

STUDI AKTIVITAS ANTIPLATELET DAN ANTITROMBOSIS EKSTRAK AIR DAUN SUKUN (*Artocarpus altilis* (Park.) Fosberg)

The Antiplatelet and Antithrombotic Activities Study of the Artocarpus altilis (Park.) Fosberg Leaves Water Extract

Indah Hastuti¹⁾, Arief Nurrochmad²⁾, Ika Puspitasari²⁾, Nanang Fakhruudin^{3*)},

¹⁾Program Magister Farmasi Sains, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

²⁾Departemen Farmakologi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

³⁾Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

*e-mail: nanangf@ugm.ac.id

ABSTRACT

The mature breadfruit (*Artocarpus altilis*) leaves infusion has been traditionally used by Indonesian folks for curing heart diseases and stroke. The key mechanisms underlying these diseases are platelet aggregation and thrombosis. There is no evidence about the efficacy of the water extract of *A. altilis* leaves (EADS) against platelet aggregation and thrombosis, in order to provide scientific evidence regarding its use by the community. This study aimed to investigate the antiplatelet and antithrombotic activities of EADS. Ticagrelor, an antiplatelet drug agonist of P2Y₁₂ receptor was used as a positive control. The antiplatelet activity of EADS was assessed in vitro by Light Transmittance Aggregometry (LTA) method using human platelet induced by Adenosine Diphosphate (ADP); whereas the antithrombotic activity was evaluated in vivo using Acute Pulmonary Thromboembolism (APT) method in male adult Swiss mice induced by the mixture of epinephrine (0.7 mg/kg bw) and collagen (11 mg/kg bw). The number and the onset of dead and paralysis mice were observed; and the number of thrombus was calculated under the microscope. We found that EADS demonstrated a weak antiplatelet activity (IC₅₀>1000 µg/mL). Based on the number and the onset of dead and/or paralysis, as well as the number of thrombus, we found that EADS failed to exhibit antithrombotic activity at the doses of 200, 300, and 400 mg/kg bw. TLC analysis showed that EADS did not contain 2-geranyl-2,3,4,4'-tetrahydroxydihydrochalcone (GTDC), the antiplatelet compound in the ethanolic extract of *A. altilis* leaves (EEDS) in our previous research.

Keywords: *Artocarpus altilis*, platelet aggregation, antithrombotic, Light Transmittance Aggregometry, Acute Pulmonary Thromboembolism

ABSTRAK

Rebusan daun sukun (*Artocarpus altilis*) yang sudah tua secara tradisional digunakan oleh masyarakat Indonesia untuk mengobati penyakit jantung dan stroke. Agregasi platelet dan trombosis merupakan faktor penting pada patofisiologi kedua penyakit tersebut. Penelitian aktivitas antiplatelet dan antitrombosis dari ekstrak air daun sukun (EADS) belum pernah dilaporkan. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antiplatelet dan antitrombosis dari EADS guna memberikan bukti ilmiah terkait pemanfaatannya oleh masyarakat. Ticagrelor, obat antiplatelet yang merupakan agonis dari reseptor P2Y₁₂ digunakan sebagai kontrol positif. Uji aktivitas antiplatelet dilakukan secara in vitro menggunakan metode *Light Transmittance Aggregometry* (LTA) dengan platelet yang diambil dari darah manusia dan digunakan induktor agregasi platelet berupa Adenosin Difosfat (ADP, 10µM). Parameter yang diamati adalah persen penghambatan agregasi platelet. Uji aktivitas antitrombosis dilakukan secara in vivo menggunakan metode *Acute Pulmonary Thromboembolism* (APT) pada mencit jantan dewasa galur Swiss dengan induktor trombosis berupa campuran epinefrin (0,7 mg/kgBB) dan kolagen (11 mg/kgBB). Parameter yang diamati adalah jumlah dan onset kematian, paralisis, serta jumlah trombus berdasarkan analisis histopatologi. Hasil uji menunjukkan bahwa EADS memiliki aktivitas antiplatelet yang lemah (IC₅₀>1000 µg/mL). EADS tidak memiliki aktivitas antitrombosis yang terlihat dari ketidakmampuan dalam melindungi mencit dari paralisis dan/atau kematian serta tidak adanya penurunan jumlah trombus yang bermakna pada mencit yang diberi perlakuan ekstrak dibandingkan kelompok kontrol pelarut. Analisis KLT menunjukkan bahwa EADS tidak mengandung senyawa aktif antiplatelet 2-geranyl-2,3,4,4'-tetrahydroxydihydrochalcone (GTDC) yang ada dalam ekstrak etanol daun sukun (EEDS) pada penelitian sebelumnya.

Kata Kunci: *Artocarpus altilis*, agregasi platelet, antitrombosis, *Light Transmittance Aggregometry*, *Acute Pulmonary Thromboembolism*

PENDAHULUAN

Daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.) Fosberg sin. *A. communis* J.R.Forst. & G.Forst.) secara empiris digunakan oleh masyarakat Indonesia untuk mengobati penyakit jantung dan juga penyakit lain seperti hepatitis, diabetes mellitus, kelainan ginjal, radang, penyakit kulit dan gatal-gatal, hipertensi, asma, kanker, sariawan, demam, dan pegal-pegal (Heyne, 1987; Syamsuhidayat & Hutapea, 1991; Utami & Puspaningtyas, 2013). Penyakit kardiovaskuler, termasuk stroke dan infark miokard, memiliki mekanisme patofisiologi yang melibatkan faktor penting seperti platelet dan agregasinya. Peningkatan agregasi platelet memicu pembentukan trombus yang menyebabkan penyumbatan pembuluh darah di jantung dan otak sehingga terjadi infark miokard atau stroke (Rumbaut & Thiagarajan, 2010).

Penggunaan inhibitor agregasi platelet (antiplatelet) sangat diperlukan pada pasien dengan risiko tinggi terhadap trombosis. Penggunaan obat antiagregasi platelet sering menimbulkan masalah, seperti variabilitas respon antar individu (aspirin), perdarahan lambung, dan polimorfisme genetik (golongan *prodrug* seperti ticlopidin, clopidogrel, prasugrel) (Marco Cattaneo, 2019; Kolandaivelu & Bhatt, 2019; Patrono, 2019; Whitlock *et al.*, 2016). Agen antiagregasi platelet yang sering digunakan adalah aspirin dan clopidogrel, yang dikenal cukup efektif dalam menghambat agregasi platelet. Aspirin mampu mengurangi trombosis arteri namun kurang efektif untuk trombosis vena (Rumbaut & Thiagarajan, 2010). Mekanisme kerja aspirin adalah mengblok secara permanen aktivitas siklooksigenase (COX) atau enzim *Prostaglandin H sintase* (PGHS) 1 dan 2 sehingga mengurangi trombosis melalui penghambatan terbentuknya tromboksan (Patrono, 2019). Variabilitas respon antar individu sering dijumpai pada penggunaan aspirin, sehingga terjadi inefisiensi produksi tromboksan A₂ di platelet. Akibatnya platelet tetap mengalami aktivasi dan agregasi. Aspirin lebih efektif digunakan pada terapi jangka pendek dibandingkan terapi jangka panjang (Patrono, 2019). Selain itu, aspirin memiliki efek samping yaitu erosi mukosa, erosi ulkus dan perdarahan pada lambung (Whitlock *et al.*, 2016).

Antiagregasi platelet lain yang sering digunakan adalah golongan *thienopyridine* yaitu clopidogrel. Mekanisme kerja clopidogrel berbeda dengan aspirin. Clopidogrel merupakan suatu *prodrug* yang harus diubah oleh enzim sitokrom hati (CYP2C19, CYP1A2, CYP2B6) menjadi metabolit aktif yang memiliki aktivitas antiplatelet. Polimorfisme genetik dapat mempengaruhi metabolisme clopidogrel oleh enzim CYP pada setiap individu, sehingga menimbulkan variasi efek terapi yang berbeda. Selain menurunkan respon individu terhadap clopidogrel, hambatan pembentukan metabolit aktif dari clopidogrel juga menyebabkan peningkatan efek samping pada sistem kardiovaskuler (Cattaneo, 2019; Kolandaivelu & Bhatt, 2019). Berbagai permasalahan ini mendasari pentingnya penelitian eksplorasi agen antiplatelet baru.

Beberapa penelitian melaporkan aktivitas antiplatelet dan antitrombosis dari tumbuhan *A. altilis* (sukun). Ekstrak etanol daun sukun (EEDS) memiliki aktivitas hambatan agregasi platelet yang diinduksi oleh adenosin difosfat (ADP) dan asam arakhidonat secara *in vitro*, dan menunjukkan aktivitas antitrombosis pada mencit (Bessi, 2016; Susiani, 2016). Beberapa senyawa golongan flavonoid telah diisolasi dari ekstrak etil asetat daun sukun, diantaranya *8-geranyl-4,5,7-trihydroxyflavone*, yang memiliki aktivitas poten pada platelet yang diinduksi oleh epinefrin dan ADP. Tiga senyawa flavonoid dari akar sukun yaitu *dihydroartemoxanthone*, *artochamins B* dan *artocommunol CC* dilaporkan dapat menghambat agregasi platelet pada

platelet rich plasma (PRP) darah manusia yang diinduksi adrenalin (Weng *et al.*, 2006). Selain aktivitas antiplatelet, fraksi etil asetat daun sukun menurunkan kadar total kolesterol serum dan mencegah akumulasi lemak pada aorta tikus, sehingga berkontribusi dalam pengobatan penyakit kardiovaskuler (Mozef *et al.*, 2011, 2015).

Penelitian aktivitas antiplatelet dan antitrombosis ekstrak air daun sukun (EADS) belum pernah dilaporkan. Pemakaian daun sukun sebagai obat tradisional di masyarakat pada umumnya dengan ekstraksi menggunakan pelarut air, dalam bentuk seduhan atau rebusan. Oleh karena itu, metode pembuatan ekstrak daun sukun pada penelitian ini menggunakan air agar lebih relevan dengan penggunaan tradisional oleh masyarakat. Penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan data dan informasi tentang kemampuan ekstrak air daun sukun dalam menghambat agregasi platelet dan trombosis, sebagai dasar ilmiah terkait penggunaannya untuk pengobatan stroke dan penyakit jantung secara tradisional.

METODE

Alat penelitian

Alat dalam penelitian ini antara lain, Aggregometer Chrono-Log seri 490 2D (Chrono-Log Corporation), *centrifuge* (Dynamica velocity 18R), tabung konikal 15 mL, stir bar & kuvet silikon (Chrono-Log Corporation), mikropipet 10, 100, 1.000, 5.000 μ L (Boeco), *vacutainer disposable & vacutainer needle* ukuran 18 dan 21 gauge (Terumo), *sput needle* 1 mL (BD), timbangan analitik (Mettler Toledo), mikroskop (Olympus), dan kamera mikroskop (Optilab).

Bahan penelitian

Simplisia berasal dari daun sukun Jawa yang sudah tua namun masih berwarna hijau (belum menguning) yang diperoleh dari Kalikotes, Klaten, Jawa Tengah, dan diidentifikasi di Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM dengan surat determinasi nomor 18.12.8/UNI/FFA/BF/PT/2019 tanggal 12 Agustus 2019. Daun sukun disortasi, dicuci, lalu dikeringkan dengan oven suhu 40 °C hingga diperoleh simplisia kering. Simplisia kering dihaluskan menjadi serbuk simplisia (10 mesh). Ekstrak etanol daun sukun (EEDS) dan senyawa isolat *2-geranyl-2,3,4,4'- tetrahydroxy dihydrochalcone* (GTDC) diperoleh dari penelitian sebelumnya (Fakhrudin *et al.*, 2020). Bahan kimia yang digunakan antara lain, silika gel 60 F₂₅₄ (E. Merck), metanol (Merck), *n*-heksana (Merck), etil asetat (Merck), DMSO (Merck), tikagrelor (Brilinta, Astra Zeneca), NaCl (Otsu), akuades (Otsu), natrium sitrat (Sigma), ADP (Sigma), epinefrin (Phapros), dan kolagen tipe I (Chrono-Par Sigma catalog no. 385).

Hewan uji

Penelitian ini menggunakan mencit jantan galur Swiss usia 8 minggu dengan bobot berkisar 25-35 g sebanyak 25 ekor. Mencit terbagi dalam 5 kelompok, masing-masing terdiri lima ekor sesuai perhitungan rumus Frederer (Stevani, 2016). Hewan uji diadaptasi dalam laboratorium selama satu minggu.

Pembuatan ekstrak air daun sukun (EADS)

Ekstrak air dibuat dengan metode seperti yang dilakukan oleh Azli *et al.*, (2018). Serbuk daun sukun diekstraksi dengan metode infusa, suhu ekstraksi 90 °C selama 15 menit dengan beberapa kali pengadukan (BPOM RI, 2008). Filtrat yang diperoleh dikentalkan dengan cara diuapkan di atas penangas air hingga tersisa kurang lebih 25% dari volume sebelumnya. Selanjutnya filtrat dikeringkan dengan cara *freeze drying* sehingga diperoleh ekstrak kering dengan kadar air 3,87%.

Uji aktivitas antiplatelet

Pengujian aktivitas antiplatelet secara *in vitro* dilakukan di Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM pada bulan Januari-Februari 2020. Uji aktivitas *in vitro* menggunakan metode Born yaitu *Light Transmittance Aggregometry* (LTA), dengan alat *Aggregometer Chronolog* untuk mengukur transmisi cahaya pada plasma (GVR Born, 1962; Mousa, 2015). Penelitian ini menggunakan darah manusia yang memenuhi kriteria inklusi yang mengacu pada hasil konsensus *International Society on Thrombosis and Haemostasis* di Cairo pada tahun 2010 (Cattaneo *et al.*, 2013). Darah diambil dari enam orang relawan sebanyak 30 mL tiap orang, kemudian dilakukan sentrifugasi menjadi *platelet rich plasma* (PRP) dan *platelet poor plasma* (PPP). Selanjutnya PRP (492,5 μ L) dan EADS (2,5 μ L) dimasukkan ke dalam kuvet yang sama, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 3 menit. Kuvet kedua diisi PPP (500 μ L) yang digunakan sebagai *baseline*. EADS dilarutkan terlebih dulu dalam DMSO. Induksi agregasi platelet dilakukan dengan cara memasukkan ADP ke dalam kuvet berisi PRP dan EADS sebanyak 5 μ L sehingga konsentrasi ADP dalam kuvet menjadi 10 μ M. Konsentrasi EADS dalam kuvet adalah 30, 100, 200, 400, 600, 800, dan 1.000 μ g/mL. Platelet akan mengalami agregasi karena induksi ADP, sehingga menyebabkan PRP berubah menjadi jernih dan nilai transmisi cahaya pada agregometer meningkat. Nilai transmisi cahaya pada kuvet PPP merepresentasikan agregasi 100% sehingga nilai ini digunakan sebagai *baseline*. Persentase nilai transmisi cahaya berbanding terbalik dengan persentase hambatan agregasi platelet. Kontrol negatif menggunakan DMSO (1%) dalam air, dan kontrol positif menggunakan *Ticagrelor* 100 μ g/mL. Uji dilakukan sebanyak 3 kali ulangan secara *independent* pada hari yang berbeda, selanjutnya diambil nilai rata-rata persen inhibisi tiap kelompok konsentrasi. Nilai persentase penghambatan dihitung dengan rumus persamaan sebagai berikut :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(\% \text{ agregasi pelarut} - \% \text{ agregasi sampel})}{\% \text{ agregasi pelarut}} \times 100\% \quad (\text{Vogel, 2002})$$

Uji aktivitas antitrombosis

Pengujian aktivitas antitrombosis secara *in vivo* dilakukan di laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM pada bulan Januari-Februari 2020. Aktivitas antitrombosis EADS diuji menggunakan metode *Acute Pulmonary Thromboembolism* (APT) yang dikembangkan oleh DiMinno dan Silver dengan modifikasi pada dosis induktor (Chelucci *et al.*, 2014; DiMinno & Silver, 1983; Mekhfi *et al.*, 2012). Masing-masing kelompok mencit mendapatkan perlakuan akuades (kontrol negatif), *Ticagrelor* 11,7 mg/kgBB (kontrol positif), atau EADS dengan dosis 200, 300 dan 400 mg/kgBB sekali sehari secara oral selama 7 hari. Induksi trombosis dilakukan pada akhir perlakuan, dengan menyuntikkan campuran epinefrin 0,7 mg/kgBB dan kolagen 11 mg/kgBB secara bersama-sama sebanyak 100 μ L ke dalam vena ekor mencit (Chelucci *et al.*, 2014; Fakhrudin *et al.*, 2019). Campuran induktor ini menyebabkan trombosis pada seluruh tubuh yang dimulai dari paru dan jantung. Mencit akan tersengal-sengal karena kesulitan bernafas, hingga akhirnya paralisis dan mati. Persentase proteksi terhadap trombosis pada mencit dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Proteksi} = \frac{[1 - (\text{mati} + \text{paralisis})]}{\text{Total}} \times 100\%$$

Mencit yang masih hidup sampai batas waktu akhir percobaan dimatikan dengan cara dilakukan anestesi terlebih dahulu menggunakan ketamin (1 mg/kgBB) kemudian dilakukan dislokasi tulang leher (Nugroho, 2018). Pengamatan profil histopatologi dilakukan pada organ paru, jantung, dan otak, sedangkan analisis statistik hanya dilakukan pada trombus yang ditemukan di paru-paru.

Analisis kromatografi lapis tipis

Analisis kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan untuk mengetahui keberadaan senyawa GTDC pada EADS. Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 F₂₅₄, fase gerak *n*-heksana:etil asetat (2:1 v/v), pereaksi penampak bercak sitroborat untuk mendeteksi keberadaan GTDC (flavonoid tergeranilasi); sebagai pembanding digunakan ekstrak etanol daun sukun (EEDS), dan juga senyawa GTDC yang diperoleh dari penelitian sebelumnya (Fakhrudin *et al.*, 2020).

Analisis data

Data kuantitatif yang diperoleh pada uji *in vitro* (persen inhibisi) dan *in vivo* (persen proteksi dan jumlah trombus) dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Data persen inhibisi dan jumlah trombus dilanjutkan analisis varian (ANOVA) satu arah dan uji Tukey. Data persen proteksi dilanjutkan analisis *Chi square* untuk membandingkan perbedaan antara kelompok perlakuan. Data lain yang berupa gambaran histopatologi jaringan paru dilakukan analisis kualitatif secara deskriptif.

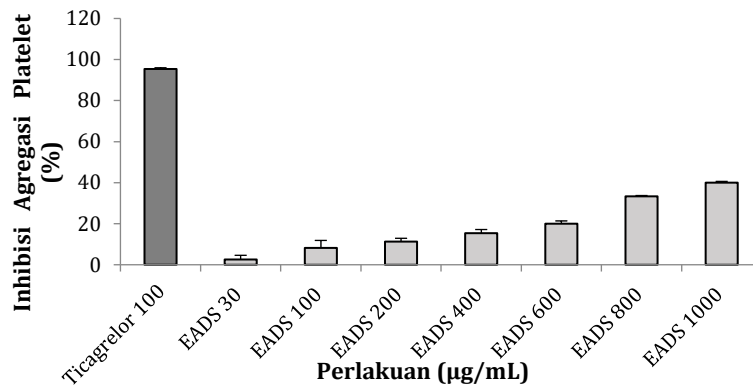
Persetujuan etik

Protokol uji *in vitro* dan *in vivo* dalam penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran dan Kesehatan Masyarakat UGM (nomor KE/FH/0070/EC/2020).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji aktivitas antiplatelet dilakukan pada platelet yang diinduksi ADP sehingga terjadi aktivasi reseptor P2Y₁₂ dan agregasi platelet. Hasil uji *in vitro* menunjukkan hubungan antara kenaikan konsentrasi EADS dengan aktivitas antiplatelet. Pada konsentrasi 1.000 µg/mL, persen penghambatan berkisar 40% (Gambar 1). Dengan demikian aktivitas penghambatan agregasi platelet dari EADS tergolong relatif lemah (IC₅₀>1.000 µg/mL). Pada penelitian ini, *Ticagrelor* (100 µg/mL) mampu memberikan hambatan agregasi platelet sekitar 95%. Hal ini menunjukkan model uji yang digunakan dalam penelitian ini sensitif terhadap agen yang bekerja sebagai antagonis reseptor P2Y₁₂. *Ticagrelor* mampu berikatan langsung dengan reseptor P2Y₁₂ di platelet tanpa melalui proses perubahan menjadi metabolit aktif seperti pada golongan *thienopyridine* (clopidogrel, prasugrel). *Ticagrelor* tidak memerlukan enzim CYP untuk dapat aktif sehingga dapat digunakan pada uji *in vitro* (Cattaneo, 2019; Kolandaivelu & Bhatt, 2019).

Aktivitas antitrombosis dilakukan dengan induksi kombinasi epinefrin dan kolagen, yang memiliki reseptor berbeda sehingga memperkuat proses agregasi platelet. Induksi kedua agen tersebut akan mengaktifasi platelet dalam vena sehingga membentuk agregat yang akan menarik eritrosit dan benang-benang fibrin. Fibrin akan melingkupi agregat sehingga menjadi kokoh dan stabil, yang disebut sebagai trombus. Melalui sistem sirkulasi darah, trombus akan masuk ke dalam jantung, dan dipompa ke dalam paru dan seluruh tubuh. Pembuluh darah paru-paru sebagian besar berupa kapiler berukuran sangat kecil sehingga trombus lebih mudah menyumbat mikrosirkulasi. Penyumbatan ini mengakibatkan terjadinya kegagalan proses transfer O₂ dan CO₂ di dalam alveoli sehingga menimbulkan gagal nafas. Sumbatan mikrosirkulasi paru dan vasokonstriksi akibat lepasnya tromboksan A2 dan prostaglandin (PG) F2 dari platelet yang aktif dapat menyebabkan kematian mencit pada uji *Acute Pulmonary Thromboembolism* (APT) (DiMinno & Silver, 1983).



Gambar 1. Kurva aktivitas antiplatelet EADS. EADS menunjukkan aktivitas antiplatelet yang tergantung kepada konsentrasi uji pada rentang 30-1.000 µg/mL ($IC_{50} > 1000$ µg/mL). Uji dilakukan tiga kali pada setiap kelompok uji dan *error bars* pada persen inhibisi mencerminkan rentang SD.

Penelitian ini menggunakan induktor trombosis berupa campuran epinefrin 0,7 mg/kgBB dan kolagen 11 mg/kgBB sebanyak 100 µL berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Chelucci *et al.*, (Chelucci *et al.*, 2014). Data hasil uji APT berupa jumlah kematian, paralisis dan persen proteksi disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Aktivitas antitrombosis dari EADS pada uji APT menggunakan mencit yang diinduksi kolagen-epinefrin berdasarkan indikator jumlah dan onset terjadinya kematian dan paralisis

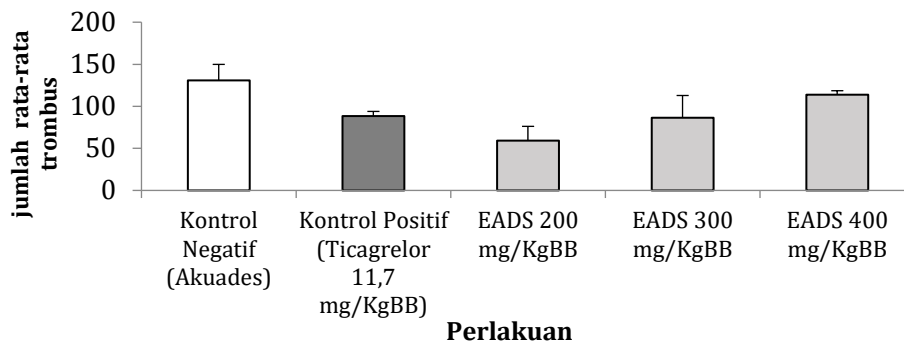
Kelompok dosis (mg/kgBB)	Jumlah mencit mati dan/atau paralisis / total mencit	Persen proteksi (%)	Onset paralisis (detik) Mean ± SD (n ≥ 3)	Onset kematian (detik) rata-rata ± SD (n ≥ 3)
Akuades	3 / 5	40	46 ± 23	340 ± 532
Ticagrelor 11,7	2 / 5	60	45	271
EADS 200	3 / 5	40	103 ± 95	273
EADS 300	2 / 5	60	280	300
EADS 400	3 / 5	40	84 ± 70	187 ± 185

Analisis statistik persen proteksi dengan *Chi Square* ($p < 0,05$) menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan antara kelompok yang diberi EADS dengan kelompok kontrol akuades. Beberapa kelompok tidak memiliki data SD karena jumlah kematian dan/atau paralisis di bawah 3.

Persentase proteksi dan perpanjangan onset paralisis dan kematian menunjukkan kemampuan antitrombosis. Analisis statistik dengan *Chi Square* dari data Tabel 1 menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan di semua kelompok EADS dibandingkan kelompok kontrol. EADS tidak menurunkan onset kematian dan paralisis, sehingga tidak memiliki aktivitas antitrombosis. *Ticagrelor* mampu menurunkan jumlah mencit yang mengalami kematian dan paralisis, namun secara statistik belum menunjukkan signifikansinya. Penelitian dengan jumlah hewan uji yang lebih banyak diperlukan untuk analisis data yang lebih representatif. Selain itu penggunaan mencit sebagai hewan uji dalam penelitian ini memiliki tingkat kesulitan yang tinggi terutama saat induksi trombosis dengan penyuntikan vena ekor mencit yang sangat kecil. Penggunaan hewan uji yang lebih besar, misalnya tikus lebih direkomendasikan.

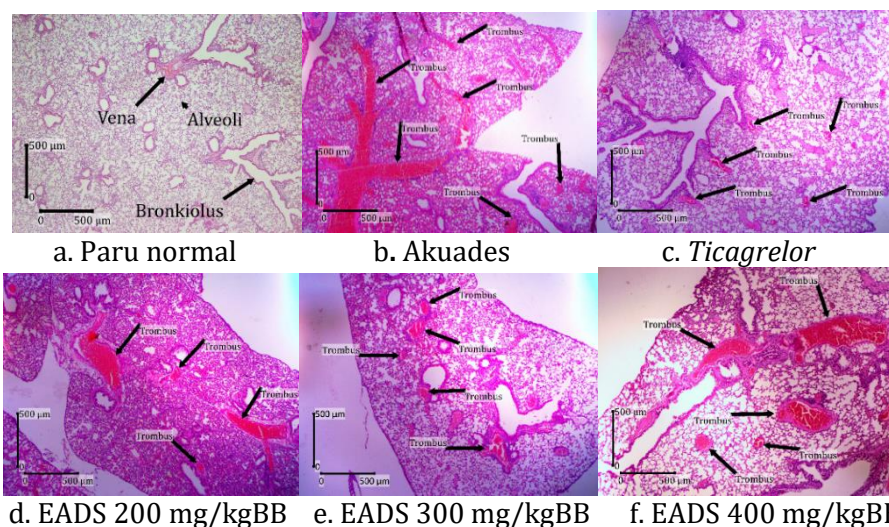
Hasil pengamatan terhadap paralisis dan kematian pada mencit diperkuat dengan analisis terhadap jumlah trombus di semua kelompok perlakuan (Gambar 2). Analisis statistik dengan

ANOVA ($p < 0,05$) menunjukkan pemberian EADS 200, 300, dan 400 mg/kgBB belum mampu menurunkan secara signifikan jumlah trombus pada mencit. Meskipun terlihat pada Gambar 2 bahwa bertambahnya dosis EADS cenderung meningkatkan jumlah trombus, namun angka kenaikan tersebut tidak berbeda signifikan secara statistik dibandingkan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa EADS tidak mampu mencegah terjadinya trombus pada mencit. Hal serupa juga terjadi pada kelompok *Ticagrelor*, walaupun ada kecenderungan jumlah trombus turun namun tidak berbeda signifikan.



Gambar 2. Grafik perbandingan jumlah rata-rata trombus pada semua kelompok uji antitrombosis dengan metode APT pada mencit yang diinduksi epinefrin dan kolagen.

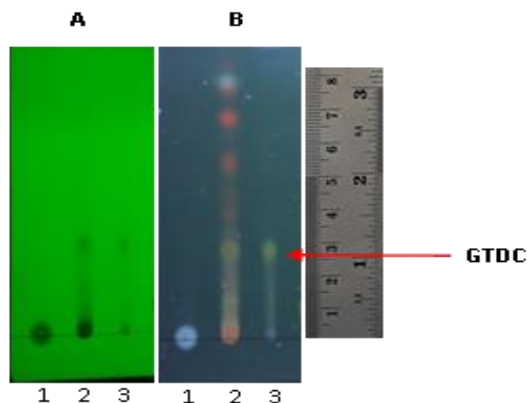
Selanjutnya dilakukan analisis histopatologi organ paru-paru untuk melihat terjadinya trombus pada mencit yang mengalami paralisis dan/atau kematian. Paru-paru merupakan organ yang kaya akan pembuluh darah dengan ukuran yang relatif kecil sehingga rawan terhadap trombus. Organ paru memiliki konsistensi jaringan yang renggang serta memiliki banyak pembuluh darah kapiler, sehingga pengamatan histologis trombus lebih mudah dilakukan dibandingkan pada organ lain. Gambaran terjadinya trombus pada paru mencit disajikan pada Gambar 3. Pada paru-paru mencit normal tidak ditemukan trombus (Gambar 3.A), trombus berukuran sedang hingga besar terdapat pada kelompok kontrol pelarut/akuades (Gambar 3.B), dan juga kelompok yang diberikan EADS (gambar 3.D-F). Trombus berukuran kecil ditemukan pada mencit yang diberi *Ticagrelor* (Gambar 3.C).



Gambar 3. Gambaran histopatologi jaringan paru semua kelompok uji (perbesaran 4x, pewarnaan hematoxilin eosin/HE)

Temuan terkait aktivitas antiplatelet dan antitrombosis dari ekstrak air daun sukun (EADS) berbeda dengan ekstrak etanol daun sukun (EEDS). Penelitian yang dilakukan oleh Bessi (2016), melaporkan bahwa EEDS pada dosis 400 mg/kgBB memiliki aktivitas antitrombosis pada uji APT. Fakhruddin *et al.*, 2020, dengan metode uji yang sama, melaporkan EEDS memiliki aktivitas antiplatelet dengan nilai IC_{50} sebesar $252,23 \pm 6,46 \mu\text{g/mL}$. Penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa senyawa utama dalam EEDS yaitu *2-geranyl-2,3,4,4'-tetrahydroxydihydrochalcone* (GTDC) memiliki aktivitas antiplatelet pada platelet yang diinduksi ADP dengan IC_{50} $9,09 \pm 1,99 \mu\text{M}$. Senyawa tersebut mampu berikatan dengan reseptor $P2Y_{12}$ sehingga menghambat agregasi platelet akibat induksi ADP.

Profil kandungan kimia dalam EADS selanjutnya dianalisis menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). KLT dilakukan dengan fase diam silika gel 60 F₂₅₄, fase gerak *n*-heksana:etil asetat (2:1), dan pereaksi penampak sitroborat (gambar 4). Deteksi bercak senyawa dilakukan dengan sinar UV₂₅₄ nm (Gambar 4.A) dan UV₃₆₆ nm (Gambar 4.B). Bercak berturut-turut adalah (1) EADS, (2) EEDS, (3) Isolat GTDC. Hasil analisis KLT menunjukkan bahwa senyawa GTDC hanya ditemukan pada EEDS, dan tidak ditemukan pada EADS (Gambar 4). GTDC merupakan golongan flavonoid (chalkon) yang ter-geranilisasi. GTDC memiliki rantai samping geranil (10 atom karbon tanpa hidroksi) yang meningkatkan sifat non polarnya, sehingga GTDC tidak tersari dengan air.



Gambar 4. Profil kromatogram hasil analisis KLT kandungan GTDC dalam EADS dan EEDS. (A): Pengamatan dilakukan pada UV₂₅₄ nm; (B): Pengamatan dilakukan pada UV₃₆₅ nm; 1: EADS; 2: EEDS; 3: GTDC

Keberadaan senyawa GTDC diduga menyebabkan perbedaan aktivitas antiplatelet ekstrak EEDS dan EADS. Hal ini menunjukkan bahwa pemanfaatan daun sukun sebagai antiplatelet dan antitrombosis akan lebih tepat jika menggunakan ekstraksi dengan etanol sehingga senyawa GTDC dapat tersari. Aktivitas GTDC sebagai antitrombosis saat ini masih dalam proses investigasi, namun aktivitasnya sebagai antiplatelet sudah diketahui (Fakhruddin *et al.*, 2020). Penelitian lain memperlihatkan hasil bahwa senyawa flavonoid terprenilasi dan tergeranilasi dari daun dan akar sukun memiliki aktivitas antiplatelet (Mozef *et al.*, 2011; Weng *et al.*, 2006). Untuk memperoleh bukti ilmiah dan memastikan efektivitas EADS sebagai agen antiplatelet, perlu dilakukan penelitian lanjutan efek EADS pada jalur lain, seperti reseptor TXA₂, α 2A, penghambatan COX-1, atau penghambatan *protease-activated receptor* (PAR) (Clemetson & Clemetson, 2019; Hayward & Moffat, 2019; Rivera *et al.*, 2009).

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini belum dapat memberikan dasar ilmiah manfaat penggunaan rebusan/seduhan daun sukun dalam pengobatan penyakit jantung dan stroke. EADS memiliki aktivitas yang lemah dalam menghambat agregasi platelet pada platelet yang diinduksi ADP,

dengan nilai $IC_{50} > 1.000 \mu\text{g/mL}$. Hasil uji *in vivo* pada mencit yang diinduksi dengan kombinasi kolagen dan epinefrin menunjukkan bahwa EADS tidak memiliki aktivitas antitrombosis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Tim peneliti mengucapkan terima kasih kepada Deputy Bidang Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset dan Teknologi, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Republik Indonesia atas bantuan pendanaan melalui hibah PDUPT (2733/UN1.DITLIT/DITLIT/PT/2020). Data penelitian ini digunakan oleh Indah Hastuti untuk menyusun tugas akhir untuk gelar Magister Sains. Peneliti juga mengucapkan terima kasih kepada Fakultas Farmasi; dan Pusat Studi Pangan dan Gizi, UGM, Yogyakarta, yang telah menyediakan sarana dan prasarana sehingga penelitian ini dapat diselesaikan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Azli, S. N. S., Bakar, M. F. A., Sanusi, S. B., & Awang-Kanak, F. (2018). Nutritional, phytochemical, antioxidant activity and sensory attributes of herbal infusion from sukun (*Artocarpus altilis*) leaf. *AIP Conference Proceedings 2016*, 020030. <https://doi.org/10.1063/1.5055432>
- Bessi, M. I. T. (2016). Uji Aktivitas Anti Agregasi Platelet dan Anti Trombotik Ekstrak Etanol Daun Sukun (*Artocarpus altilis* (Park.) Fosberg). Tesis. Fakultas Farmasi. Universitas Gadjah Mada.
- Born, GVR. (1962). Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, 1 June 1962, 194:927-929. <https://doi.org/10.1038/194927b0>
- BPOM RI. (2008). *Acuan Sediaan Herbal: Vol. Volume 4* (Edisi Pertama). Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Cattaneo, M., Cerletti, C., Harrison, P., Hayward, C. P. M., Kenny, D., Nugent, D., Nurden, P., Rao, A. K., Schmaier, A. H., Watson, S. P., Lussana, F., Pugliano, M. T., & Michelson, A. D. (2013). Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: A consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 11(6), 1183–1189. <https://doi.org/10.1111/jth.12231>
- Cattaneo, M. (2019). P2Y12 Antagonists. In *Platelets* (pp. 937–956). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813456-6.00051-5>
- Chelucci, R., Dutra, L., Lopes Pires, M., de Melo, T., Bosquesi, P., Chung, M., & dos Santos, J. (2014). Antiplatelet and Antithrombotic Activities of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs Containing an N-Acyl Hydrazone Subunit. *Molecules*, 19(2), 2089–2099. <https://doi.org/10.3390/molecules19022089>
- Clemetson, K. J., & Clemetson, J. M. (2019). Platelet Receptors. In *Platelets* (pp. 169–192). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813456-6.00009-6>
- DiMinno, G., & Silver, M. J. (1983). Mouse Antithrombotic Assay: A Simple Method for the Evaluation of Antithrombotic Agents in VIVO. Potentiation of Antithrombotic Activity by Ethyl Alcohol. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 225(1), 57–59.
- Fakhrudin, N., Pertiwi, K. K., Takubessi, M. I., Susiani, E. F., Nurrochmad, A., Widyarini, S., Sudarmanto, A., Nugroho, A. A., & Wahyuono, S. (2020). A geranylated chalcone with antiplatelet activity from the leaves of breadfruit (*Artocarpus altilis*). *Pharmacia*, 67(4), 173–180. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.67.e56788>
- Fakhrudin, N., Wiyono, T., Putra, A. R., Widyarini, S., & Nurrochmad, A. (2019). The evaluation on anti-platelet and antithrombosis activities of *Cinnamomum sintoc* bark extract. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;43(4).
- Hayward, C. P. M., & Moffat, K. A. (2019). Platelet Aggregation. In *Platelets* (pp. 609–626). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813456-6.00034-5>
- Heyne, K. (1987). *Tumbuhan Berguna Indonesia: Vol. I*. Badan Pengembangan Kehutanan, Departemen Kehutanan, Yayasan Sarana Wanajaya, Jakarta: 593-594.
- Kolandaivelu, K., & Bhatt, D. L. (2019). Novel Antiplatelet Therapies. In *Platelets* (pp. 991–1015). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813456-6.00055-2>
- Mekhfi, H., Belmekki, F., Ziyat, A., Legssyer, A., Bnouham, M., & Aziz, M. (2012). Antithrombotic activity of argan oil: An in vivo experimental study. *Nutrition*, 28(9), 937–941.

- Mousa, S. A. (2015). In Vitro and Ex Vivo Tests of Coagulation and Platelet Function. In F. J. Hock (Ed.), *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays* (pp. 1-27). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27728-3_11-1
- Mozef, T., Risdian, C., Sukandar, E. Y., & Soemardji, A. A. (2015). Bioactivity of Ethyl Acetate Fraction from the Leaves of "Sukun" (*Artocarpus Altilis* (Parkinson) Fosberg) in Preventing Atherosclerosis. *Procedia Chemistry*, 16, 106-112.
- Mozef, T., Soemardji, A., Sukandar, E. Y., & Rachmawati, H. (2011). Potency of a flavonoid isolated from *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg in inhibition of platelet aggregation in hyper-aggregative subjects. *Medicinal Plants - International Journal of Phytomedicines and Related Industries*, 3(Medicinal Plants), 307-310. <https://doi.org/10.5958/j.0975-4261.3.4.051>
- Nugroho, R. A. (2018). *Mengenal Mencit Sebagai Hewan Laboratorium*. Mulawarman University Press.
- Patrono, C. (2019). Aspirin. In *Platelets* (pp. 921-936). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813456-6.00050-3>
- Pertiwi, K. K. (2017). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Utama dari Daun Sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg) dan Uji Aktivitas sebagai Anti Platelet, *Tesis*, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada.
- Rivera, J., Lozano, M. L., Navarro-Nunez, L., & Vicente, V. (2009). Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica*, 94(5), 700-711. <https://doi.org/10.3324/haematol.2008.003178>
- Rumbaut, R. E., & Thiagarajan, P. (2010). Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis. *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function*, 2(1), 1-75. <https://doi.org/10.4199/C00007ED1V01Y201002ISP004>
- Stevani, H. (2016). *Praktikum Farmakologi*. Pusdik SDM Kesehatan, Badan Pengembangan dan Pemberdayaan Sumber Daya Manusia Kesehatan, Kementrian Kesehatan RI.
- Susiani, E. F. (2016). Potensi Ekstrak Etanolik Daun Sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg) sebagai Anti Trombosis dan Anti Agregasi Platelet pada Platelet yang diinduksi Asam Arakhidonat. *Tesis*, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada.
- Syamsuhidayat, S. S., & Hutapea, J. R. (1991). *Inventaris Tanaman Obat Indonesia* (2nd ed.). Departemen Kesehatan RI: Jakarta.
- Utami, P., & Puspaningtyas, D. E. (2013). *The Miracle of Herbs*. AgroMedia: Jakarta.
- Vogel, H. G. (Ed.). (2002). *Drug discovery and evaluation: Pharmacological assays* (2nd completely rev., updated, and enl. ed). Springer.
- Weng, J., Chan, S., Lu, Y., Lin, H., Ko, H., & Lin, C. (2006). Antiplatelet prenylflavonoids from *Artocarpus communis*. *Phytochemistry*, 67(8), 824-829.
- Whitlock, E. P., Burda, B. U., Williams, S. B., Guirguis-Blake, J. M., & Evans, C. V. (2016). Bleeding Risks With Aspirin Use for Primary Prevention in Adults: A Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annals of Internal Medicine*, 164(12), 826. <https://doi.org/10.7326/M15-2112>