



REPUBLIK INDONESIA
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA

SURAT PENCATATAN CIPTAAN

Dalam rangka perlindungan ciptaan di bidang ilmu pengetahuan, seni dan sastra berdasarkan Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta, dengan ini menerangkan:

Nomor dan tanggal permohonan : EC00201986715, 5 Desember 2019

Pencipta

Nama : **Martina Kurnia Rohmah**
Alamat : Jalan Kebonsari 1 No.19 C Surabaya, Surabaya, Jawa Timur, 60233
Kewarganegaraan : Indonesia

Pemegang Hak Cipta

Nama : **Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat STIKES Rumah Sakit Anwar Medika**
Alamat : Jalan By Pass KM 33 Krian Sidoarjo, Sidoarjo, Jawa Timur, 61263
Kewarganegaraan : Indonesia
Jenis Ciptaan : **Buku Panduan/Petunjuk**
Judul Ciptaan : **Prosedur Pengujian Aktivitas Antiplatelet, Antikoagulan Dan Trombolitik Secara In Vitro Untuk Pengembangan Kandidat Obat Baru**

Tanggal dan tempat diumumkan untuk pertama kali di wilayah Indonesia atau di luar wilayah Indonesia : 5 Desember 2019, di Sidoarjo

Jangka waktu perlindungan : Berlaku selama 50 (lima puluh) tahun sejak Ciptaan tersebut pertama kali dilakukan Pengumuman.

Nomor pencatatan : 000168572

adalah benar berdasarkan keterangan yang diberikan oleh Pemohon.

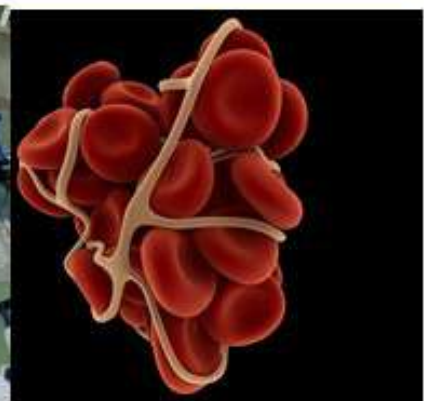
Surat Pencatatan Hak Cipta atau produk Hak terkait ini sesuai dengan Pasal 72 Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta.



a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL

Dr. Freddy Harris, S.H., LL.M., ACCS.
NIP. 196611181994031001

PROSEDUR PENGUJIAN AKTIVITAS
ANTIPLATELET, ANTIKOAGULAN, DAN
TROMBOLITIK SECARA *IN VITRO*
UNTUK PENGEMBANGAN
KANDIDAT OBAT BARU



Oleh:

Martina Kurnia Rohmah, S.Si., M.Biomed.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
DAFTAR ISI	ii
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	2
BAB III PROSEDUR	
Prosedur I: Pengujian Aktivitas Antiplatelet Secara <i>In Vitro</i>	10
Prosedur II: Pengujian Aktivitas Antikoagulan Secara <i>In Vitro</i>	12
Prosedur III: Pengujian Aktivitas Trombolitik Secara <i>In Vitro</i>	15
DAFTAR PUSTAKA	17

BAB I PENDAHULUAN

Hemostasis merupakan mekanisme untuk menutup pembuluh dari saat terjadi luka, menjaga keenceran darah, serta menghilangkan bekuan darah setelah perbaikan integritas pembuluh darah. Hemostasis meliputi 3 proses utama yaitu agregasi platelet, koagulasi, dan trombolitik. Mekanisme agregasi platelet dan koagulasi mengarah pada proses pembekuan darah sedangkan trombolitik terjadi untuk menstabilkan kondisi keenceran darah dalam hemostasis.

Saat ini pengujian hemostasis dengan mengamati aktivitas agregasi platelet, koagulasi, dan fibrinolitik telah banyak dikembangkan untuk berbagai pengujian mulai dari diagnosis penyakit hingga uji aktivitas kandidat obat seperti obat anti pembekuan darah melalui tahapan optimasi untuk mendapatkan hasil yang valid.

Berbagai gangguan hemostasis utamanya pada peningkatan aktivitas pembekuan darah merupakan hal yang serius dan perlu penanganan cepat baik pada tahap diagnosis maupun terapinya. Peningkatan aktivitas pembekuan darah ini berkaitan dengan munculnya sumbatan (thrombus) yang dapat menyebabkan berbagai gangguan pada pembuluh darah dan jantung seperti stroke, infark miokard, emboli, serta gangguan sirkulasi dan fungsi jantung lainnya.

Prosedur ini dibuat untuk menjadi pedoman bagi peneliti ataupun akademisi yang ingin mengembangkan metode dan prosedur secara *in vitro* berkaitan dengan aktivitas anti pembekuan darah melalui mekanisme agregasi platelet, koagulasi, maupun trombolitik. Bahan kandidat obat dipreparasi sedemikian kemudian diujikan ke dalam sampel darah. Prosedur ini dikembangkan dengan metode yang telah ada namun telah mengalami modifikasi sesuai dengan proses optimasi yang telah dilakukan di Laboratorium.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hemostasis

Hemostasis merupakan proses fisiologi yang penting untuk menghentikan terjadinya perdarahan. Berdasarkan mekanisme biologis, sel-sel endotel pada dinding pembuluh darah yang utuh bersifat nontrombogenik, sehingga mencegah trombosit menempel pada permukaannya. Sifat nontrombogenik ini akan hilang bila endotel mengalami kerusakan atau terkelupas karena adanya cedera vaskuler dan berkurangnya produksi senyawa antitrombotik dan meningkatnya produksi senyawa protrombotik. Berbagai senyawa protrombotik yang dilepaskan ini akan mengaktifkan sistem pembekuan darah dan menyebabkan menurunnya aktivitas fibrinolisis sehingga meningkatkan kecenderungan untuk terjadi thrombosis (Setiabudy, 2009). Akibat adanya cedera vaskuler maka otot polos pada arteriol dan venula akan berkonstriksi dan produksi prostasiklin distimulasi oleh kontak dengan platelet atau leukosit yang teraktivasi. Prostrasiklin memiliki kemampuan antiplatelet dan vasodilator yang kuat sehingga merupakan antagonis biologis terhadap vasokonstriktor yang berasal dari platelet yaitu tromboksan (Brunton, 2006).

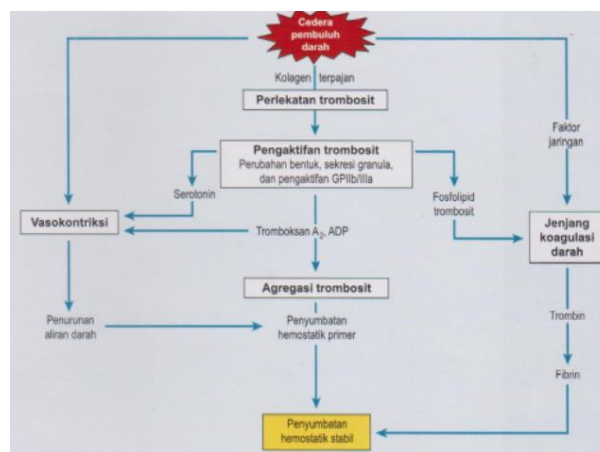
Hemostasis yang normal akan menghentikan perdarahan tanpa meninggalkan bekuan dan sumbatan (thrombus) yang justru akan mengganggu fisiologis tubuh, sehingga mekanisme hemostasis meliputi 3 proses yang berjalan normal yaitu: 1) agregasi platelet (trombosit), 2) proses pembekuan darah (koagulasi) dan 3) lisis bekuan (fibrinolisis) (Wang *et al.*, 2014). Komponen penting di dalam hemostasis adalah trombosit (Wang *et al.*, 2014), faktor koagulasi (Tanaka *et al.*, 2009), dan plasmin (Lijnen *et al.*, 2000). Aktivitas hemostasis yang normal dan secara alami terjadi akan membentuk bekuan (*clot*) dan akan lisis jika proses perbaikan jaringan telah terjadi.

Gangguan hemostasis dapat terjadi karena faktor genetik dan faktor gangguan vaskular. Adanya faktor genetik dapat berupa kelainan pada tingkat genetik yang dapat meningkatkan level pro koagulan sehingga kemampuan koagulasi lebih cepat dan lebih sering (Hanson, 2012). Gangguan vaskular dapat terjadi karena

peningkatan viskositas darah dan peningkatan kolesterol dan gula darah, adanya infeksi dan oksidatif stress. Sistem hemostasis yang tidak teregulasi secara baik juga disebabkan disebabkan cacat bawaan atau karena mekanisme pembekuan abnormal dan bisa disebabkan efek sekunder dari infeksi atau kanker (Katzung dan Trevor, 2015).

2.2 Sistem dan Mekanisme Pembekuan Darah

Respon hemostasis normal terhadap kerusakan pembuluh darah bergantung pada interaksi erat antara dinding pembuluh darah, trombosit di dalam darah, dan faktor koagulasi (pembekuan) darah yang terlihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 1 Keterlibatan Pembuluh Darah, Trombosit, dan Koagulasi Darah Dalam Hemostasis (Hoffbrand dan Moss, 2011).

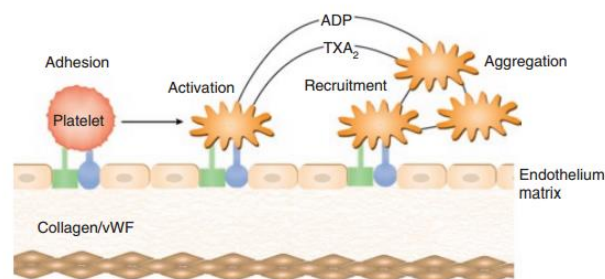
Pengkaktifan trombosit berupa perubahan bentuk, sekresi granula, dan pengaktifan reseptor GPIIb/IIIa akan menyebabkan pelepasan serotonin, ADP dan tromboxan A₂ (TXA₂) dan fosfolipid trombosit. Sedangkan cedera jaringan maupun kontrak trombosit mengaktifkan faktor jaringan tromboplastin. Serotonin menyebabkan terjadinya vasokonstriksi yang menurunkan aliran darah untuk mencegah perdarahan akibat cedera. ADP dan TXA₂ menyebabkan agregasi trombosit dan penyumbatan primer. Sedangkan fosfolipid trombosit memicu terjadinya koagulasi (Hoffbrand dan Moss, 2011).

2.2.1 Agregasi Trombosit

Trombosit merupakan bentuk terkecil dari jenis sel-sel darah, karena hanya fragmen dari megakariosit sitoplasma, namun trombosit memiliki peran penting

dalam hemostasis normal dan merupakan kontributor penting untuk gangguan trombotik. Adanya pemahaman tentang peran trombosit dalam hemostasis dan gangguan yang disebabkan oleh fungsi trombosit yang abnormal telah menghasilkan terapi baru yang penting untuk penyakit trombotik (Bakta, 2007). Trombosit berperan dalam melepaskan trombikase yang dapat mengubah prothrombin menjadi thrombin. Thrombin akan mengubah fibrinogen menjadi benang fibrin.

Pembentukan sumbat trombosit terjadi melalui beberapa tahapan yaitu adhesi trombosit, aktivasi, dan agregasi trombosit. Berikut ini merupakan proses awal terjadinya koagulasi yaitu berupa agregasi trombosit.



Gambar 2 Proses Agregasi Thrombosis pada Proses Pembekuan Darah (Gross dan Weitz, 2009)

Setelah cedera vaskular, protein Von Willebrand Factor (VWF) akan menjadi jembatan antara kolagen endothelial dinding pembuluh darah dan reseptor permukaan dari platelet yaitu Glikoprotein complex Ib (GpIb) dan menyebabkan adesi platelet. Dalam hal ini GpIb merupakan reseptor utama bagi protein VWF endotel. Proses ini merupakan tahap adesi platelet. Setelah proses adhesi platelet, terjadi proses degranulasi platelet yang menyebabkan pelepasan kalsium. Kalsium akan berikatan dengan fosfolipid pada aktivitas kedua sebagai tempat perlekatan berbagai faktor koagulasi (Palta *et al.*, 2014).

Trombosit yang lebih dahulu melekat akan memproduksi Adenosin Difosfat (ADP) dan Tromboksan A₂ (TXA₂). ADP dan TXA₂ akan menjadi sinyal untuk mengumpulkan trombosit ke lokasi cedera (agregasi platelet). Aktivitas trombosit memicu jalur sinyal yang menginduksi perubahan konformasi di GRIIb/IIIa (α IIb β 3), integrin yang sangat berlimpah di permukaan trombosit kemudian meningkatkan afinitas fibrinogen. Fibrinogen kemudian mengikat dan menjadi jembatan bagi trombosit yang berdekatan untuk membentuk agregat (Gross dan

Weitz, 2009). Agregasi trombosit merupakan suatu tahapan yang menyebabkan organel trombosit melepaskan simpanan molekul kimiawinya keluar salah satunya adanya enzim trombokinase. TXA₂ merupakan produk COX1 yang mengaktifkan agregasi trombosit sedangkan prostasiklin dihasilkan pada mekanisme hemostasis oleh sel endotel untuk membatasi agregasi trombosit (Despopoulos dan Silbernagl, 2003).

2.2.2 Mekanisme Pembekuan Darah (Koagulasi)

Pembekuan darah terjadi melalui interaksi 20 faktor pembekuan darah dengan reaksi proteolitik yang berurutan atau berangkai (*coagulation cascade*). Pada setiap tahap, satu faktor pembekuan darah mengalami proteolysis dan menjadi protease yang aktif. Protein yang terbentuk mengakibatkan faktor pembekuan berikutnya sampai akhir terbentuknya suatu bekuan fibrin yang memadat (Gunawan, 2007). Sebagian besar faktor pembekuan darah merupakan prekursor enzim proteolitik yang diketahui dengan zymogen dan bersirkulasi dalam keadaan tidak aktif. Sebagian besar prokoagulan dan antikoagulan diproduksi oleh hati kecuali faktor III, IV dan VIII (Palta *et al.*, 2014).

Sampai saat ini terdapat 20 faktor pembekuan darah. Berikut ini merupakan daftar faktor pembekuan darah:

Tabel 1 Faktor Pembekuan Darah

NOMOR FAKTOR PEMBEKUAN	NAMA FAKTOR PEMBEKUAN DARAH	FUNGSI	MASA HIDUP (JAM)	KONSENTRASI DALAM PLASMA (MG/L)
I	Fibrinogen	Pembentuk bekuan (<i>clot</i>)	90	3000
II	Prothrombin	Aktivasi faktor I, V, VII, VIII, XI, XIII, protein C dan trombosit	65	100
III	TF (<i>tissue factor</i>)	Co faktor VIIa	-	-
IV	Calcium	Memfasilitasi ikatan faktor koagulasi pada phospholipid pada	-	-
V	Proacclerin (Faktor Labil)	Co faktor kompleks X-prothrombinase	15	10
VI	Tidak ditetapkan			
VII	Prokonvertin (Faktor stabil)	Mengaktifkan faktor IX dan X	5	0.5
VIII	Faktor Antihemofilia A	Co faktor kompleks IX-tenase	10	0.1
IX	Faktor Antihemofilia B (Faktor Christmas)	Mengaktifkan faktor X, membentuk kompleks tenase dengan faktor VIII	25	5

X	Faktor Stuart-Prower	Membentuk kompleks protrombinase dengan faktor V dan mengaktifkan faktor II	40	10
XI	Plasma thromboplastin	Mengaktifkan faktor IX	45	5
XII	Faktor Hageman	Mengaktifkan faktor XI, VII, dan prekallikerin	-	-
XIII	Faktor penstabil fibrin	Pembentuk anyaman fibrin	200	30
XIV	Prekallikerin (F Fletcher)	Serin protease zymogen	35	-
XV	HMWK (<i>High Molecular Weight Kininogen</i>) – (F Fitzgerald)	Co factor	150	-
XVI	VWF	Berikatan dengan VIII, memediasi adhesi platelet	12	10 µg/mL
XVII	Antithrombin III	Menghambat IIa, Xa dan protease lain	72	0.15 – 0.2 mg/mL
XVIII	Heparin cofactor II	Menghambat IIa	60	-
XIX	Protease C	Menginaktivasi Va dan VIIIa	0.4	-
XX	Protase S	Cofactor untuk aktivase protein C	-	-

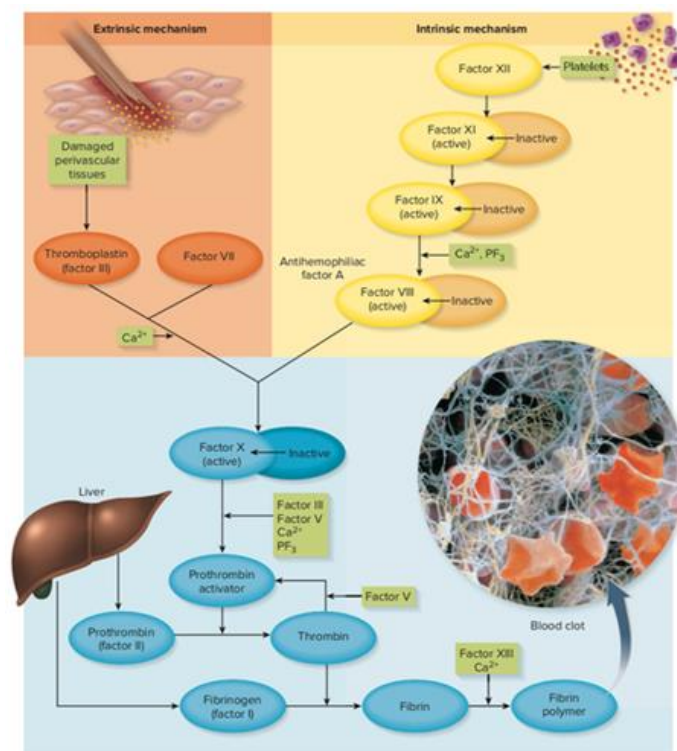
(Sumber: Palta, 2014)

Proses pembekuan darah terdiri dari 3 tahap yaitu 1) aktivasi tromboplastin, 2) pembentukan thrombin dari protrombin dan 3) pembentukan fibrin dari fibrinogen. Fibrinogen yang berubah menjadi fibrin dan tidak larut akan membuat darah membeku. Tahapan koagulasi yang pertama yaitu aktivasi tromboplastin. Tromboplastin atau trombokinas (FIII) merupakan protein yang terdapat pada jaringan sub endothelial, permukaan trombosit, maupun sel darah putih. Tromboplastin mengubah protein zymogen tromboplastin protrombin (FII) menjadi thrombin (FIIa). Aktivasi tromplastin terjadi melalui 2 mekanisme yaitu mekanisme ekstrinsik dan intrinsik.

Pada mekanisme ekstrinsik, tromboplastin berasal dari jaringan di luar pembuluh darah yang rusak. Tromboplastin jaringan akan bereaksi dengan faktor VIIa dengan bantuan kalsium akan menghentikan faktor X. Faktor Xa bersama-sama dengan faktor Va, ion kalsium dan fosfolipid trombosit akan mengubah protrombin menjadi thrombin. Trombin akan diubah menjadi fibrin monomer. Fibrin akan membentuk polimer dan akan stabil terhadap enzim proteolitik misalnya plasmin karena adanya faktor XIIIa (Gunawan, 2007).

Mekanisme intrinsik dipicu oleh adanya aktivitas kontak permukaan trombosit dengan sel endotel. Sel endotel pembuluh darah yang utuh bersifat nontrombogenik, sehingga mencegah trombosit menempel pada permukaannya.

Sifat nontrombogenik ini akan hilang bila endotel mengalami kerusakan/ terkelupas (cedera vaskular) karena berkurangnya produksi senyawa antitrombotik dan meningkatnya produksi senyawa protrombotik. Pembekuan darah pada mekanisme ini dimulai bila faktor Hageman (FXII) berlekatan dengan permukaan subendotel yang bermuatan negatif misalnya kolagen subendotel pembuluh darah yang rusak. Reaksi ini dipercepat dengan pembentukan kompleks antara faktor XII, *Fitzgerald* dan Prekalarikrein. Faktor XIIa selanjutnya akan mengaktifasi faktor XI dan faktor XIa bersama ion kalsium akan mengaktifasi faktor IX. Faktor IX aktif, bersama-sama faktor VIII, ion kalsium dan fosfolipid akan mengaktifkan instrinsik (Gunawan, 2007). Berikut ini merupakan gambar kaskade koagulasi melalui mekanisme ekstrinsik dan intrinsik:

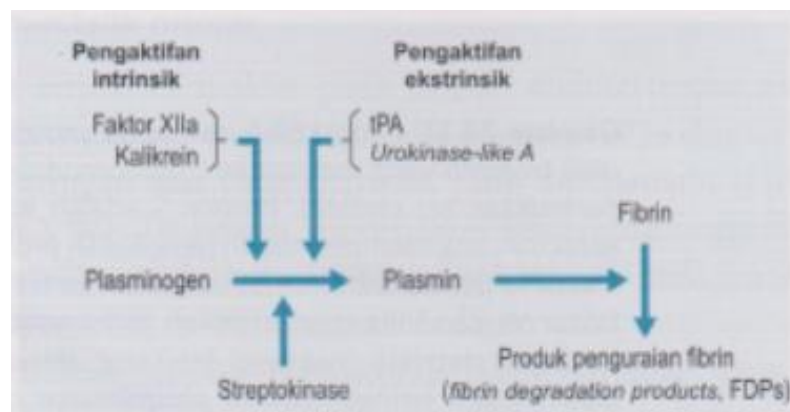


Gambar 3 Kaskade Koagulasi Mekanisme Ekstrinsik dan Intrinsik (Saladin, 2018)

Faktor-faktor yang menghentikan proses pembekuan darah ialah: 1) larutnya faktor pembekuan darah pada darah yang mengalir, 2) klirens bentuk aktif faktor pembekuan darah yang cepat oleh hati, 3) mekanisme umpan balik dimana thrombin menghambat aktivitas faktor V dan VII, dan 4) adanya mekanisme antikoagulasi alami terutama oleh AT-III, protein C dan S (Gunawan, 2007).

2.2.3 Fibrinolisis

Fibrinolisis merupakan kondisi pecahnya fibrin oleh aktivitas plasminogen, aktivator plasminogen dan inhibitor. Fibrinolisis merupakan rangkaian proses hemostasis setelah koagulasi terjadi secara utuh. Fibrinolisis diperlukan untuk menstabilkan fisiologis vaskuler agar tidak terbentuk sumbatan atau trombus yang dapat memunculkan sejumlah gangguan. Proses fibrinolisis dapat dijelaskan pada diagram berikut:



Gambar 4 Mekanisme Fibrinolisis

Pengaktifan fibrinolisis jalur intrinsik distimulasi oleh Faktor XIIa dan Kalikrein, sedangkan pengaktifan ekstrinsik distimulasi oleh tPA dan urokinase-like A. Kedua faktor mengaktifkan plasminogen menjadi plasmin. Plasmin mampu mencerna fibrinogen, fibrin, faktor V, VII, dan banyak protein lain. Pemutusan ikatan peptida dalam molekul fibrin dan fibrinogen menghasilkan berbagai produk pecahan (degradasi). Plasmin dalam diinaktifkan oleh inhibitor poten α 2-antiplasmin dan α 2-makroglobulin (Hoffbrand dan Moss, 2011).

2.3 Hubungan Gangguan Hemostasis dengan Patogenesis Sejumlah Penyakit

Gangguan hemostasis sering dikaitkan dengan sejumlah penyakit. Adanya thrombus atau sumbatan berupa bekuan akibat gangguan hemostasis dapat mengganggu organi vital tubuh seperti pembuluh darah, jantung, ginjal, dan organ lainnya. Gangguan hemostasis berupa peningkatan level protein pro koagulan VWF berkaitan dengan pathogenesis penyakit ischemic stroke. Gangguan ini

diakibatkan adanya variasi gen ADAMTS13 dan peningkatan level protein VWF yang meningkatkan potensi bekuan dan ischemic stroke (Hanson, 2012).

Gangguan hemostasis banyak berhubungan dengan gangguan penyakit jantung. Peningkatan level sejumlah protein faktor koagulasi seperti fibrinogen, homosistein, faktor VII, von Willebrand, aktivator plasminogen jaringan, plasminogen aktivator inhibitor-1 dan D-dimer berhubungan dengan penyakit Kardiovaskular (Lioudaki dan Ganotaksis, 2010). Peningkatan level D-dimer yang berperan dalam melisiskan polimer benang fibrin pada tahap fibrinolisis menyebabkan lisis thrombus semakin lama dan berhubungan dengan jantung koroner dan atrial fibrilasi (O'Neal *et al.*, 2015). Gangguan hemostasis juga bisa disebabkan oleh peningkatan glukosa darah dan berimplikasi pula pada jantung koroner. Peningkatan glukosa darah menyebabkan terjadinya hiperagregasi platelet dan terbentuk bekuan yang berpotensi untuk menjadi sumbatan dan gangguan jantung koroner (Ghoshal dan Bhattacharyya, 2014).

Gangguan hemostasis berupa ketidakseimbangan pro dan antikoagulan menyebabkan terjadinya thrombosis yang meningkatkan resiko gagal ginjal 2 kali lebih cepat. Trombosis dapat mengganggu filtrasi darah pada glomerulus yang menyebabkan gagal ginjal dan albuminuria (Lutz *et al.*, 2014).

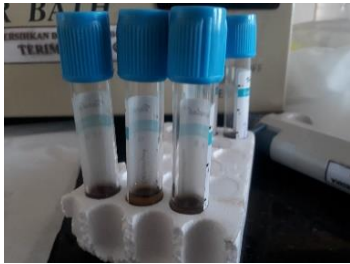


Gangguan hemostasis juga dapat menyebabkan penyakit Alzheimer. Alzheimer merupakan salah satu bentuk dementia dimana terjadi degenerasi dan disfungsi otak akibat penumpukan protein β -ameloid pada otak dan pembuluh darah otak. Hiperagregasi platelet dapat mengendapkan sejumlah Ameloid Precursor Protein (APP) yang dapat menyebabkan penumpukan protein β -ameloid (Ghoshal dan Bhattacharyya, 2014).


PROSEDUR I
PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIPLATELET SECARA *IN VITRO*

A. Prinsip Pengujian:

Uji aktivitas antiplatelet secara *in vitro* dapat dilakukan dengan mengamati penghambatan agregasi platelet yang terjadi saat plasma darah diberi perlakuan beserta induksi dengan Adenosine Diphosphate (ADP). ADP merupakan molekul biokimia yang dilepaskan oleh platelet untuk menstimulasi terjadinya agregasi platelet. Agregat platelet yang terbentuk dinilai dengan cara membandingkan serapan plasma sebelum dan sesudah diberi ADP menggunakan spektrofotometer UV Vis. Semakin besar penurunan serapan platelet plasma, maka semakin besar agregat yang terbentuk.

B. Prosedur:

No.	Tahapan Prosedur	Ilustrasi
1	Platelet Rich Plasma (PRP) sebanyak 1 ml ditambahkan dengan larutan uji (obat atau bahan aktif kandidat obat) sebanyak 250 μ l.	
2	Inkubasi pada suhu 37% di dalam waterbath selama 20 menit.	
3	Setelah diinkubasi, PRP diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan menggunakan Platelet Poor Plasma (PPP) sebagai blanko dengan panjang gelombang sekitar 500 – 550 nm.	

4	PRP yang telah diukur serapannya kemudian ditambah dengan Adenosine Diphosphate (ADP) sebanyak 20 µl lalu diinkubasi di dalam waterbath pada suhu 37°C selama 20 menit.	
5	Ukur serapannya kembali.	

C. Rumus Perhitungan Aktivitas Inhibisi Agregasi Platelet:

Rumus 1 : Persentase (%) Inhibisi Agregasi Platelet:

$$\text{Persentase (\%)} \text{ Inhibisi Agregasi Platelet} = \frac{(1 - B) \times 100\%}{A}$$

Keterangan:

B: Nilai absorbansi setelah penambahan ADP

A: Nilai absorbansi sebelum penambahan ADP

Rumus 2: Perhitungan Persentase Inhibisi Agregasi Relatif Terhadap Kontrol Negatif (Untuk Uji Aktivitas Obat atau Kandidat Obat)

$$\text{Persentase (\%)} \text{ inhibisi agregasi relatif terhadap kontrol negatif} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

Keterangan:

A: persentase inhibisi agregasi kontrol negatif

B: persentase inhibisi agregasi perlakuan




PROSEDUR II
PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIKOAGULAN SECARA *IN VITRO*
DENGAN MELIHAT NILAI PT DAN APTT

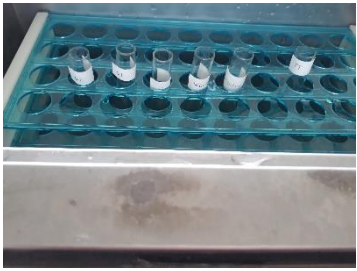
D) PROSEDUR PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIKOAGULAN SECARA *IN VITRO* DENGAN MELIHAT NILAI PT

A. Prinsip Pengujian:

Uji aktivitas antikoagulan secara *in vitro* dengan mengamati aktivitas pada jalur intrinsik dan ekstrinsik yang melibatkan sejumlah faktor pembekuan darah. Uji Prothrombine Time (PT) dilakukan untuk melihat aktivitas jalur ekstrinsik dan jalur bersama yaitu untuk mengamati aktivitas berbagai faktor I (fibrinogen), faktor II (prothrombin), faktor V (proakselerin), faktor VII (prokonvertin), dan faktor X (faktor Stuart). Perubahan pada faktor-faktor ini akan memperpanjang maupun memperpendek nilai PT. Suatu obat atau kandidat obat dikatakan memiliki aktivitas antikoagulan bila memperpanjang nilai PT dibandingkan dengan kondisi normal (kontrol negatif).

B. Prosedur Pengujian:

No.	Tahapan Prosedur	Ilustrasi
1	Inkubasi reagen PT pada suhu 37°C di dalam waterbath selama 10 menit	
2	Pipet sebanyak 25 µl sampel ke dalam tabung serologi dan inkubasi pada suhu 37°C selama 1 – 2 menit	
3	Tambahkan 50 µl reagen PT ke dalam sampel dalam waterbath 37°C	

4	Mencatat waktu sampai terbentuknya bekuan sebagai nilai PT	
---	--	--

C. Rumus Perhitungan Aktivitas Antikoagulan:

Persentase inhibisi koagulasi berdasarkan nilai PT =



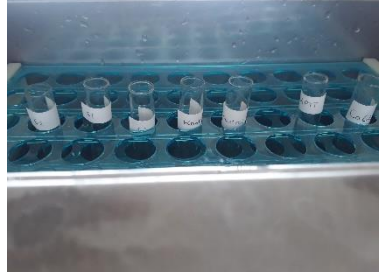
$$\frac{\text{PT kelompok perlakuan} - \text{PT kontrol negatif}}{\text{PT kontrol negatif}} \times 100\%$$

II) PROSEDUR PENGUJIAN AKTIVITAS AKTIKOAGULAN SECARA *IN VITRO* DENGAN MELIHAT NILAI APTT

A. Prinsip Pengujian:

Uji aktivitas antikoagulan secara *in vitro* dengan mengamati aktivitas pada jalur intrinsik dan ekstrinsik yang melibatkan sejumlah faktor pembekuan darah. Uji Activated Partial Tromboplastin Time (APTT) dilakukan untuk melihat aktivitas jalur intrinsik dan jalur bersama yaitu untuk mengamati aktivitas faktor XII (faktor Hagemen), pre-kalikrein, kininogen, faktor XI (plasma tromboplastin antecedent, PTA), faktor IX (factor Christmas), faktor VIII (antihemophilic factor, AHF), faktor X (faktor Stuart), faktor V (proakselerin), faktor II (protrombin) dan faktor I (fibrinogen).

B. Prosedur Pengujian:

No.	Tahapan Prosedur	Ilustrasi
1	Hangatkan CaCl ₂ (0.025 M) dan reagen APTT dalam waterbath pada suhu 37 ⁰ C selama 10 menit	
2	Pipet 25 µl sampel ke dalam tabung serologis dan hangatkan dalam waterbath pada suhu 37 ⁰ C selama 1-2 menit.	
3	Tambahkan 25 µl reagen APTT dan inkubasi selama 3 menit pada suhu 37 ⁰ C	
4	Tambahkan 25 µl CaCl ₂	
5	Hitung waktu pembekuan plasma sebagai nilai APTT	

C. Rumus Perhitungan Aktivitas Antikoagulan:

Persentase inhibisi koagulasi berdasarkan nilai APTT =

$$\frac{\text{APTT kelompok perlakuan} - \text{APTT kontrol negatif}}{\text{APTT kontrol negatif}} \times 100\%$$

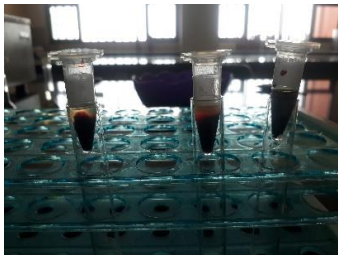
PROSEDUR III
PROSEDUR PENGUJIAN AKTIVITAS TROMBOLITIK
SECARA *IN VITRO*

A. Prinsip Pengujian:

Uji aktivitas trombolitik *in vitro* digunakan untuk melihat kemampuan bekuan untuk lisis dengan melihat seberapa banyak retraksi bekuan atau plasma yang keluar dari bekuan. Untuk menguji aktivitas obat atau kandidat obat secara *in vitro*, maka obat atau kandidat obat dapat diberikan pada darah yang sudah membeku dengan menimbang terlebih dahulu massa bekuan awal. Inkubasi dilakukan untuk memberikan waktu pada obat atau kandidat obat untuk dapat bereaksi di dalam bekuan dengan suhu menyesuaikan suhu tubuh manusia yaitu $\pm 37^{\circ}\text{C}$. Setelah dilakukan inkubasi dengan waktu tertentu, selanjutnya retraksi bekuan diambil dan dihitung kembali massa bekuan sebagian bekuan akhir.

B. Prosedur Pengujian:

No.	Tahapan Prosedur	Ilustrasi
1	Setiap 500 μl darah dipindah ke mikrotube yang telah ditimbang terlebih dahulu.	
2	Darah kemudian dibekukan kemudian beratnya ditimbang sebagai massa bekuan awal.	

<p>3</p>	<p>Setelah ditimbang, darah diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit setelah terbentuk bekuan.</p>	
<p>4</p>	<p>Secara langsung plasma akan terperas keluar dari bekuan.</p>	
<p>5</p>	<p>Setelah 60 menit, keluarkan mikrotube berisi darah diambil serum hingga tertinggal bekuan saja kemudian bekuan ditimbang sebagai massa bekuan akhir.</p>	

C. Rumus Perhitungan Aktivitas Trombolitik

$$\text{Persentase (\%) Trombolitik} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

Keterangan:

A : Berat bekuan (*clot*) awal. B : Berat bekuan (*clot*) akhir

$$\begin{aligned} &\text{Persentase (\%) Aktivitas Trombolitik relatif terhadap kontrol negatif} \\ &= \frac{\% \text{ trombolitik kelompok perlakuan} - \% \text{ trombolitik kontrol negatif}}{\% \text{ trombolitik kontrol negatif}} \times 100\% \end{aligned}$$

DAFTAR PUSTAKA

- Bakta, I.M. 2007. Hematologi Klinis Ringkasan. *Penerbit Buku Kedokteran. EGC*: Jakarta.
- Brunton, L.L. 2006. The Pharmacological Basis Therapeutics. 11th. Edition. New York: Mc Graw Hill.
- Despopoulos, M., dan Silbernagl, S.M.D. 2003. Color Atlas of Physiology 5th ed. New York: Thieme.
- Ghoshal, Kakali. Dan Bhattacharyya, M. 2014. Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis. *Hindawi Publishing Corporation*. Vol 2014. Article ID 781857: 1-17.
- Gross, P. L and Weitz, J. L. 2009. New Antithrombotic Drugs. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* (86): 139-146.
- Gunawan, S.G. 2007. Farmakologi dan Terapi. Edisi 5. Departemen Farmakologi dan Terapietik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia: Jakarta.
- Hanson, Ellen. 2012. The Hemostatic Pathway in Ischemic Stroke. University of Gothenberg: Sweden: 1-87.
- Hoffbrand, A.V., dan Moss, P.A.H. 2011. Kapita Selekta Hematologi Edisi 6. *Penerbit Buku Kedokteran. EGC*: Jakarta.
- Katzung, B.G., dan Trevor, A.J. 2015. Basic and Clinical Pharmacology 13th Edition. United States: McGraw-Hill Education.
- Lijnen, HR. *et al.* 2000. Hematology Basic Principles and Practice. 3. *Churchill Livingstone*. New York: 1804-1814.
- Lim, T.K., 2012. Carica papaya. In: Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. *Springer*. 1: 693-717.
- Lioudaki, E.L and Ganotakis, E.S. 2010. Associations of Thrombotic-Hemostatic Factors with Cardiovascular Disease. *The Open Clinical Journal*. Number 3: 25-37.
- Lutz, J., *et al.* 2014. Haemostasis in Chronic Kidney Disease. *Nephrol Dial Transplant*. Number 29: 29-40.
- O'Neal, W.T. Soliman, E.Z., Howard, G., Howard, V.J., Scafford, M.M., Cushman, M. dan Zakai, N.A. 2015. Inflammation and Hemostasis in Atrial Fibrillation

- and Coronary Heart Disease: The Reasons for Geographic and Racial Differences in Stroke Study. *Atherosclerosis*. 243 (1): 192-197.
- Palta, Sanjeev., Saroa, Richa., Palta, Anshu. 2014. Overview of the Coagulation System. *Indian Journal of Anaesthesia*. Vol 58 (5): 515 – 523.
- Saladin, Kenneth. 2018. Anatomy dan Physiology: The Unity of Form and Function. McGraw-Hill Education. ISBN10: 1259880206
- Setiabudy, R.D, editor. 2009. Hemostasis dan Trombosis. Edisi 4. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
- Singhai, A., Juneja, Vikas., Abbas, S., Jha, R.K. 2016. The Effect of Carica papaya Leaves Extract Capsule on Platelets Count and Hematokrit Levels in Acute Febrile Illness with Thrombocytopenia Patient. *International Journal of Medical Research and Health Sciences*. 5 (1): 254-257.
- Syafriana, V., Rentiana, R.D., dan Poeloengan, M. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun dan Biji Pepaya (*Carica papaya L.*) terhadap *Streptococcus agalactiae*. *Sainstech Farma*. Vol 9 (2): 19-22.
- Tanaka, K.A., *et al.* 2009. Blood Coagulation: Hemostasis and Thrombin Regulation. *Anesthesia and Analgesia*. Vol. 108 (5): 1433 – 1446.
- Wang Y. *et al.* 2014. Plasma Fibronectin Supports Hemostasis and Regulates Thrombosis. *J Clin Invest* (124): 4281-4293.