Simplisia dan Ekstraksi	40
2. Skema Uji Pendahuluan	41
3. Skema Uji Aktivitas Anti Agregasi Trombosit	42
4. Perhitungan Persen Rendemen Ekstrak	43
5. Hasil Uji Pendahuluan	44
6. Data Statistik	45
7. Dokumentasi Penelitian	47
8. Hasil Determinasi	51
9. Surat Permohonan Pembelian Darah PMI	5

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Sistem kardiovaskular merupakan sistem yang memiliki peran penting dalam mengalirkan darah ke seluruh tubuh. Gangguan fungsi pada sistem ini dapat menyebabkan timbulnya berbagai penyakit kardiovaskular (*cardiovascular disease*). Berdasarkan data *World Health Organization*, penyakit kardiovaskular terbukti menjadi penyebab kematian tertinggi di dunia dengan jumlah kematian pertahun 2016 sebanyak 17,9 juta jiwa dan diperkirakan akan meningkat hingga 22,2 juta jiwa pada tahun 2030 (WHO, 2017).

Secara umum penyakit kardiovaskular disebabkan karena adanya penyumbatan pada pembuluh darah berupa timbunan lemak (aterosklerosis) atau gumpalan darah akibat meningkatnya agregasi trombosit (aterotrombosit). Penyakit kardiovaskular yang disebabkan oleh penyumbatan pembuluh darah antara lain penyakit jantung koroner, emboli paru, stroke, dan thrombosis vena dalam (Whalen, 2019).

Salah satu upaya pengobatan yang dilakukan untuk mengobati penyakit kardiovaskular yaitu dengan terapi anti agregasi trombosit. Terapi ini merupakan terapi yang efektif untuk mengatasi sumbatan pada pembuluh darah yang disebabkan oleh adanya trombosis. Anti agregasi trombosit yang biasa digunakan yaitu aspirin yang berperan dalam menghambat TXA

sebagai pengaktivasi agregasi trombosit. Namun, efek samping yang ditimbulkan akibat penggunaan aspirin dapat meningkatkan risiko perdarahan saluran pencernaan sebesar 47% dan meningkatkan risiko perdarahan intrakranial sebesar 34% (Veronese dkk., 2020). Selain aspirin, klopidoogrel juga digunakan sebagai terapi penyakit kardiovaskular yang bekerja dengan menghambat reseptor P2Y₁₂ yang merupakan reseptor adenosin difosfat (ADP). Namun, efek samping yang ditimbulkan dari penggunaan klopidoogrel yaitu dapat meningkatkan risiko perdarahan (Tsai dkk., 2010). Tingginya risiko perdarahan akibat penggunaan obat-obat tersebut, mendorong pencarian obat baru (*drug discovery*) dari bahan alam yang dapat menekan agregasi trombosit dan mengurangi risiko perdarahan.

Salah satu bahan alam yang berpotensi menekan agregasi trombosit adalah Alga. Alga coklat (*Padina australis*) merupakan salah satu jenis alga yang cukup mudah ditemukan di perairan Indonesia khususnya di perairan Sulawesi Selatan. Berdasarkan penelitian Latifah dkk. (2019), alga coklat (*Padina australis*) yang diperoleh dari pulau lae-lae kota Makassar mengandung senyawa alkaloid, saponin, terpenoid/steroid, dan flavonoid. Golongan senyawa flavonoid merupakan senyawa polifenol yang memiliki berbagai macam efek farmakologi salah satunya yaitu anti agregasi trombosit. Efek anti agregasi trombosit pada flavonoid dengan cara menghambat pembentukan TXA₂ dengan cara menghambat enzim siklooksigenase, pencegahan peningkatan Ca²⁺ intraseluler, menghambat degranulasi sehingga sekresi granul tidak terjadi (Faggio dkk., 2017). Selain flavonoid,

terpenoid juga merupakan golongan senyawa yang memiliki aktifitas anti agregasi trombosit dengan mekanisme penghambatan aktifitas ADP sehingga agregasi trombosit tidak terjadi.

Berdasarkan uraian di atas, adanya kandungan flavonoid alga coklat (*Padina australis*) berpotensi sebagai anti agregasi trombosit, namun belum ada penelitian terkait pengujian potensi dari bahan alam ini. Oleh karena itu telah dilakukan penelitian terkait efek anti agregasi trombosit dari ekstrak metanol alga coklat (*Padina australis*).

I.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah pada penelitian ini yaitu:

1. Apakah golongan metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak metanol alga coklat (*Padina australis*)?
2. Apakah ekstrak metanol alga coklat (*Padina australis*) memiliki aktivitas anti agregasi trombosit pada darah yang diinduksi dengan ADP secara in vitro?

I.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. Untuk mengetahui golongan metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak metanol alga coklat (*Padina australis*).
2. Untuk mengetahui aktivitas anti agregasi trombosit ekstrak metanol alga coklat (*Padina australis*) pada darah yang diinduksi dengan ADP secara in vitro.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Alga Coklat (*Padina australis*)

II.1.1 Klasifikasi Alga Coklat (*Padina australis*)

Alga coklat (*Padina australis*) merupakan salah satu jenis makroalga dengan klasifikasi sebagai berikut (Subagio dan Kasim, 2019):

Kingdom : Plantae
Divisi : Phaeophyta
Kelas : Phaeopycea
Ordo : Dictyotales
Famili : Dictyotaceae
Genus : Padina
Spesies : *Padina australis* Hauck

II.1.2 Deskripsi Alga Coklat (*Padina australis*)



Gambar 1. Alga Coklat (*Padina australis*) (Subagio dan Kasim, 2019)

Padina australis Hauck merupakan salah satu jenis *phaeophyta* (alga coklat) yang menempel pada batu atau di daerah dengan terumbu

karang yang rata dan banyak ditemukan di perairan 2 sampai 20 meter dari bibir pantai atau pada daerah yang selalu tergenang air. Organ pelekak (*holdfast*) berbentuk *discoïd* atau cakram pipih berukuran 5-8 cm. Thallus terdiri dari beberapa helaian berbentuk menyerupai kipas dengan lebar 5 cm, tinggi 7 cm, berwarna coklat kekuningan, tepi luar helaian thallus menebal, helaian thallus melebar ke arah atas, mengerucut pada pangkal, permukaan atas mempunyai garis konsentris yang membentuk sekat atau segmen berwarna putih (Subagio & Kasim, 2019).

II.1.3 Kandungan Kimia Alga Coklat (*Padina australis*)

Berdasarkan hasil analisis (Maharany dkk., 2017) *Padina australis* Hauck mengandung protein sebanyak $1,05 \pm 0,09$ %, lemak sebanyak $0,58 \pm 0,01$ %, dan karbohidrat sebanyak $8,78 \pm 0,80$ %. Untuk kandungan mineral, *Padina australis* mengandung 10,22% kalsium, 1,48% kalium, dan 0,125% besi (Salosso dkk., 2020). Selain mineral tersebut, pada laga coklat ini juga teridentifikasi mineral seperti magnesium, natrium, tembaga, dan zinc (Maharany dkk., 2017). *Padina australis* mengandung metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, tannin, dan terpenoid serta memiliki kandungan senyawa bioaktif yang telah teridentifikasi seperti asam 14-metil ester pentadekanoat, asam 1,2- benzenedi karboksilat, asam 10-metil ester oktadekanoat, asam oleat, asam 1,2-hidroksi metil ester oktadekanoat (Wijayanti dkk, 2020) (Shiney & Nadu, 2014). Selain itu, *Padina australis* juga mengandung senyawa phytol dan α -tokoferol (vitamin E) yang memiliki aktifitas anti oksidan (Haryani & Lohitasari, 2019) (Maharany dkk., 2017). Dari

banyaknya golongan senyawa yang dikandung oleh *Padina australis* Hauck, alga ini terbukti memiliki efek farmakologis antara lain sebagai anti tumor, anti kanker, anti bakteri, anti inflamasi, anti diabetes, anti hipertensi dan antioksidan (Chellappan dkk., 2020)(Handayani & Zuhrotun, 2013).

II.2 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan substansi senyawa bahan alam dari campuran atau dari sumber bahan alam yang dengan menggunakan pelarut atau penyari yang sesuai. Pemilihan metode ekstraksi dan cairan penyari yang digunakan pada saat pemisahan senyawa bahan alam bergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi.

II.2.1 Metode Ekstraksi

Metode-metode ekstraksi yang biasa digunakan untuk menyari metabolit-metabolit sekunder dari suatu tanaman antara lain (Mukhtarini, 2011):

II.2.1.1 Maserasi

Maserasi merupakan metode ekstraksi menggunakan pelarut dan dilakukan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada suhu ruang hingga mencapai kesetimbangan senyawa antara penyari dan dalam sel tumbuhan. Maserasi dilakukan dengan merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari kemudian cairan penyari menembus dinding sel sehingga masuk ke dalam rongga sel yang berisi zat aktif dan akan larut ke cairan penyari menyebabkan peningkatan konsentrasi cairan dalam sel, larutan

dengan konsentrasi yang tinggi terdesak keluar untuk mencapai kesetimbangan. Peristiwa ini berlangsung secara terus menerus hingga terjadi kesetimbangan antara larutan di dalam dan di luar sel. Hasil ekstraksi dipisahkan dari simplisia dengan cara disaring (Mukhtarini, 2011) (Copper & Nicola, 2014). Metode ekstraksi ini dapat mencegah kerusakan pada senyawa-senyawa yang bersifat termolabil namun pelarut ini memerlukan waktu yang cukup lama (Harborne, 1984).

II.2.1.2 Perkolasi

Perkolasi merupakan proses ekstraksi dengan cara melewatkan cairan penyari secara lambat pada simplisia dalam sebuah perkulator. Cairan penyari akan mengalir dari atas ke bawah melawati serbuk simplisia kemudian cairan penyari akan melarutkan zat aktif dari serbuk yang dilalui hingga mencapai keadaan jenuh. Gerakan cairan penyari disebabkan karena adanya gravitasi namun gerakan cairan penyari ke bawah akan terhambat karena adanya daya kapiler yang terbentuk antara serbuk simplisia yang cenderung akan menahan cairan penyari. Hal-hal yang dapat mempengaruhi hasil ekstraksi dari metode ini yaitu massa jenis cairan penyari, viskositas cairan penyari, tegangan permukaan, difusi, osmosis, daya kapiler, dan gaya gesekan (Mukhtarini, 2011) (Copper & Nicola, 2014). Metode ekstraksi ini dapat mengekstraksi secara optimal karena cairan penyari yang mengalir simplisia selalu baru namun apabila ukuran simplisia yang digunakan tidak homogen maka cairan penyari akan sulit mencapai semua simplisia sehingga

proses ekstraksi kurang maksimal dan juga cairan penyari yang digunakan cukup banyak (Harborne, 1984).

II.2.1.3 *Ultrasound-Assisted Solvent Extraction*

Ultrasound-Assisted Solvent Extraction merupakan metode maserasi yang dimodifikasi dengan menggunakan bantuan gelombang suara frekuensi tinggi (melebihi 20 kHz) atau gelombang ultrasonik. Gelombang ultrasonik ini dapat memberikan tekanan mekanik pada sel sehingga dapat menyebabkan kerusakan atau pecahnya dinding sel. Kerusakan pada sel tumbuhan ini dapat meningkatkan mempercepat dan mengefisienkan proses ekstraksi (Harborne, 1984) (Copper & Nicola, 2014).

II.2.1.4 *Soxhlet*

Soxhlet merupakan metode ekstraksi metode panas dengan menempatkan serbuk simplisia ke dalam sebuah wadah berbentuk selubung di tabung selongsong yang terletak di atas labu alas bulat berisi cairan penyari yang dipanaskan di bawah suhu refluks (Harborne, 1984). Metode ekstraksi ini terjadi secara kontinyu dan sampel terkestraksi dengan pelarut yang tidak mengandung senyawa terlarut karena hasil dari kondensasi namun metode ini tidak cocok digunakan pada senyawa yang bersifat termolabil (Mukhtarini, 2011).

II.2.1.5 Refluks

Refluks merupakan metode ekstraksi panas dengan menenpatkan simplisia bersama pelarut yang dipanaskan di sebuah wadah dan terhubung

dengan sebuah kondensor. Cairan penyari yang digunakan dipanaskan hingga titik didih cairan tersebut dan uap yang ditimbulkan akan terkondensasi di kondensor (Copper & Nicola, 2014).

II.3 Senyawa Metabolit Sekunder

Senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa yang disintesis oleh tumbuhan, hewan maupun mikroba yang digunakan untuk menunjang kehidupan makhluk hidup namun bukan menjadi senyawa esensial yang tidak terlibat langsung dalam pertumbuhan, perkembangan, dan reproduksi seperti gula, asam amino dan asam lemak namun senyawa metabolit sekunder biasa berperan dalam pertahanan terhadap musuh. Senyawa-senyawa metabolit sekunder banyak dimanfaatkan dalam bidang farmasi sebagai senyawa kandidat obat karena memiliki aktifitas farmakologis. Selain menjadi kandidat obat baru, senyawa metabolit sekunder digunakan sebagai senyawa penuntun (*lead compound*) untuk melakukan optimasi pada saat proses sintesis sehingga diperoleh senyawa yang lebih poten dan memiliki efek toksisitas minim. Penggolongan utama senyawa-senyawa metabolit sekunder antara lain alkaloid, flavonoid, terpenoid, dan saponin.

II.3.1 Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa organik yang mengandung unsur nitrogen dalam kerangka strukturnya serta atom nitrogen menjadi penyusun system heterosiklik (amin siklik). Alkaloid diklasifikasikan berdasarkan asam amino yang menjadi prekursornya. Alkaloid merupakan senyawa metabolit

sekunder yang paling beragam dalam senyawa bahan alam dimana terdapat senyawa mulai dari senyawa sederhana hingga senyawa kompleks (Makkar dkk., 2007). Alkaloid biasanya bersifat toksik ke manusia namun terdapat juga banyak alkaloid yang memiliki aktifitas fisiologis dan neurologus sehingga golongan senyawa ini banyak dimanfaatkan dalam dunia farmasi (Copper & Nicola, 2014). Pengidentifikasian senyawa alkaloid cukup sulit dilakukan dengan menggunakan satu metode karena tingginya keberagaman kimia dari senyawa ini. Identifikasi senyawa ini juga cukup sulit dilakukan tanpa mengetahui atau memperkirakan jenis alkaloidnya. Selain itu, luasnya kelarutan dari senyawa-senyawa golongan alkaloid dan karakteristik dari golongan senyawa ini dapat menyebabkan gagalnya pengidentifikasian senyawa alkaloid pada beberapa tanaman (Harborne, 1984).

II.3.2 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa organik yang terdapat hampir di semua tumbuhan. Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang tersusun dari struktur polifenol dengan struktur khas yaitu cincin C₆-C₃-C₆. flavonoid diklasifikasikan menjadi beberapa kelompok berdasarkan derajat okidasi cincin C₃. Secara umum flavonoid terbagi menjadi empat kelompok yaitu antosianin, flavon, flavonol, dan isoflavon. Dalam bentuk alaminya, flavonoid terdapat juga dalam bentuk glikosida. Senyawa ini juga telah diketahui memiliki aktifitas farmakologis seperti sebagai anti oksidan, anti mikroba, anti inflamasi, anti mutagenis, dan anti karsinogenik (Copper & Nicola, 2014).

II.3.3 Saponin

Saponin merupakan senyawa glikosida amfipatik tersusun atas steroid dengan aglikon triterpenoid dan terikat dengan satu atau lebih gugus polisakarida. Saponin dicirikan oleh aktivitas hemolitik dan sifat berbusa ketika dikocok dengan kuat di dalam larutan yang berperan memberikan rasa pahit dan aktivitas astringen (Copper & Nicola, 2014).

II.3.4 Terpenoid

Terpen merupakan grup senyawa bahan alam yang paling banyak dan beragam dan umumnya ditemukan pada tanaman. Terpen terbentuk dari isoprene atau isopentana. Isoprene yang terbentuk dari 5 atom karbon akan berikatan dengan dua atau lebih isoprene lain akan membentuk terpenoid (Copper & Nicola, 2014). Triterpenoid merupakan senyawa yang tersusun dari 30 atom karbon atau terbentuk dari 6 unit isoprene. Berdasarkan struktur kimianya, triterpenoid dapat dikelompokkan menjadi triterpenoid linear, monosiklik, disiklik hingga pentasiklik. Triterpenoid yang terdapat di alam dapat ditemukan dalam triterpenoid bentuk bebas maupun berikatan dengan gula atau ester (du, 2014).

II.4 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan sebuah metode yang dapat digunakan untuk memisahkan dan menentukan secara kuantitatif senyawa baik senyawa organik maupun senyawa anorganik. KLT hingga saat ini telah banyak dikembangkan dan digunakan diberbagai bidang seperti di bidang

pengembangan pengobatan klinis, analisis farmasi, skrining pengembangan obat baru dan bidang toksikologi. Pemisahan yang terjadi pada metode ini berdasarkan pada interaksi antara senyawa dengan fase diam dan fase gerak atau biasa dikenal dengan prinsip *like dissolve like*. Pada prinsip ini senyawa-senyawa akan terpisah berdasarkan tingkat kepolaran dari senyawa tersebut dan akan terjerap di fase diam atau akan terikut pada fase gerak bergantung pada kemiripan dari kepolaran senyawa terhadap fase diam atau fase gerak. Fase diam yang umumnya digunakan pada metode ini yaitu fase diam yang terbuat dari silika pada lempeng aluminium maupun lempeng kaca dan fase gerak yang digunakan pada metode ini yaitu pelarut-pelarut organik (Fried & Sherma, 2017).

Penentuan hasil KLT berupa noda dapat ditentukan berdasarkan perbandingan antara jarak posisi noda yang terjerap pada fase diam dan jarak tempuh fase gerak terhadap fase diam atau biasa disebut faktor retensi (R_f). Selain penentuan berdasarkan nilai R_f dari noda yang terpisah, hasil dari KLT juga ditentukan secara visual baik secara fisika maupun secara kimia. Visualisasi noda secara fisika dapat dilakukan dengan fluoresensi lempeng KLT di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm dan secara kimia dilakukan dengan menyemprotkan pereaksi seperti H_2SO_4 pada lempeng KLT sehingga noda hasil pemisahan dapat dilihat tanpa bantuan sinar UV. Selain itu, terdapat pereaksi spesifik yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa-senyawa tertentu seperti penggunaan pereaksi dragendorf untuk mengidentifikasi senyawa flavonoid (Hahn-deinstrop, 2007).

II.5 Trombosit

II.5.1 Anatomi Trombosit

Trombosit atau biasa juga disebut platelet merupakan salah satu komponen tak berinti sel, berukuran 1-4 μm dengan bentuk tidak beraturan. Trombosit terbentuk dari megakariosit di sumsum tulang dan berjumlah sekitar 150.000 hingga 300.000 tiap mikroliter darah. Usia trombosit dalam darah bekisar 8 hingga 12 hari kemudian akan kehilangan fungsinya dan tereliminasi dari sirkulasi darah melalui system makrofag khususnya makrofag yang terdapat pada limpa (J. E. Hall, 2016).

Trombosit memiliki banyak komponen dengan beragam fungsi di dalam selnya seperti aktin, myosin dan trombostenin berfungsi pada saat trombosit pecah atau berkontraksi; retikulum endoplasma dan badan golgi berfungsi menyintesis enzim serta berfungsi sebagai tempat penyimpanan ion kalsium; mitokondria berfungsi membentuk adenosine trifosfat (ATP) dan adenosine difosfat (ADP); dan system enzim berfungsi menyintesis prostaglandin berupa hormon yang berperan apabila ada kerusakan vascular atau jaringan (Rumbaut & Thiagarajan, 2010).

Pada permukaan membran trombosit dilapisi oleh glikoprotein yang tidak akan melekat pada permukaan endotel normal namun akan melekat pada permukaan endotel yang mengalami kerusakan. Membrane trombosit mengandung sangat banyak fosfolipid yang akan teraktivasi secara bertingkat pada proses pembekuan darah (Duncan & Patel, 2017) (Gardiner dkk., 2014).

II.5.2 Agregasi Trombosit

Agregasi trombosit merupakan salah satu sistem hemostatis tubuh yang mencegah terjadinya perdarahan secara berlebihan ketika terdapat pembuluh darah yang mengalami kerusakan. Namun, selain menjadi sistem hemostatis tubuh agregasi trombosit juga dapat membentuk thrombosis yang menjadi penyebab beberapa penyakit seperti infark miokard, *stroke*, penyakit jantung koroner, trombosis pembuluh darah tepi, dan lain-lain (WHO, 2017) (Maiti dkk., 2017).

Agregasi trombosit merupakan suatu proses biokimia yang cukup kompleks di mana terdapat cukup banyak komponen yang berperan. Secara umum proses agregasi trombosit terdiri dari tiga tahap yaitu adhesi trombosit, sekresi trombosit dan agregasi trombosit (Hoseeinzadegan & Tafti, 2017).

Adhesi trombosit merupakan proses menempelnya trombosit ke pembuluh darah yang mengalami kerusakan. Proses ini terjadi diperantarai oleh *von Willebrand Factor* (vWF) sebagai jembatan yang menghubungkan trombosit melalui glikoprotein Ib (GPIb) pada permukaan trombosit dengan kolagen yang terdapat pada permukaan pembuluh darah yang rusak atau pada subendotel. Ketika trombosit telah menempel, kolagen pada subendotel akan menstimulus trombosit untuk melakukan perubahan bentuk menjadi lebih lonjong (*spherical*) kemudian akan membentuk pseudopod yang berguna untuk memperluas area permukaan dari trombosit sehingga trombosit yang

lain dapat menempel untuk membentuk bekuan (Hoseeinzadegan & Tafti, 2017) (Rumbaut & Thiagarajan, 2010).

Tahapan selanjutnya pada agregasi trombosit yaitu tahapan sekresi. Setelah trombosit menempel pada subendotel dan berubah bentuk maka trombosit akan menyekresikan komponen-komponen biokimia yang akan berperan pada agregasi trombosit terdapat pada granul. Terdapat tiga jenis granul pada trombosit yang akan menyekresikan komponen-komponen biokimia antara lain α granul, granul lisosomal, dan *dense granule*. α granul merupakan organel penyekresi terbanyak yang terdapat pada trombosit dimana granul ini mengandung komponen-komponen yang berperan pada adhesi trombosit seperti vWF, fibrinogen, fibronektin, vitronektin, dan trombospendingin. Komponen yang disekresikan oleh α granul memiliki peran penting dalam menjaga penempelan trombosit baik penempelan trombosit dengan endotel pada permukaan pembuluh darah maupun antara sesama trombosit yang akan membentuk thrombus. Selanjutnya granul sebagai penyekresi terbesar kedua setelah α granul yaitu *dense granule*. *Dense granule* mengandung kebanyakan molekul-molekul berukuran berukuran kecil seperti ADP, ATP, serotonin, pirofosfat, polifosfat dan ion kalsium konsentrasi tinggi. Komponen-komponen yang disekresikan oleh *dense granule* ini memiliki peran penting dalam hemostasis primer dan menstimulasi agregasi trombosit. Selanjutnya granul lisosomal yang mengandung asam hidrolase seperti cathepsin, heksosaminidase, β -galaktosidase, arylsulfatase, β -glukoronidase dan asam fosfatase. Komponen-komponen yang dikandung granul ini

berperan dalam proses fagositosis (Wecker, 2010)(Rumbaut & Thiagarajan, 2010).

Tahapan selanjutnya adalah agregasi trombosit yakni tahapan dimana terjadi pelekatan antara sesama trombosit. Tahapan ini akan berlangsung apabila terjadi aktivasi dan stimulus pada trombosit dan terbagi menjadi dua fase yakni agregasi primer atau *reversible aggregation* dan agregasi sekunder atau *irreversible aggregation*. Pada fase agregasi primer, ion kalsium yang dilepaskan oleh *dense granul* menyebabkan peningkatan kadar kalsium intrasel yang akan mengaktivasi enzim fosfolipase A₂ sehingga meningkatkan sintesis tromboksan A₂ (TXA₂) yang berperan sebagai penginduksi agregasi trombosit, mengatur kadar kalsium intraseluler dan menyebabkan vasokonstriksi. Selain TXA₂, ADP juga merupakan penginduksi agregasi yang bekerja dengan ion bivalen seperti Ca²⁺, Mg²⁺, dan fibrinogen sebagai kofaktor (Paniccia dkk., 2015). ADP akan berikatan dengan reseptor P2Y₁₂ kemudian menginduksi perubahan bentuk trombosit dari cakram menjadi lonjong pseudopod. Selanjutnya ADP akan menyebabkan terekspresinya kompleks kalsium-GPIIb/IIIa pada permukaan trombosit dan berikatan dengan fibrinogen membentuk ikatan seperti jembatan. Ikatan ini yang akan memfasilitasi agregasi platelet pada fase agregasi primer. Selanjutnya fase agregasi sekunder terjadi ketika kadar ADP, serotonin, dan epinefrin meningkat yang akan menyebabkan terjadinya agregat trombosit yang tidak dapat terlepas kembali atau *irreversible aggregation* (Pearce dkk., 2020)(Meikle dkk., 2017).

II.5.3 Terapi Anti Agregasi Trombosit

Terapi anti agregasi trombosit merupakan terapi yang berperan pada penyakit kardiovaskular dengan cara menghambat trombosit beragregasi. Trombosit beragregasi diatur oleh tiga kelompok senyawa. Kelompok pertama merupakan senyawa yang berasal dari luar trombosit dan berinteraksi dengan reseptor pada membran trombosit, kelompok kedua merupakan senyawa yang dihasilkan dari trombosit dan berinteraksi dengan reseptor pada membran trombosit, kelompok ketiga merupakan senyawa yang dihasilkan di dalam trombosit dan juga bekerja di dalam trombosit. Terapi-terapi anti agregasi secara umum mempengaruhi tiga kelompok senyawa ini (Michelson, 2011)(R. Hall & Mazer, 2011).

II.5.3.1 Penghambat Produksi TXA₂

Asam arakidonat merupakan salah satu senyawa yang banyak dikandung oleh trombosit. Pada saat trombosit teraktivasi, asam arakidonat akan dilepaskan kemudian akan menyintesis tromboksan A₂ dengan bantuan enzim siklooksigenase (Pearce dkk., 2020). Tromboksan A₂ merupakan salah satu penginduksi agregasi trombosit yang poten berperan dengan mengatur kadar kalsium intraseluler dan menyebabkan vasokonstriksi sehingga penghambatan proses sintesis TXA₂ dapat mencegah terjadinya agregasi trombosit. Aspirin merupakan salah satu terapi yang termasuk golongan anti inflamasi non steroid (AINS) dan pada dosis rendah dapat berperan sebagai agen anti agregasi platelet dengan cara menghambat enzim siklooksigenase secara *irreversible* sehingga sintesis TXA₂ tidak berlangsung (J. E. Hall, 2016).

II.5.3.2 Penghambat Reseptor P2Y₁₂

P2Y₁₂ merupakan reseptor ADP di mana ADP merupakan salah satu penginduksi poten agregasi trombosit yang bekerja dengan cara menyebabkan perubahan bentuk trombosit, membantu terbentuknya kompleks kalsium-GP IIb/IIIa dan fibrinogen serta pada konsentrasi tinggi menyebabkan agregasi trombosit secara *irreversible* (Michelson, 2011). Penghambatan reseptor P2Y₁₂ dapat menyebabkan tidak berlangsungnya penginduksian agregasi trombosit oleh ADP sehingga agregasi trombosit tidak terjadi. Obat-obatan golongan ini seperti klopidogrel dan tiklodipin bekerja menghambat reseptor P2Y₁₂ secara *irreversible* untuk mencegah kerja dari ADP (Katzung, 2018).

II.5.3.3 Penghambat Reseptor Glikoprotein IIb/IIIa

Reseptor Glikoprotein IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) merupakan reseptor yang terdapat pada permukaan trombosit. GP IIb/IIIa akan membentuk kompleks bersama kalsium dan fibrinogen membentuk ikatan seperti jembatan dan menjadi tempat berikatannya trombosit dengan trombosit yang lain. Penghambatan reseptor ini akan menyebabkan pelekatan antara trombosit tidak terjadi karena ikatan berbentuk jembatan sebagai tempat melekatnya trombosit tidak terbentuk. Obat-obatan yang termasuk penghambat reseptor GP Iib/IIIa yaitu abciximax, tirofiban, dan eptifibatid (Pearce dkk., 2020).

II.5.3.4 Penghambat PDE

Fosfodiesterase (PDE) merupakan enzim yang terdapat pada otot halus pembuluh darah. Anillin dapat mendegradasi cAMP menjadi AMP dan akan teraktivasi bersama protein kinase G menyebabkan relaksasi otot polos pembuluh darah atau pelebaran pembuluh darah serta membantu kerja lapisan endotel pada tahap agregasi. Clistazol dan dipiridamol merupakan obat-obatan yang berperan dalam menghambat kerja enzim fosfodiesterase (PDE-5) sehingga tahapan awal agregasi trombosit ketika terjadi kerusakan vaskular tidak terjadi (Michelson, 2011).

II.6 Pengujian Anti Agregasi Trombosit

Agregasi trombosit merupakan rangkaian reaksi biokimia yang melibatkan banyak komponen (Paniccia dkk., 2015). Pengukuran agregasi trombosit dapat dilakukan dengan berbagai metode yang dapat dilakukan secara *in vitro* antara lain:

II.6.1 *Light Transmition Platelet Aggregation*

Light transmition platelet aggregation (LTA) merupakan metode pengukuran agregasi trombosit dan menjadi metode pengukuran standar beberapa fungsi trombosit dengan menggunakan sampe *platelet rich plasma* (PRP) dan penambahan agonis. Metode pengukuran ini berdasarkan pada kenaikan transmisi cahaya melalui sampel PRP sebelum dan setelah penambahan agonis atau dengan menggunakan metode turbidimetri. Setelah penambahan agonis sampel PRP akan menjadi lebih atau jernih karena

terjadinya agregasi trombosit sehingga transmisi cahaya yang melewati sampel akan meningkat setelah penambahan agonis. Agonis yang biasa digunakan pada metode pengukuran ini antara lain ADP, kolagen, serta epinefrin. Metode memiliki kelebihan dibandingkan metode lain karena metode ini menjadi metode yang dijadikan standar dalam menentukan fungsi trombosit, dapat mengetahui penyebab gangguan agregasi dengan memodifikasi agonis yang digunakan, serta metode ini cukup sensitif dalam pengujian terapi-terapi anti agregasi trombosit. Pemantauan terapi-terapi anti trombosit dengan menggunakan metode ini dapat memprediksi *major adverse cardiovascular events* (MACE) pada pasien-pasien yang mengalami gangguan kardiovaskular dengan resiko tinggi. (Paniccia dkk., 2015).

II.6.2 Impedansi Analisis Darah Utuh

Impedansi analisis darah utuh merupakan salah satu metode pengukuran fungsi trombosit dengan menggunakan darah utuh sebagai sampel pengujian. Metode pengukuran ini berdasarkan prinsip aktivasi penempelan reseptor-reseptor yang terdapat pada permukaan trombosit ke permukaan endothelium buatan yang terbuat dari dua elektroda dalam sampel darah utuh. Agregasi trombosit yang terjadi dapat diukur ketika adanya peningkatan impedansi elektrik. Peningkatan impedansi elektrik terjadi ketika trombosit yang terdapat pada darah beragregasi pada endothelium buatan atau pada elektroda (Paniccia dkk., 2015).

II.6.3 Lumiagregometer

Lumiagregometer merupakan metode pengukuran fungsi agregasi trombosit dengan cara mengukur jumlah nukleotida anillin yang disekresikan dari granul trombosit pada saat agregasi terjadi. Metode pengukuran ini mengevaluasi adenosine trifosfat (ATP) yang dilepaskan oleh trombosit menggunakan agonis dan mengukur nukleotida adenine dengan teknik luminesensi. Pada metode [pengukuran ini dapat menggunakan *platelet rich plasma* (PRP), trombosit yang dicuci/ *washed platelet*, atau *washed blood*. ATP yang dilepaskan oleh *dense granule* kemudian dikonversi menjadi kemudian akan bereaksi dengan reagen Luciferin-Luciferase kemudian diukur pancaran cahaya yang dihasilkan oleh nukleotida adenine menggunakan lumi-agregometer. Metode ini dapat digunakan sebagai skrining awal pada pasien yang mengalami gangguan fungsi trombosit seperti kelainan pada sekresi maupun pada pasien yang mengalami trombositopenia (Paniccia dkk., 2015).