



**UJI AKTIVITAS *IN VITRO*
ANTIPLATELET DAN ANTIKOAGULAN FRAKSI N-HEKSANA
KULIT BATANG BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.)**

SKRIPSI

Oleh

**Alifia Rahardhini Nourma Lubis
NIM 112210101021**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**UJI AKTIVITAS *IN VITRO*
ANTIPLATELET DAN ANTIKOAGULAN FRAKSI N-HEKSANA
KULIT BATANG BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.)**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Pendidikan Strata Satu Fakultas Farmasi dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh

**Alifia Rahardhini Nourma Lubis
NIM 112210101021**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Puji Hartini dan Ayahanda A. Rahmat Nur Lubis tercinta;
2. Adik Bryan Ahmad Affan Lubis dan Cyril M. Febriawan Lubis tercinta;
3. Bapak dan Ibu guru di TK Swadharma Bhakti, SDN Pucang III Sidoarjo, SMP Negeri I Sidoarjo, SMA Negeri 4 Sidoarjo, serta Bapak dan Ibu dosen di Fakultas Farmasi Universitas Jember;
4. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTTO

Barang siapa bertakwa kepada Allah niscaya Dia akan membukakan jalan keluar baginya, dan Dia memberinya rezeki dari arah yang tidak disangka-sangkanya. Dan barang siapa bertawakal kepada Allah, niscaya Allah akan mencukupkan (keperluan)nya.
(terjemahan Surat At-Talaq ayat 2-3)¹⁾

Paling tidak ada tiga kata yang harus kita hindarkan dari pikiran kita, yaitu *I Can't*, *Impossible*, *I Know*.²⁾

Stop Learning Stop Growing.²⁾

¹⁾ Hatta, Ahmad. 2011. *Tafsir Qur'an Per Kata*. Jakarta: Maghfirah Pustaka.

²⁾ Rif'an, A. R. 2013. *My Life My Adventure*. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Alifia Rahardhini Nourma Lubis

NIM : 112210101021

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul: “ Uji Aktivitas *in vitro* Antiplatelet dan Antikoagulan Fraksi n-Heksana Kulit Batang Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada instansi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 29 Juli 2015

Yang menyatakan,



Alifia Rahardhini Nourma Lubis

NIM 112210101021

SKRIPSI

UJI AKTIVITAS *IN VITRO* ANTIPLATELET DAN ANTIKOAGULAN FRAKSI N-HEKSANA KULIT BATANG BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.)

Oleh :

Alifia Rahardhini Nourma Lubis
NIM 112210101021

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si., Apt.

Dosen Pembimbing Anggota : Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Uji Aktivitas *in vitro* Antiplatelet dan Antikoagulan Fraksi n-Heksana Kulit Batang Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*)” telah diuji dan disahkan pada:


hari, tanggal : Rabu, 29 Juli 2015


tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,


Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si., Apt.


Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt.

NIP 197807282005012001


NIP 198107232006042002

Tim Penguji:

Penguji I,

Penguji II,


Afifah Machlaurin, S.Farm., Apt., M.Sc.


Eka Deddy Irawan, S.Si., M.Sc., Apt.

NIP 198501262008012003

NIP 197503092001121001

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,


Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm.

NIP 197604142002122001

RINGKASAN

Uji Aktivitas *in vitro* Antiplatelet dan Antikoagulan Fraksi n-Heksana Kulit Batang Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*); Alifia Rahardhini Nourma Lubis; 112210101021; 2015; 43 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Hemostasis merupakan suatu proses yang kompleks untuk mengontrol pendarahan dan terdiri dari berbagai macam komponen dalam sistem pembekuan darah yang teraktivasi akibat rusaknya pembuluh darah. Ketidakseimbangan sistem hemostasis akan mengakibatkan kelainan patologis seperti pendarahan spontan karena darah tidak dapat membeku dan terbentuknya trombus akibat sumbatan yang berlebih. Trombus dapat memicu penyakit vaskuler seperti infark miokard, emboli otak (*stroke*), dan penyakit vaskuler lain. Pada tahun 2008 terjadi kematian akibat penyakit kardiovaskuler sebanyak 17,3 juta jiwa dan akan mengalami peningkatan yang signifikan di tahun 2030 menjadi 23,3 juta jiwa. Penyakit kardiovaskuler di Indonesia diketahui merupakan penyebab kematian terbesar sebanyak 37% dari total kematian yang diakibatkan oleh berbagai penyakit.

Belimbing wuluh merupakan tanaman asli Indonesia yang memiliki banyak khasiat dalam hal pengobatan, salah satunya diduga memiliki aktivitas antitrombosis yaitu antiplatelet, antikoagulan, dan trombolitik. Berdasarkan penelitian yang pernah dilakukan, terbukti bahwa fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh mempunyai aktivitas trombolitik 7,81%, lebih besar dibanding aktivitas ekstrak metanol 4,11%. Hasil uji fitokimia kulit batang belimbing wuluh dalam penelitian tersebut mengandung senyawa alkaloid, saponin, dan flavonoid.

Tujuan penelitian adalah mengetahui aktivitas antiplatelet dan antikoagulan dari fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh. Hasil penelitian diharapkan dapat digunakan sebagai dasar teori bagi penelitian selanjutnya mengenai manfaat kulit batang belimbing wuluh.

Uji aktivitas antiplatelet dilakukan dengan mengukur serapan plasma pada *platelet rich plasma* (PRP) sebelum dan sesudah diinduksi dengan *adenosine diphosphate* (ADP). Uji aktivitas antikoagulan dilakukan dengan menentukan perpanjangan waktu pembekuan yang meliputi *activated partial thromboplastin time* (aPTT) dan *prothrombin time* (PT). Analisis data untuk pengujian antiplatelet dan antikoagulan dilakukan menggunakan *One Way Anova* yang kemudian dilanjutkan dengan uji *Least Significantly Difference* (LSD).

Pengujian aktivitas antiplatelet terhadap fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh mengalami penurunan persentase agregasi platelet. Penurunan agregasi platelet terjadi pada kelompok kontrol negatif; konsentrasi uji 0,25; 0,5; 1; dan 2 mg/ml yang menghasilkan persen agregasi secara berturut-turut yaitu $54,923 \pm 1,648 \%$; $41,046 \pm 0,749 \%$; $30,060 \pm 0,444 \%$; $10,174 \pm 0,468 \%$; dan $9,490 \pm 0,179 \%$. Pengujian aktivitas antikoagulan menggunakan fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh dengan konsentrasi 2 mg/ml (konsentrasi yang menunjukkan aktivitas terbesar pada uji antiplatelet). Hasil pengujian aktivitas antikoagulan pada PPP mengalami perpanjangan waktu koagulasi PT menjadi 1,5 kali dan aPTT menjadi 1,1 kali.

Berdasarkan hasil pengujian dapat disimpulkan bahwa fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh selain memiliki aktivitas trombolitik juga memiliki aktivitas antiplatelet dan antikoagulan. Aktivitas antiplatelet ditandai dengan penurunan persentase agregasi platelet, sedangkan aktivitas antikoagulan ditandai dengan perpanjangan waktu koagulasi. Fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh memiliki aktivitas antikoagulan pada jalur ekstrinsik (perpanjangan PT) dan jalur intrinsik (perpanjangan aPTT).

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul: “Uji Aktivitas *in vitro* Antiplatelet dan Antikoagulan Fraksi n-Heksana Kulit Batang Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Allah SWT, dengan izin-Nya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir dan mencapai gelar Sarjana Farmasi.
2. Orangtua tercinta Nenek Maisarah, Alm. Kakek Kasri, Ibu Puji Hartini dan Ayah A. Rahmat Nur Lubis terima kasih atas kasih sayang tulus, perhatian, kesabaran, dukungan, motivasi serta do'a yang selalu hadir dalam setiap langkah penulis selama ini serta Adik Bryan Ahmad Affan Lubis, Dedek Cyril Muhammad Febriawan Lubis, dan segenap keluarga besar penulis yang telah memberikan motivasi, dukungan, dan do'a;
3. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
4. Ibu Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si., Apt. selaku Dosen Pembimbing Akademik dan Dosen Pembimbing Utama serta Ibu Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku Dosen Pembimbing Anggota atas waktu, kesabaran, perhatian dalam membimbing dan petunjuk yang diberikan sampai terselesaikannya penulisan skripsi ini;
5. Ibu Afifah Machlaurin, S.Farm., Apt., M.Sc. dan Bapak Eka Deddy Irawan, S.Si., M.Sc., Apt. sebagai dosen penguji yang banyak memberikan kritik, saran dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;

6. seluruh dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
7. Bu Widi dan Mbak Anggra selaku teknisi Laboratorium Fitokimia serta Mbak Indri dan Mbak Dinik selaku teknisi Laboratorium Farmasi Klinik atas dukungan semangat dan bantuan selama penulis menyelesaikan penelitian;
8. segenap pegawai Laboratorium Prosenda Jember yang telah membantu pengujian dalam skripsi ini;
9. rekan skripsiku Prisma Wahyuning Inayah yang telah membantu analisis, memberi semangat dan dukungan selama penelitian;
10. sahabat “9 Star Pharmacists” Estika, Lintang, Rara, Meme, Pus, Prisma, Ika, dan Icha yang telah menemani dan memberi dorongan/semangat serta pengalaman berharga selama menjalani kehidupan di Jember;
11. teman-teman seperjuangan Devi, Iik, Oren, Vita, Habibi, Tiwi, Yeni, Risti, Fitria dan semua yang tidak dapat disebutkan satu-persatu;
12. Luqman Hakim yang telah memberikan dukungan, semangat, perhatian dan do’anya;
13. Edwin, Dhana, Abdiah, Bima, Dhany, Ridho, Umam selaku probandus dalam penelitian, terimakasih atas sumbangan darah kalian yang sangat berarti.
14. keluarga besar kos “KaLem TuA” (Eka, Akita, Rachel, Rizky, Melda, Yunin, Icha, Yogi, Tery, Ifa, Memey, Afifah, Mbak Devi, Iik, Ayu, Mbak Nunung, Mbak Tia, Mbak Ulid) yang telah memberi bantuan, dukungan, motivasi, dan do’a selama penulis kos di Jember;
15. keluarga besar MPM (Majelis Permusyawaratan Mahasiswa) T.A. 2011/2012 s.d. 2015/2016 terutama Yun, Yuni, Iik, Nikmah, Aslyni, Elisa, Fitria, Rere dan semua yang tidak dapat disebutkan satu-persatu, BEM (Badan Eksekutif Mahasiswa), dan seluruh UKM, yang mengajarkan pengalaman berorganisasi selama penulis menjadi mahasiswa;

16. keluarga besar Farmasi UNEJ 2011, yang tidak dapat disebutkan satu persatu, terima kasih atas kekompakan, persaudaraan, semangat dan doa kalian. ASMEF (Angkatan Solid Mahasiswa Eleven Farmasi) BISA!!;
17. guru-guruku yang terhormat dari TK, SD, SMP, SMA hingga perguruan tinggi terimakasih atas ilmu yang penulis dapatkan;
18. semua pihak yang terlibat baik secara langsung maupun tidak langsung memberikan bantuan dan dukungan dalam penyelesaian skripsi ini.

Penulis juga menerima segala saran dan kritik dari semua pihak demi kesempurnaan penulisan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 29 Juli 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMBUNG	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xx
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tinjauan tentang Tanaman <i>Averrhoa bilimbi</i>. (Fam. Oxalidaceae)	5
2.1.1 Klasifikasi Belimbing Wuluh	5
2.1.2 Deskripsi Belimbing Wuluh	5
2.1.3 Kandungan Kimia Tanaman Belimbing Wuluh	6
2.1.4 Manfaat Tanaman Belimbing Wuluh.....	8

2.2	Tinjauan tentang Sistem Hemostasis	8
2.3	Tinjauan tentang Pembentukan Agregasi Platelet	9
2.4	Tinjauan tentang Obat Antiplatelet	11
	2.4.1 Penghambatan Jalur Inflamasi Platelet	11
	2.4.2 Penghambatan Adhesi Platelet	12
	2.4.3 Penghambatan Aktivasi Platelet	12
	2.4.4 Penghambatan Agregasi Platelet	13
2.5	Tinjauan tentang Koagulasi	14
2.6	Tinjauan tentang Obat Antikoagulan	16
2.7	Tinjauan Ragam Pengujian Antiplatelet dan	
	Antikoagulan	17
	2.7.1 Pengujian Antiplatelet	17
	2.7.2 Pengujian Antikoagulan.....	17
BAB 3.	METODE PENELITIAN.....	18
3.1	Jenis Penelitian, Tempat, dan Waktu Penelitian	18
	3.1.1 Jenis Penelitian	18
	3.1.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	18
3.2	Rancangan Penelitian	18
	3.2.1 Uji Penentuan Aktivitas Antiplatelet	18
	3.2.2 Uji Penentuan Aktivitas Antikoagulan.....	19
3.3	Bahan dan Alat	20
3.4	Variabel Penelitian	20
	3.4.1 Variabel Bebas	21
	3.4.2 Variabel Terikat	21
	3.4.3 Variabel Terkendali	21
3.5	Definisi Operasional.....	21
3.6	Prosedur Kerja	22

3.6.1 Pembuatan Fraksi n-Heksana Kulit Batang	
Belimbing Wuluh.....	22
3.6.2 Pembuatan Na Sitrat 3,2%	23
3.6.3 Pembuatan Suspensi Fraksi untuk Uji Antiplatelet	
dan Antikoagulan	23
3.6.4 Pembuatan Larutan Asetosal untuk Uji Antiplatelet..	23
3.6.5 Pembuatan Larutan Heparin untuk Uji Antikoagulan	23
3.6.6 Pembuatan PRP (<i>Platelet Rich Plasma</i>) dan PPP	
(<i>Platelet Poor Plasma</i>).....	24
3.6.7 Uji Aktivitas Antiplatelet	24
3.6.8 Uji Aktivitas Antikoagulan.....	25
3.7 Analisis Data	26
3.8 Skema Pelaksanaan Penelitian	27
3.8.1 Pembuatan Fraksi n-Heksana Kulit Batang	
Belimbing Wuluh.....	27
3.8.2 Pengujian <i>in vitro</i> Antiplatelet	28
3.8.3 Pengujian <i>in vitro</i> Antikoagulan	29
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	30
4.1 Hasil	30
4.1.1 Pembuatan Fraksi n-Heksana Kulit Batang	
Belimbing Wuluh	30
4.1.2 Pengujian Aktivitas Antiplatelet	30
4.1.3 Pengujian Aktivitas Antikoagulan.....	32
4.2 Pembahasan.....	34
BAB 5. PENUTUP	39
5.1 Kesimpulan.....	39
5.2 Saran.....	39

DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN	44

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1	Tanaman belimbing wuluh 6
2.2	Mekanisme (a) adhesi platelet pada kolagen (bentuk platelet masih normal) dan (b) agregasi platelet dengan platelet lain (bentuk platelet sudah berubah)..... 10
2.3	Mekanisme antiplatelet dari berbagai faktor penghambatan 11
2.4	Mekanisme koagulasi darah 15
2.5	Mekanisme aksi antikoagulan..... 16
3.1	Rancangan penelitian aktivitas antiplatelet 18
3.2	Rancangan penelitian aktivitas antikoagulan..... 19
3.3	Alur kerja pembuatan fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh 27
3.4	Alur kerja penentuan uji aktivitas antiplatelet 28
3.5	Alur kerja penentuan uji aktivitas antikoagulan 29
4.1	Persentase agregasi platelet 31
4.2	Perpanjangan waktu koagulasi PT (<i>prothrombin time</i>)..... 32
4.3	Perpanjangan waktu koagulasi aPTT (<i>activated partial thromboplastin time</i>) 33
4.4	Mekanisme penghambatan asam arakidonat, kolagen, dan ADP dari alkaloid yang memberikan aktivitas antiplatelet..... 36
4.5	Mekanisme oksalat yang memberikan aktivitas antikoagulan 38

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Perhitungan Rendemen Fraksi n-Heksana Kulit Batang Belimbing Wuluh.....	44
B. Data Hasil Uji Aktivitas Antiplatelet <i>in vitro</i>	44
B.1 Kelompok kontrol positif (asetosal 1 mg/ml)	44
B.2 Kelompok kontrol negatif (akuades)	44
B.3 Kelompok uji fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh (0,25 mg/ml).....	45
B.4 Kelompok uji fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh (0,5 mg/ml).....	45
B.5 Kelompok uji fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh (1 mg/ml).....	45
B.6 Kelompok uji fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh (2 mg/ml).....	46
C. Data Hasil Uji Aktivitas Antikoagulan <i>in vitro</i>	46
C.1 <i>Prothrombin time</i> (PT).....	46
C.1.1 Kelompok kontrol positif (heparin 1 mg/ml)	46
C.1.2 Kelompok kontrol negatif (akuades).....	46
C.1.3 Kelompok uji fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh (2 mg/ml)	46
C.2 <i>Activated partial thromboplastin time</i> (aPTT).....	47
C.2.1 Kelompok kontrol positif (heparin 1 mg/ml)	47
C.2.2 Kelompok kontrol negatif (akuades).....	47
C.2.3 Kelompok uji fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh (2 mg/ml)	47
D. Hasil Analisis Data	48

D.1	Uji Aktivitas Antiplatelet	48
D.1.1	Uji Normalitas	48
D.1.2	Uji Homogenitas	48
D.1.3	Uji Anova	48
D.1.4	Uji LSD	49
D.2	Uji Aktivitas Antikoagulan	50
D.2.1	<i>Prothrombin time</i> (PT).....	50
D.2.2	<i>Activated partial trhomboplastin time</i> (aPTT)	51
E.	Hasil Uji Aktivitas Antikoagulan	53
F.	Lembar Persetujuan Etik	54

DAFTAR SINGKATAN

aPTT	= <i>activated partial thromboplastin time</i>
vWF	= <i>von Willebrand factor</i>
ADP	= <i>adenosine diphosphate</i>
GPIb/IX	= <i>glikoprotein Ib/IX</i>
GPIIb/IIIa	= <i>glikoprotein aktif IIb/IIIa</i>
HK	= <i>high molecular weight kininogen</i>
LMWH	= <i>low molecular weight heparin</i>
LSD	= <i>least significantly difference</i>
OD	= <i>optical density</i>
PAF	= <i>platelet-activating factor</i>
PDGF	= <i>platelet-derived growth factor</i>
PK	= <i>prekalikrein</i>
PL	= <i>fosfolipid</i>
PPP	= <i>platelet poor plasma</i>
PRP	= <i>platelet rich plasma</i>
PT	= <i>prothrombine time</i>
TT	= <i>thrombin time</i>
TXA ₂	= <i>tromboksan A₂</i>

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Platelet adalah sel darah yang berfungsi dalam sistem hemostasis. Platelet berperan sebagai pembentuk sumbat saat terjadi luka. Hemostasis merupakan suatu proses yang kompleks untuk mengontrol pendarahan dan terdiri dari berbagai macam komponen dalam sistem pembekuan darah yang teraktivasi akibat rusaknya pembuluh darah (Black *et al.*, 2013). Proses ini meliputi pembentukan agregat platelet, penggumpalan darah (koagulasi), dan pelarutan bekuan darah oleh protein plasma (trombolitik). Sistem agregasi platelet dan koagulasi terjadi secara alami dalam kondisi normal tubuh apabila terjadi luka (Murray *et al.*, 2003).

Ketidakseimbangan sistem hemostasis akan mengakibatkan kelainan patologis. Kelainan patologis yang dapat terjadi yaitu pendarahan spontan karena darah tidak dapat membeku dan terbentuknya trombus akibat sumbatan yang berlebihan (Dewoto, 2007). Adanya trombus akan memicu penyakit vaskuler seperti infark miokard, emboli otak (*stroke*), dan penyakit vaskuler lain (Safitri, 2006).

Penyakit kardiovaskuler adalah penyebab utama kematian dunia. Pada tahun 2008 terjadi kematian akibat penyakit kardiovaskuler sebanyak 17,3 juta jiwa dan akan mengalami peningkatan yang signifikan di tahun 2030 menjadi 23,3 juta jiwa. Penyakit kardiovaskuler di Indonesia diketahui juga merupakan penyebab kematian terbesar sebanyak 37% dari total kematian yang diakibatkan oleh berbagai penyakit (WHO, 2014).

Sejumlah peneliti mengupayakan berbagai macam cara pencegahan maupun pengobatan penyakit kelainan vaskuler baik secara farmakologi maupun non farmakologi. Salah satu terapi pengobatan untuk mengatasi kelainan vaskuler adalah menggunakan obat-obatan antitrombosis yang meliputi antiplatelet, antikoagulan, dan trombolitik (Gross dan Weitz, 2009).

Terapi farmakologi antiplatelet yang telah beredar salah satunya adalah asetosal. Obat ini secara umum mempunyai mekanisme sebagai antiinflamasi namun dapat berperan sebagai antiplatelet dalam dosis kecil yaitu 30 mg/hari (umumnya terkandung 325 mg asetosal dalam sediaan obat). Terapi farmakologi yang dapat digunakan sebagai antikoagulan adalah heparin yang dapat bekerja memperpanjang waktu pembekuan darah (Murray *et al.*, 2003).

Penelitian terhadap tanaman sebagai alternatif pengobatan juga dapat dilakukan untuk meningkatkan taraf kesehatan di Indonesia. Salah satu tanaman asli Indonesia yang berkhasiat dalam hal pengobatan adalah *Averrhoa bilimbi* L. (Fam. Oxalidaceae) atau pada umumnya disebut belimbing wuluh. Salah satu penelitian terhadap tanaman belimbing wuluh yang dilakukan pada tikus hiperlipidemia membuktikan bahwa buah belimbing wuluh mempunyai aktivitas antihiperlipidemia (Ambili *et al.*, 2009). Penelitian lain membuktikan bahwa daun belimbing wuluh dapat berkhasiat sebagai antiinflamasi rektal, antioksidan (Siddique *et al.*, 2013), antiplatelet (Yuliet *et al.*, 2014) dan antikoagulan (Daud *et al.*, 2013). Kulit batang belimbing wuluh pada fraksi n-heksana mempunyai aktivitas trombolitik yaitu 7,81% yang lebih besar dibanding aktivitas pada fraksi metanol yaitu 4,11% (Siddique *et al.*, 2013).

Hasil uji fitokimia kulit batang belimbing wuluh mengandung senyawa alkaloid, saponin, dan flavonoid (Siddique *et al.*, 2013). Senyawa alkaloid dapat terdiri dari senyawa yang bersifat non polar hingga polar (Silver, 2011). Senyawa saponin bersifat polar (Verma *et al.*, 2013) dan flavonoid bersifat semipolar hingga polar (Andersen dan Markham, 2006). Pelarut n-heksana dapat melarutkan senyawa alkaloid (Silver, 2011). Berdasarkan hasil uji *in vitro*, beberapa senyawa alkaloid mempunyai aktivitas sebagai antiplatelet dengan menghambat asam arakidonat, kolagen, maupun *adenosine diphosphate* (ADP) sebagai penginduksi agregasi platelet (Jantan *et al.*, 2006).

Berdasarkan uraian tersebut, ingin diketahui aktivitas antiplatelet dan antikoagulan pada pengujian *in vitro* fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh

dengan berbagai konsentrasi. Pengujian *in vitro* antiplatelet dilakukan dengan mengukur kekeruhan plasma *platelet rich plasma* (PRP) sebelum dan sesudah diinduksi dengan ADP (Vogel, 2002). ADP juga merupakan salah satu penginduksi terjadinya agregasi platelet seperti halnya tromboksan A₂ (TXA₂), yaitu melalui pengikatan reseptor yang terdapat pada membran platelet. Platelet yang teraktivasi akan melepaskan isi granula yang dapat meningkatkan agregasi platelet yang lain (Murray *et al.*, 2003). Pengujian *in vitro* antikoagulan dilakukan menggunakan *platelet poor plasma* (PPP) dengan mengukur perpanjangan waktu uji *activated partial thromboplastin time* (aPTT) dan *prothrombin time* (PT) (Black *et al.*, 2013) pada konsentrasi yang menghasilkan aktivitas terbesar dari pengujian antiplatelet.

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian di atas dapat dirumuskan beberapa rumusan masalah sebagai berikut:

- a. Apakah fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh mempunyai aktivitas sebagai antiplatelet dan antikoagulan?
- b. Apakah ada perbedaan aktivitas antiplatelet pada beberapa konsentrasi dari fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh dalam penentuan agregasi platelet?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

- a. Untuk mengetahui adanya aktivitas antiplatelet dan antikoagulan dari fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh.
- b. Untuk mengetahui perbedaan aktivitas antiplatelet pada beberapa konsentrasi dari fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

- a. Dapat digunakan sebagai dasar teori dalam penelitian selanjutnya sebagai manfaat dari kulit batang belimbing wuluh.
- b. Pengembangan molekul baru dari fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh yang dapat dimanfaatkan sebagai antiplatelet dan antikoagulan.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang Tanaman *Averrhoa bilimbi*. (Fam. Oxalidaceae)

2.1.1 Klasifikasi Belimbing Wuluh

Tumbuhan belimbing wuluh diklasifikasikan sebagai berikut (ITIS, 2014):

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Viridaeplantae
Infrakingdom	: Streptophyta
Divisi	: Tracheophyta
Subdivisi	: Spermatophytina
Infradivisi	: Angiospermae
Kelas	: Magnoliopsida
Superordo	: Rosanae
Ordo	: Oxalidales
Famili	: Oxalidaceae (Oxalis)
Genus	: <i>Averrhoa</i> L.
Spesies	: <i>Averrhoa bilimbi</i> L.

2.1.2 Deskripsi Belimbing Wuluh

Belimbing wuluh merupakan kerabat dekat dari belimbing pada umumnya (*A. carambola*), namun memiliki perbedaan dalam morfologi, rasa, dan penggunaan atau manfaatnya. Tanaman yang berasal dari Indonesia dan Malaysia ini tersebar di beberapa negara dan menjadi tanaman eksotis seperti di Argentina, Australia, Brazil, Kolombia, Kuba, Ekuador, Guyana, India, Jamaika, Myanmar, Filipina, Puerto Riko, Singapura, Sri Lanka, Suriname, Tanzania, Thailand, Trinidad dan Tobago, Amerika, Venezuela (Orwa *et al.*, 2009).

Pohon belimbing wuluh dapat mencapai panjang 5-10 meter, mempunyai batang yang pendek dan bercabang (Gambar 2.1). Panjang cabang yang ditumbuhi daun mencapai sekitar 30-60 cm dengan jumlah daun 11 hingga 37 pasang berselangseling. Daun berukuran panjang 2-10 cm dan lebar 1,2-1,25 cm; berbentuk oval dan membujur; berbulu halus; berwarna hijau pada permukaan dan pucat pada sisi bawah. Bunga berbau harum, berkelopak 5, berwarna hijau kekuningan atau bercorak ungu hingga ungu gelap. Buah termasuk buah buni, berbentuk bulat lonjong bersegi, renyah saat mentah, mempunyai rasa masam, berwarna hijau muda hingga hijau kekuningan, putih gading atau mendekati putih saat matang (Orwa *et al.*, 2009).



Gambar 2.1 Tanaman belimbing wuluh (Kumar *et al.*, 2013)

2.1.3 Kandungan Kimia Tanaman Belimbing Wuluh

Buah belimbing wuluh mengandung saponin, flavonoid, dan tanin (Kumar *et al.*, 2013). Ekstrak buah belimbing wuluh mengandung flavonoid, saponin dan triterpena. Secara keseluruhan kandungan kimia tumbuhan ini terdiri dari asam amino, asam sitrat, sianidin-3-O-h-D-glukosida, fenolik, ion kalium, gula, dan

vitamin A (Tabel 2.1) (Kumar *et al.*, 2013). Tumbuhan belimbing wuluh juga mengandung asam oksalat yang tinggi (8,57 – 10,32 mg/g) jika dibandingkan dengan tanaman lain seperti bayam (8,22 mg/g), serbuk cokelat (4,5 mg/g), dan daun teh (3,8-14,5 mg/g) (Lima *et al.*, 2001).

Tabel 2.1 Kandungan nutrisi belimbing wuluh dalam 100 gram

Komponen senyawa	Kadar
Vitamin B1 (thiamin)	0.010 mg
Asam Askorbat	15.6 mg
Vitamin A	0.036 mg
<i>Moisture</i>	94.2 – 94.7 g
Protein	0.61 g
Serat	0.6 g
Abu	0.31 – 0.40 g
Kalsium	3.4 g
Fosfor	11.1 mg
Besi	1.01 mg
Karoten	0.035 mg
Thiamin	0.010 mg
Riboflavin	0.302 mg
Niasin	0.302 mg

Sumber: Kumar *et al.*, 2013

Berdasarkan dari hasil uji skrining fitokimia, ekstrak metanol kulit batang belimbing wuluh mengandung senyawa alkaloid, saponin, dan flavonoid (Siddique *et al.*, 2013). Senyawa alkaloid bersifat polar hingga non polar (Silver, 2011), sedangkan senyawa saponin bersifat polar (Verma *et al.*, 2013), dan senyawa flavonoid bersifat semipolar hingga polar (Andersen dan Markham, 2006). Pelarut n-heksana dapat menarik senyawa alkaloid (Silver, 2011). Hasil uji *in vitro* pada beberapa senyawa alkaloid dapat berpotensi sebagai antiplatelet dengan menghambat aktivitas asam arakidonat, kolagen, maupun ADP sebagai penginduksi agregasi platelet (Jantan *et al.*, 2006). Berdasarkan hal tersebut dimungkinkan fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh mempunyai aktivitas antitrombosis sebagai antiplatelet dan antikoagulan.

2.1.4 Manfaat Tanaman Belimbing Wuluh

Buah belimbing wuluh dapat dikonsumsi sebagai bahan tambahan makanan dan tidak sedikit manfaat dari tanaman belimbing wuluh yang digunakan untuk pengobatan di Indonesia terutama di Pulau Jawa. Khasiat buah belimbing wuluh dalam hal pengobatan contohnya mengatasi inflamasi, menghentikan pendarahan rektal, mengatasi hemoroid, dan mengontrol obesitas (antihiperlipidemia) (Ambili *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2013). Daun belimbing wuluh memiliki aktivitas antioksidan (Sunardi, 2007) dan berkhasiat sebagai antiinflamasi rektal (Siddique *et al.*, 2013). Penelitian lain membuktikan bahwa ekstrak etanol daun belimbing wuluh mempunyai aktivitas sebagai antiplatelet yang ditandai dengan peningkatan waktu pendarahan dan penghambatan agregasi platelet yang terjadi secara bermakna ($p < 0,05$) (Yuliet *et al.* 2014). Pada daun dan buah belimbing wuluh memiliki efek antikoagulan melalui pengujian *clotting time* terhadap tikus normal dan tikus diabetes (Daud *et al.*, 2013). Aktivitas trombolitik pada kulit batang belimbing wuluh telah diuji dan dibuktikan bahwa fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh mempunyai aktivitas trombolitik sebesar 7,81% jika dibandingkan dengan fraksi metanol sebesar 4,11% (Siddique *et al.*, 2013). Beberapa aktivitas yang telah diteliti pada belimbing wuluh memungkinkan adanya aktivitas antitrombosis selain trombolitik seperti antiplatelet dan antikoagulan, sehingga dilakukan penelitian untuk mengetahui aktivitas antiplatelet dan antikoagulan terutama pada fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh.

2.2 Tinjauan tentang Sistem Hemostasis

Hemostasis merupakan suatu proses yang kompleks untuk mengontrol pendarahan dan terdiri dari berbagai macam komponen dalam sistem pembekuan darah yang teraktivasi akibat rusaknya pembuluh darah (Black *et al.*, 2013). Proses ini meliputi pembentukan agregasi platelet, pembekuan darah (koagulasi), dan pelarutan bekuan oleh protein plasma.

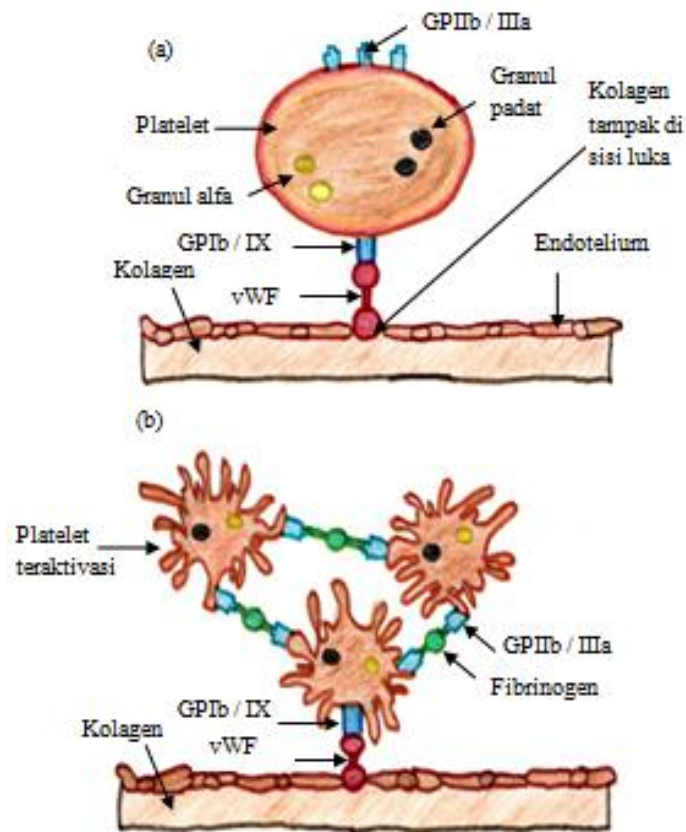
Menurut Murray *et al.* (2003), proses hemostasis terjadi saat pembuluh darah mengalami vasokonstriksi akibat adanya luka jaringan, sehingga menyebabkan darah mengalir menuju bagian yang luka tersebut, kemudian terjadi fase hemostasis seperti berikut:

- a. Saat terjadi trauma/luka, agregat platelet akan terlepas dan menempel pada bagian yang rusak. Platelet akan berikatan dengan kolagen kemudian akan diaktifkan oleh trombin. Pada tempat yang sama, terbentuk koagulasi untuk memperkuat ikatan yang juga dapat diperkuat melalui pelepasan ADP yang berasal dari aktivasi platelet. Saat platelet teraktivasi akan terjadi perubahan bentuk. Agregat platelet akan membentuk sumbat hemostatik dengan adanya fibrinogen.
- b. Pembentukan benang-benang fibrin yang mengikat agregat platelet akan membuat sumbat hemostatik menjadi lebih stabil.
- c. Plasmin akan melarutkan sebagian atau keseluruhan sumbat hemostatik yang terbentuk (trombolitik).

2.3 Tinjauan tentang Pembentukan Agregasi Platelet

Platelet dalam sirkulasi darah secara normal berbentuk teratur, namun saat terjadi hemostasis atau trombosis, platelet akan teraktivasi dan berubah bentuk untuk membantu proses sumbatan hemostatik ataupun trombi. Pembentukan agregasi platelet terdiri dari tiga tahap, yaitu: (1) adhesi platelet pada kolagen dalam pembuluh darah, (2) aktivasi atau pelepasan granula platelet, dan (3) agregasi platelet (Murray *et al.*, 2003).

Platelet melekat pada serat kolagen melalui reseptor spesifik seperti kompleks glikoprotein Ib/IX (GPIb/IX) dengan reaksi yang melibatkan *von Willebrand factor* (vWF) (Black *et al.*, 2013). Kolagen yang diinduksi oleh platelet akan mengaktifkan fosfolipase A₂ yang merubah fosfolipid menjadi asam arakidonat, yang selanjutnya dapat memicu pembentukan TXA₂. Hal ini terjadi pada proses adhesi (Gambar 2.2(a)).

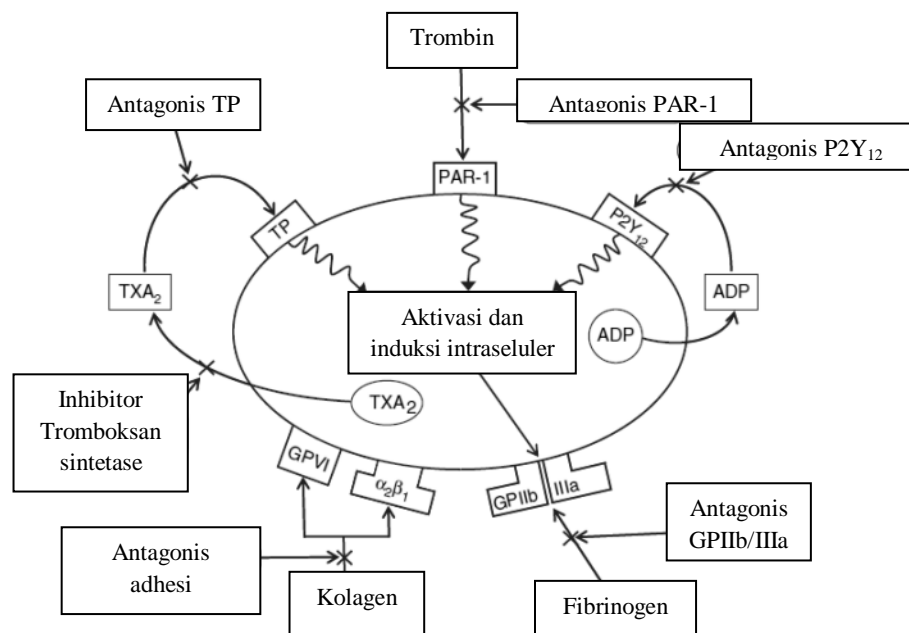


Gambar 2.2. Mekanisme (a) adhesi platelet pada kolagen (bentuk platelet masih normal) dan (b) agregasi platelet dengan platelet lain (bentuk platelet sudah berubah) (Black *et al.*, 2013)

Induksi kolagen akan membuat platelet berubah bentuk, lalu menyebar dan menempel pada subendotelium. Platelet akan melepaskan granul-granul yang distimulasi oleh trombin dan TXA_2 hingga membentuk agregasi (Murray *et al.*, 2003). Fibrinogen dan glikoprotein aktif Iib/IIIa (GPIIb/IIIa) akan membantu proses agregasi (Gambar 2.2(b)) dengan mengikat platelet satu dengan yang lain (Silbernagl dan Despopoulos, 2009; Black *et al.*, 2013). Proses ini akan berlangsung terus menerus hingga terbentuk gumpalan yang terjadi pada proses koagulasi.

2.4 Tinjauan tentang Obat Antiplatelet

Beberapa contoh obat antiplatelet yaitu asetosal, klopidoqrel, dipiridamol, dan kilostazol merupakan penghambat aktivasi platelet. Masing-masing obat antiplatelet dapat bekerja melalui mekanisme yang berbeda, diantaranya menghambat jalur inflamasi platelet, sebagai inhibitor adhesi platelet, inhibitor aktivasi platelet, maupun inhibitor agregasi platelet. Masing-masing mekanisme dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3. Mekanisme antiplatelet dari berbagai faktor penghambatan (Gross dan Weitz, 2009)

2.4.1 Penghambatan Jalur Inflamasi Platelet

Platelet berperan dalam proses inflamasi melalui jalur CD40/ligan CD40 dan P-selektin. CD40 merupakan sel terlarut yang dilepaskan dari platelet teraktivasi. Ketika ligan CD40 berikatan dengan monosit, sel endotel, atau limfosit-T maka akan terjadi respon proinflamasi (Gross dan Weitz, 2009).

P-selektin adalah suatu molekul sel adhesi yang terdapat pada platelet teraktivasi dan sel-sel endotel. Ikatan yang terjadi antara reseptor P-selektin dengan leukosit akan menyebabkan terbentuknya agregasi platelet-leukosit serta terjadi

penempelan leukosit pada trombus dan pada permukaan sel endotel teraktivasi. Penghambatan interaksi tersebut dapat memperkecil trombosis dan mengurangi inflamasi (Gross dan Weitz, 2009).

2.4.2 Penghambatan Adhesi Platelet

Adhesi platelet merupakan proses awal terbentuknya agregasi platelet pada dinding pembuluh darah yang mengalami kerusakan. Proses adhesi platelet terjadi akibat adanya interaksi antara protein subendotel dan reseptor pada permukaan platelet. Proses tersebut dapat dihambat dengan memblok ikatan antara reseptor platelet terhadap kolagen atau vWF, memblok penempelan vWF terhadap kolagen, atau mengikat kolagen maupun vWF sehingga mencegah interaksi dengan platelet secara langsung (Gross dan Weitz, 2009).

2.4.3 Penghambatan Aktivasi Platelet

Obat golongan ini dirancang untuk memblok aktivasi platelet melalui jalur sintesis TXA₂, P2Y₁₂, PAR-1 dan fosfodiesterase.

a. Menghambat jalur TXA₂

Contoh obat yang menghambat sintesis TXA₂ adalah asetosal. Asetosal bekerja dengan memblok enzim siklooksigenase secara ireversibel sehingga sintesis TXA₂ akan terhambat. Penghambatan enzim siklooksigenase terjadi karena asetosal mengasetilasi enzim tersebut secara ireversibel (Katzung, 2003).

Asetosal (asam asetil salisilat) bekerja sebagai antiplatelet dalam dosis rendah. Asetosal dapat menghambat sistem siklooksigenase sehingga tidak terbentuk TXA₂ yang berperan sebagai vasokonstriktor dan agregator platelet yang poten. Platelet sangat sensitif terhadap asetosal pada dosis 30 mg/hari (umumnya terkandung 325 mg asetosal dalam sediaan obat) yang secara efektif mengeliminasi sintesis TXA₂. Asetosal juga menghambat pembentukan prostasiklin (PGI₂, vasodilator dan inhibisi agregasi platelet) melalui sel endotel, namun dapat meregenerasi siklooksigenase

kembali dalam beberapa jam. Sehingga kondisi TXA₂ dan prostasiklin dapat seimbang. Indikasi pengobatan dengan asetosal digunakan oleh penderita angina, infark miokardial, pencegahan stroke dan kematian pada pasien serangan otak iskemik (Murray *et al.*, 2003).

b. Menghambat P2Y₁₂

Salah satu obat yang bekerja menghambat P2Y₁₂ adalah klopidogrel. Obat ini bekerja menghambat P2Y₁₂ secara ireversibel pada permukaan platelet. Klopidogrel merupakan bentuk prodrug yang harus dimetabolisme terlebih dahulu di dalam hati untuk mengaktifkan metabolit yang akan menghambat reseptor ADP (Gross dan Weitz, 2009).

c. Menghambat PAR-1

Trombin merupakan agonis platelet yang paling kuat. Trombin dapat mengaktifasi platelet melalui reseptor G-protein (PAR-1 dan PAR-2). Reseptor PAR-1 memiliki afinitas yang lebih besar daripada PAR-2 dan merupakan efektor utama pelepasan trombin. Penghambatan reseptor PAR-1 akan menyebabkan terhambatnya aktivasi platelet. Obat golongan ini masih dalam tahap pengembangan, contohnya adalah SCH530348 dan E5555 (Gross dan Weitz, 2009).

d. Menghambat fosfodiesterase

Contoh obat golongan ini adalah dipiridamol dan kilostazol. Obat ini bekerja dengan menghambat fosfodiesterase yang kemudian meningkatkan kadar adenosin monofosfat siklik. Adenosin monofosfat siklik menghasilkan sinyal intraseluler untuk menekan aktivasi platelet dan agregasi platelet. Obat golongan ini mempunyai risiko perdarahan yang rendah (Gross dan Weitz, 2009).

2.4.4 Penghambatan Agregasi Platelet

Obat golongan ini merupakan antagonis GPIIb/IIIa, yang memblokir jalur terakhir pada proses agregasi platelet. Menurut penelitian, antagonis GPIIb/IIIa secara intravena terbukti dapat mengurangi terjadinya iskemia. Sedangkan penggunaan

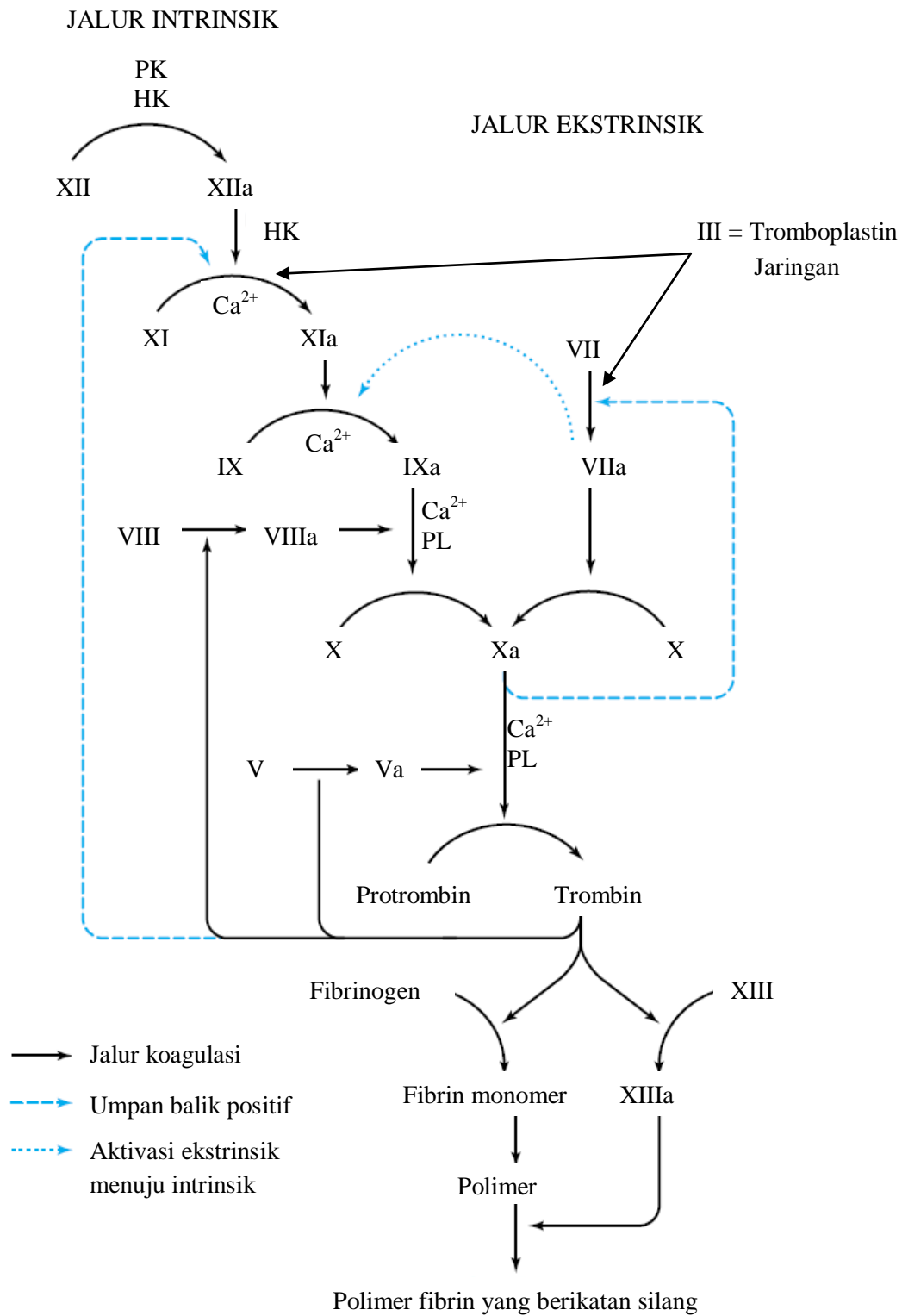
antagonis GPIIb/IIIa secara oral tidak menunjukkan manfaat apapun. Hal ini belum diketahui penyebabnya, namun dimungkinkan berhubungan dengan aktivitas agonis parsial dan/atau efek proinflamasi (Gross dan Weitz, 2009).

2.5 Tinjauan tentang Koagulasi

Terbentuknya bekuan darah (koagulasi) termasuk salah satu proses dalam mekanisme hemostasis. Proses pembekuan darah terjadi melalui tiga tahap yaitu: (1) aktivasi tromboplastin, (2) pembentukan trombin dari protrombin, dan (3) pembentukan fibrin dari fibrinogen. Aktivasi tromboplastin yang dapat mengubah protrombin (faktor II) menjadi trombin terjadi melalui dua mekanisme yaitu jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik (Gambar 2.4) (Dewoto, 2007).

Tromboplastin jaringan (faktor III) akan bereaksi dengan faktor VIIa yang selanjutnya akan mengaktifkan faktor X. Faktor Xa bersama dengan faktor Va, faktor IV (Ca^{2+}), dan fosfolipid (PL) akan mengubah protrombin menjadi trombin pada jalur ekstrinsik. Trombin yang terbentuk akan memicu fibrinogen (faktor I) menjadi fibrin monomer (faktor Ia) yang tidak stabil. Faktor XIIIa akan mempengaruhi fibrin monomer menjadi fibrin yang stabil dan resisten terhadap enzim proteolitik (Murray *et al.*, 2003; Dewoto, 2007).

Faktor XII (faktor Hageman) diaktifkan apabila terjadi kontak dengan muatan negatif, misal kolagen subendotel pembuluh darah yang mengalami kerusakan. Reaksi pembekuan darah akan terjadi lebih cepat dengan pembentukan kompleks antara faktor XII, prekalikrein (PK), dan *high molecular weight kininogen* (HK). Faktor XIIa kemudian akan mengaktifkan faktor XI. Faktor XIa bersama dengan ion kalsium akan mengaktifkan faktor IX. Faktor IXa, faktor VIIa, ion kalsium, dan fosfolipid akan mengaktifkan faktor X. Proses ini terjadi pada mekanisme jalur intrinsik. Mekanisme selanjutnya sama dengan jalur ekstrinsik hingga terbentuk fibrin yang stabil (Murray *et al.*, 2003; Dewoto, 2007).

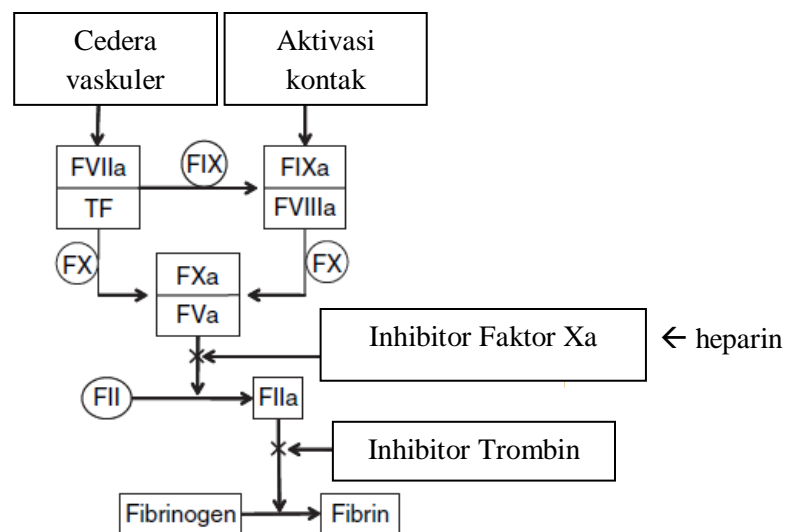


Gambar 2.4 Mekanisme koagulasi darah (Murray *et al.*, 2003)

2.6 Tinjauan tentang Obat Antikoagulan

Sistem penghambatan koagulan dapat terjadi melalui mekanisme penghambatan aktivasi protrombin menjadi trombin. Penghambatan sintesis trombin akan mengakibatkan fibrinogen tidak akan berubah menjadi fibrin sehingga mekanisme koagulasi tidak akan terjadi. Trombin merupakan agonis platelet yang berperan dalam aktivasi platelet dan agregasi dengan proses koagulasi. Selain mengubah bentuk fibrinogen menjadi fibrin, trombin juga dapat meregenerasi dengan aktivasi *feedback* dari faktor V dan faktor VIII yaitu kofaktor protrombinase kompleks tenase intrinsik. Penghambatan trombin dapat dilakukan sebagai mekanisme obat antikoagulan yang poten. Inhibitor faktor Xa dapat digunakan sebagai penghambat sintesis trombin seperti yang tertera pada Gambar 2.5 (Gross dan Weitz, 2009). Obat-obat yang berperan sebagai penghambat faktor Xa antara lain heparin, *low molecular weight heparin* (LMWH), fondaparinux (Black *et al.*, 2013), Rivaroxaban, Apixaban, dan Idrabiotaparinux (Gross dan Weitz, 2009).

Heparin sebagai inhibitor faktor Xa yang menghambat proses penggumpalan dapat digunakan sebagai agen antikoagulan (Black *et al.*, 2013). Heparin berperan sebagai antikoagulan yang berikatan dengan faktor IX dan XI, namun interaksi yang paling berperan adalah dengan plasma antitrombin III (Murray *et al.*, 2003).



Gambar 2.5 Mekanisme aksi antikoagulan (Gross dan Weitz, 2009)

2.7 Tinjauan Ragam Pengujian Antiplatelet dan Antikoagulan

2.7.1 Pengujian Antiplatelet

Pengujian antiplatelet pada umumnya dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu metode *optical density* (OD), metode impedansi, metode *particle-counting*, dan lain-lain (Moriyama *et al.*, 2009). Agregasi platelet dapat pula diukur menggunakan *whole blood Lumi Aggregometer* yang bekerja menggunakan metode tegangan listrik. Metode pengujian tersebut dapat dilakukan secara cepat dan efisien karena menggunakan instrumen (Jantan *et al.*, 2011). Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah dengan mengukur persentase agregasi platelet. Persentase agregasi platelet dihitung berdasarkan selisih serapan plasma sebelum dan setelah diinduksi ADP. Plasma didapatkan dari sampel darah yang dicampur dengan natrium sitrat kemudian disentrifugasi. Plasma tersebut dicampur dengan bahan uji yang selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang 600 nm. Serapan plasma diukur kembali setelah diinduksi dengan ADP pada panjang gelombang yang sama (Vogel, 2002).

2.7.2 Pengujian Antikoagulan

Uji antikoagulan dapat dilakukan dengan menentukan waktu pembekuan darah (*whole blood clotting time*), *prothrombin time* (PT), *activated partial thromboplastin time* (aPTT), *thrombin time* (TT), uji fibrinogen berdasar metode Clauss, perhitungan D-dimer, atau uji anti-Xa. Berbagai uji ini dapat digunakan untuk mengukur aktivitas antikoagulan namun melalui jalur atau mekanisme yang berbeda-beda. PT dan aPTT merupakan uji yang paling banyak dilakukan dan sensitif untuk pengukuran aktivitas antikoagulan melalui mekanisme faktor jalur ekstrinsik dan intrinsik (Black *et al.*, 2013).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian, Tempat, dan Waktu Penelitian

3.1.1 Jenis Penelitian

Uji aktivitas *in vitro* antiplatelet dan antikoagulan fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh pada PRP dan PPP darah manusia ini merupakan penelitian *true experimental laboratories*.

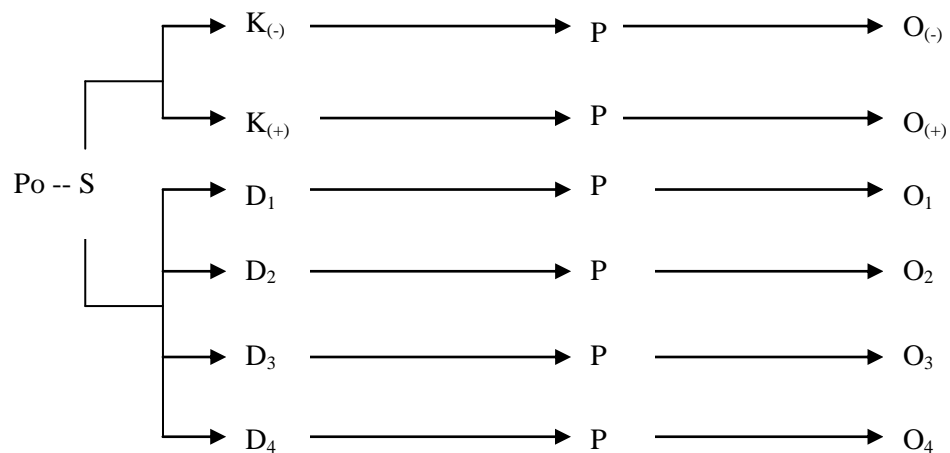
3.1.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Juni 2014 hingga April 2015 di Laboratorium Fitokimia, Laboratorium Biomedik Fakultas Farmasi Universitas Jember, serta Laboratorium Prosenda Jember.

3.2 Rancangan Penelitian

3.2.1 Uji Penentuan Aktivitas Antiplatelet

Rancangan penelitian aktivitas agregasi platelet yang digunakan adalah model *Post Test Only Control Group Design* dan ditunjukkan pada Gambar 3.1.



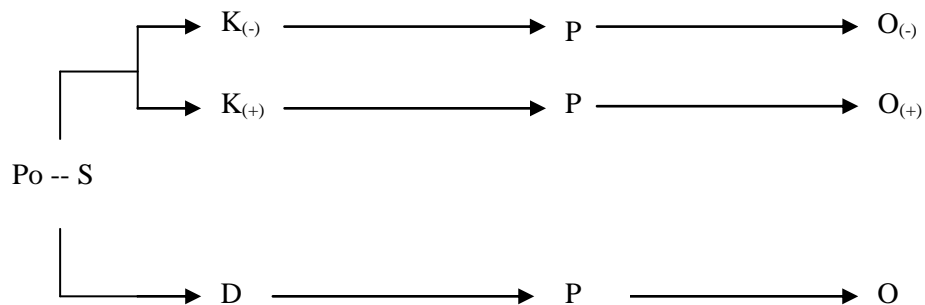
Gambar 3.1. Rancangan penelitian aktivitas antiplatelet

Keterangan:

- Po : Populasi normal manusia
 S : Sampel normal PRP
 K₍₋₎ : Kelompok kontrol negatif dengan pemberian akuades pada PRP
 K₍₊₎ : Kelompok kontrol positif dengan pemberian suspensi asetosal 1 mg/ml pada PRP
 D : Kelompok perlakuan dengan pemberian fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh konsentrasi 0,25 mg/ml (D₁); 0,5 mg/ml (D₂); 1 mg/ml (D₃); 2 mg/ml (D₄) pada PRP
 P : Perlakuan pada masing-masing kelompok
 O_{(-),(+),1,2,3,4} : Pengamatan terhadap penurunan serapan plasma pada masing-masing kelompok.

3.2.2 Uji Penentuan Aktivitas Antikoagulan

Rancangan penelitian aktivitas antikoagulan yang digunakan adalah model *Post Test Only Control Group Design* dan ditunjukkan pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2. Rancangan penelitian aktivitas antikoagulan

Keterangan:

- Po : Populasi normal manusia
 S : Sampel normal PPP
 K₍₋₎ : Kelompok kontrol negatif dengan pemberian akuades pada PPP
 K₍₊₎ : Kelompok kontrol positif dengan pemberian asetosal 1 mg/ml pada PPP

- D : Kelompok perlakuan dengan pemberian fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh pada konsentrasi yang menghasilkan aktivitas antiplatelet paling besar (2 mg/ml)
- P : Perlakuan pada masing-masing kelompok
- O, O⁽⁻⁾, O⁽⁺⁾ : Pengamatan terhadap waktu koagulasi (PT dan aPTT) pada masing-masing kelompok.

3.3 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit batang belimbing wuluh yang diperoleh dari Kabupaten Sidoarjo pada bulan Juni 2014, metanol, akuades, n-heksana, asetosal, natrium sitrat 3,2%, NaCl 0,9%, pereaksi ADP (Sigma-Aldrich), Vaxcel[®] Heparin Sodium *Inj.* 5000 I.U./ml, reagen PT (UNIPLASTIN[®] *System Pack*) dan aPTT (TECO[®]), tabung *microcentrifuge*, sampel PRP dan PPP.

Kriteria sampel darah menggunakan metode Jantan *et al.* (2011) dengan beberapa modifikasi. Darah diperoleh dari pria sehat, berusia > 19 tahun, tidak merokok, memiliki pola hidup sehat, tidak mengkonsumsi obat-obatan (terutama antiplatelet dan antikoagulan) selama dua minggu terakhir sebelum pengambilan sampel darah, serta prosedur pengujian *in vitro* aktivitas antiplatelet dan antikoagulan pada PRP darah manusia.

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstraktor soxhlet, *rotary evaporator*, kertas saring, corong pisah, cawan porselain, *grinder*, alat-alat gelas, mikropipet, alat sentrifugasi (Hettich Zentrifuge EBA 20), neraca analit digital, peralatan untuk pengambilan darah, *ultrasonic homogenizer* (Elmasonic), alat *vortex*, spektrofotometer visibel (Labomed UVD-2950), dan alat uji antikoagulan Coatron[®].

3.4 Variabel Penelitian

Variabel dari penelitian ini terdiri dari variabel bebas, variabel terikat, dan variabel terkontrol.

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh sebesar 0,25; 0,5; 1; dan 2 mg/ml.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah penurunan serapan plasma pada PRP serta waktu koagulasi pada pengujian PT dan aPTT.

3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dari penelitian ini adalah cara ekstraksi, sampel PRP dan PPP, serta cara pengujian antiplatelet dan antikoagulan.

3.5 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini adalah:

- a. Bagian tanaman belimbing wuluh yang digunakan adalah kulit batang tanaman belimbing wuluh yang sudah pernah berbunga, pada dahan atau cabang besar yang langsung keluar dari batang pokok.
- b. Ekstrak yang digunakan adalah ekstrak metanol kulit batang belimbing wuluh yang kemudian dipartisi lebih lanjut dengan n-heksana dan disuspensikan dalam akuades untuk uji *in vitro*.
- c. Fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh dikatakan memiliki aktivitas antiplatelet jika terjadi penurunan serapan plasma yang berbeda signifikan dibanding kontrol negatif.
- d. Penurunan serapan plasma merupakan selisih antara serapan plasma awal sebelum diinduksi ADP dikurangi dengan serapan plasma setelah diinduksi ADP. Adanya efek antiplatelet ditunjukkan oleh persentase agregasi platelet yang semakin kecil.

- e. Fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh dikatakan memiliki aktivitas antikoagulan jika terjadi peningkatan waktu koagulasi pada pengujian PT dan aPTT.
- f. *Prothrombin Time* (PT) digunakan dalam pengujian koagulasi untuk menilai kekurangan atau penghambatan faktor jalur ekstrinsik yaitu Faktor VII dan faktor jalur umum (faktor X, V, II, I/Fibrinogen).
- g. *Activated Partial Thromboplastin Time* (aPTT) digunakan untuk menilai kekurangan atau penghambatan faktor jalur intrinsik (faktor XII, XI, IX, VIII) dan faktor jalur umum (faktor X, V, II, I/Fibrinogen).

3.6 Prosedur Kerja

3.6.1 Pembuatan Fraksi n-Heksana Kulit Batang Belimbing Wuluh

Pembuatan fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh pada penelitian ini menggunakan metode Siddique *et al.* (2013) dengan beberapa modifikasi. Kulit batang belimbing wuluh dibersihkan dengan air mengalir dan dipatahkan menjadi bagian yang lebih kecil, kemudian dikeringkan. Simplisia dihaluskan hingga diperoleh 225 gram serbuk kulit batang belimbing wuluh. Serbuk kering diekstraksi menggunakan soxhlet dengan pelarut metanol sebanyak 2,25 L. Hasil ekstraksi dipekatkan hingga didapat 70 ml fraksi metanol, kemudian ditambahkan akuades 30 ml lalu dihomogenkan. Fraksi metanol-air dituang ke dalam corong pisah, lalu ditambah dengan 100 ml n-heksana. Campuran dikocok dan didiamkan beberapa saat sampai terbentuk dua lapisan cairan yang terpisah. Fraksi n-heksana dipisahkan dan ditampung. Proses partisi dilakukan sebanyak tiga kali menggunakan pelarut n-heksana yang selalu baru dengan volume tetap. Fraksi yang diperoleh adalah fraksi n-heksana dan fraksi metanol-air.

Fraksi n-heksana yang didapat kemudian disaring menggunakan kertas saring dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Fraksi kental yang dihasilkan ditimbang dan disimpan pada wadah tertutup rapat pada suhu (0-4)°C.

3.6.2 Pembuatan Na Sitrat 3,2%

Na sitrat sebanyak 3,2 gram ditimbang, lalu dilarutkan dengan sedikit akuades hingga larut. Akuades ditambahkan hingga volume mencapai 100 ml (Wirawan, 2007).

3.6.3 Pembuatan Suspensi Fraksi untuk Uji Antiplatelet dan Antikoagulan

Suspensi fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh dibuat beberapa konsentrasi yaitu 0,25; 0,5; 1; dan 2 mg/ml. Fraksi kental n-heksana ditimbang sebanyak 50 mg kemudian disuspensikan ke dalam 25 ml akuades dan dihomogenkan menggunakan *ultrasonic homogenizer* untuk mendapatkan konsentrasi 2 mg/ml. Pengenceran dari konsentrasi 2 mg/ml dilakukan ke dalam 10 ml akuades untuk mendapatkan konsentrasi 1 mg/ml, selanjutnya diencerkan kembali hingga didapat konsentrasi 0,5 mg/ml, dan diencerkan lagi hingga didapat konsentrasi 0,25 mg/ml. Masing-masing suspensi uji disaring menggunakan kertas saring dan dimasukkan ke dalam vial yang berbeda.

3.6.4 Pembuatan Larutan Asetosal untuk Uji Antiplatelet

Asetosal ditimbang sebanyak 25 mg, kemudian dilarutkan dalam 25 ml akuades dan dihomogenkan menggunakan *ultrasonic homogenizer*. Larutan disaring menggunakan kertas saring.

3.6.5 Pembuatan Larutan Heparin untuk Uji Antikoagulan

Sediaan heparin injeksi 5000 IU/ml (100 IU = 1 mg) dipipet 1 ml dan diencerkan dengan 50 ml akuades, sehingga didapatkan konsentrasi 1 mg/ml (Bjornsson dan Wolfram, 1981).

3.6.6 Pembuatan PRP (*Platelet Rich Plasma*) dan PPP (*Platelet Poor Plasma*)

Pembuatan PRP dan PPP dilakukan melalui pengambilan sampel darah pada pembuluh darah vena lengan relawan sehat yang kemudian dipindahkan ke dalam tabung yang telah berisi natrium sitrat 3,2% (dibutuhkan 1 ml natrium sitrat untuk 9 ml darah). PRP dibuat menggunakan darah yang disentrifugasi selama 15 menit pada 1000 rpm. PPP dibuat menggunakan darah yang disentrifugasi selama 15 menit pada 3500 rpm. Lapisan plasma (bagian atas yang berwarna bening) dipisahkan secara hati-hati dan dimasukkan pada tabung plastik tertutup rapat pada suhu ruang. Pembuatan PPP dilakukan setelah proses pembuatan PRP. Untuk menjamin jumlah platelet konstan, pengujian harus diselesaikan 3 jam setelah pengambilan darah (Wirawan, 2007).

3.6.7 Uji Aktivitas Antiplatelet

Pengujian agregasi platelet dapat dilakukan dengan mengukur kekeruhan plasma darah setelah diinduksi dengan ADP. Pengukuran dilakukan dengan membandingkan serapan plasma darah sebelum dan sesudah diinduksi ADP menggunakan spektrofotometer. Semakin besar penurunan serapan plasma, maka semakin banyak agregat platelet yang terbentuk. Aktivitas antiplatelet ditentukan menggunakan PRP yang berasal dari darah satu orang dan diuji dalam satu hari selama tidak lebih dari 3 jam setelah pengambilan darah (Wirawan, 2007).

Sampel uji yang telah disiapkan dalam konsentrasi 0,25; 0,5; 1; dan 2 mg/ml serta kontrol positif asetosal 1 mg/ml dan kontrol negatif akuades dipipet dengan mikropipet sebanyak 100 μ L, kemudian tambahkan masing-masing ke dalam 450 μ L *platelet preparation* dalam tabung *microcentrifuge*. Masing-masing tabung dihomogenkan dengan *vortex* \pm 3 menit. Tiap kelompok uji direplikasi sebanyak empat kali. Serapan sampel pengujian diukur pada panjang gelombang 600 nm sebelum ditambah reagen ADP 5 mM sebanyak 20 μ L. Setelah ditambahkan ADP, sampel uji diinkubasi selama \pm 20 menit, kemudian diukur kembali serapan

plasmanya dengan panjang gelombang yang sama. Persentase agregasi platelet dihitung pada kekeruhan plasma kelompok uji dan kelompok kontrol (Vogel, 2002).

Menurut Moriyama *et al.*, (2009), persentase agregasi platelet dapat ditentukan dengan rumus:

$$(\%) \text{ agregasi platelet} = (1 - B/A) \times 100\%$$

Keterangan: B = absorbansi setelah penambahan ADP

A = absorbansi sebelum penambahan ADP

3.6.8 Uji Aktivitas Antikoagulan

Pengujian antikoagulan dilakukan dengan mengukur waktu yang dibutuhkan plasma untuk mengalami koagulasi. Pengukuran waktu koagulasi dapat dilakukan dengan uji *prothrombin time* (PT) dan *activated partial thromboplastin time* (aPTT) menggunakan alat Coatron[®].

a. *Prothrombin Time* (PT)

Reagen UNIPLASTIN[®] dikeluarkan dari dalam pendingin dan didiamkan pada suhu ruang ± 1 menit sebelum dilakukan pengujian. Coatron[®] dinyalakan dengan menekan tombol “on” dan ditunggu hingga lampu indikator menyala hijau. Sampel yang telah dipreparasi dengan PPP (1:1) dimasukkan ke dalam *cup* sampel sebanyak 25 μ L. Reagen dimasukkan ke dalam *cup* reagen dan inkubasi ± 2 menit. Pilihan menu “*test PPT*” dipilih untuk melakukan pengujian PT. *Cup* sampel diletakkan pada lubang *optic* dan tombol “*optic*” ditekan. Reagen UNIPLASTIN[®] dipipet dan dimasukkan ke dalam *cup* sampel setelah layar pada alat menunjukkan tanda “*active*”. Hasil tes yang muncul pada layar dicatat sebagai perpanjangan waktu koagulasi PT. Pengujian dilakukan dengan pengulangan sebanyak tiga kali.

b. *Activated Partial Thromboplastin Time* (aPTT)

Reagen TECO[®] dikeluarkan dari dalam pendingin dan didiamkan pada suhu ruang ± 1 menit sebelum dilakukan pengujian. Coatron[®] dinyalakan dengan menekan tombol “on” dan tunggu hingga lampu indikator menyala hijau. Sampel yang telah dipreparasi dengan PPP (1:1) dimasukkan ke dalam *cup* sampel sebanyak 25 μ L, lalu

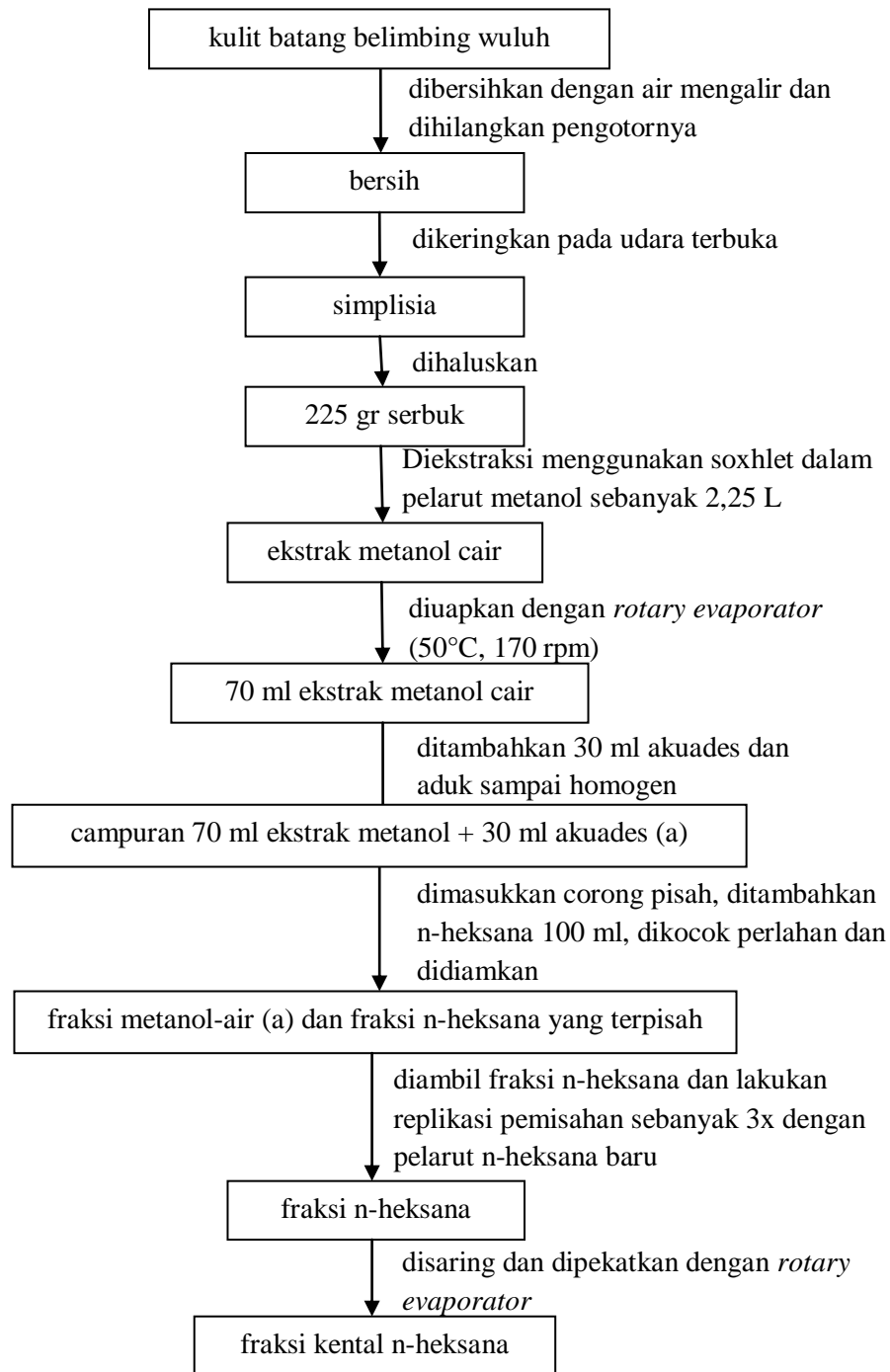
ditambahkan reagen TECO[®] 25 μ L dan inkubasi \pm 3 menit. Reagen CaCl₃ dimasukkan ke dalam *cup* reagen dan inkubasi 3 menit. Pilihan menu “*test aPTT*” dipilih untuk melakukan pengujian aPTT. *Cup* sampel diletakkan pada lubang *optic* dan tombol “*optic*” ditekan. Reagen CaCl₃ dipipet dan dimasukkan ke dalam *cup* sampel setelah layar pada alat menunjukkan tanda “*active*”. Hasil tes yang muncul pada layar dicatat sebagai perpanjangan waktu koagulasi aPTT. Pengujian dilakukan dengan pengulangan sebanyak tiga kali.

3.7 Analisis Data

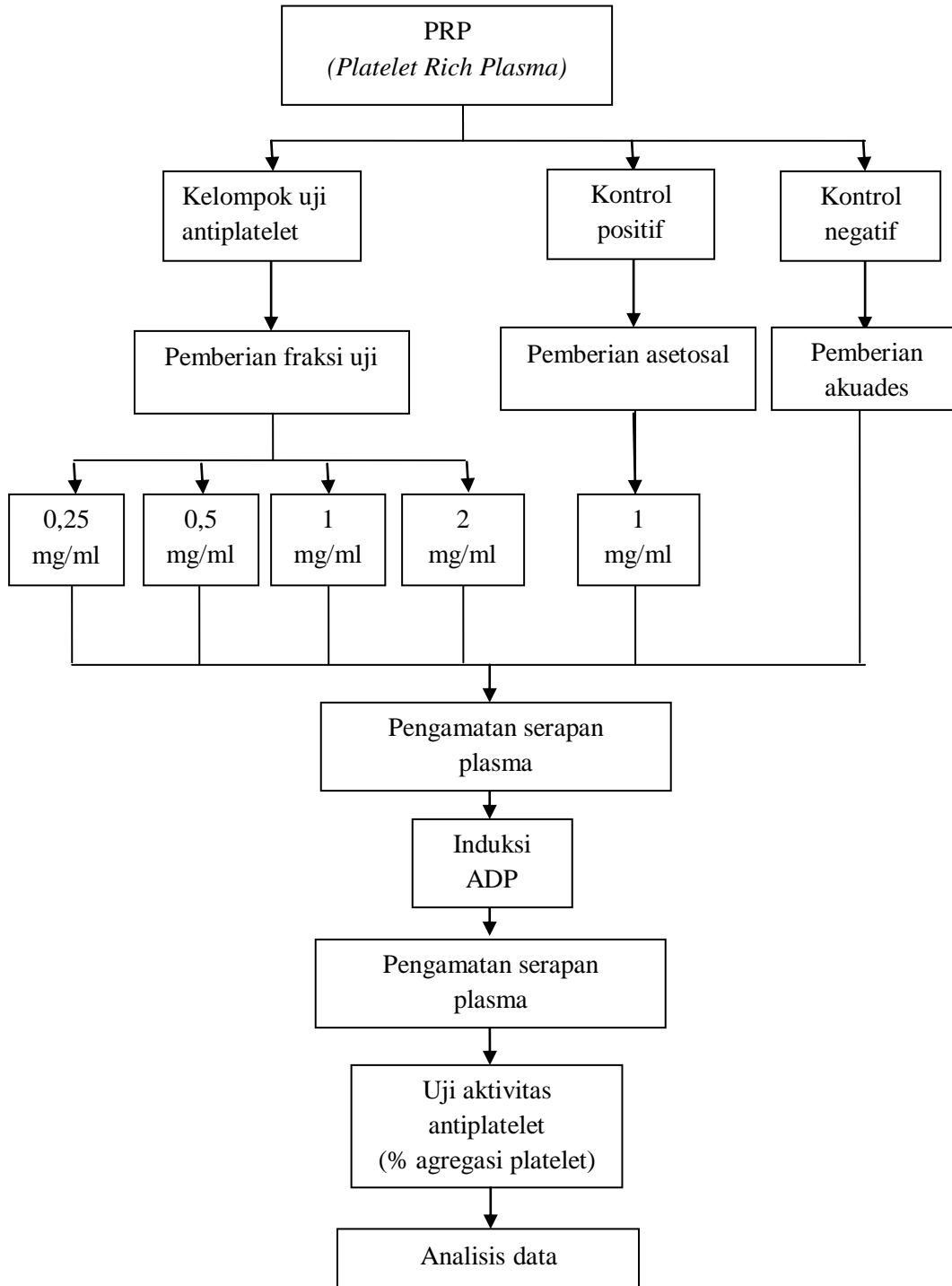
Hasil uji aktivitas antiplatelet adalah persentase agregasi platelet. Hasil uji aktivitas antikoagulan adalah waktu koagulasi PT dan aPTT. Hasil uji dianalisis menggunakan *One Way Anova* ($p < 0,05$). Penentuan perbedaan bermakna tiap kelompok dianalisis dengan metode *post hoc* menggunakan uji *Least Significantly Difference (LSD)* ($p < 0,05$).

3.8 Skema Pelaksanaan Penelitian

3.8.1 Pembuatan Fraksi n-Heksana Kulit Batang Belimbing Wuluh



Gambar 3.3 Alur kerja pembuatan fraksi n-heksana kulit batang belimbing wuluh

3.8.2 Pengujian *in vitro* Antiplatelet

Gambar 3.4 Alur kerja penentuan uji aktivitas antiplatelet