



**UJI EFEKTIVITAS DOKSISIKLIN SEBAGAI INHIBITOR MMP-2 DAN  
MMP-9 DALAM PROSES DERMONEKROSIS AKIBAT  
RACUN KUMBANG TOMCAT  
(*Paederus* sp.)**

**SKRIPSI**

Oleh

**Brenda Desy Romadhon  
NIM 122010101036**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**



**UJI EFEKTIVITAS DOKSISIKLIN SEBAGAI INHIBITOR MMP-2 DAN  
MMP-9 DALAM PROSES DERMONEKROSIS AKIBAT  
RACUN KUMBANG TOMCAT  
(*Paederus* sp.)**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran (S.Ked)

Oleh

**Brenda Desy Romadhon  
NIM 122010101036**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**

## **PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Allah SWT yang telah memberi cinta dan kesempatan-Nya kepada saya untuk belajar, berkarya dan mengembangkan ilmu demi kebermanfaatannya bagi orang lain;
2. Bapak dr. Rohmadoni dan Mama drh. Endah Prastiwi yang telah sabar menghantarkan dan membimbing saya tentang arti kehidupan untuk mencari bekal dalam menjalani kehidupan di dunia maupun di akhirat kelak;
3. guru-guru saya dan teman-teman sejak dalam kandungan hingga sekarang yang turut melukiskan kisah di tiap lembar kehidupan ini;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

**MOTO**

dan Dia mendapatimu sebagai seorang yang bingung,  
lalu Dia memberikan  
petunjuk\*

---

\*) Al Qur'an Surat Ad Dhuha ayat 7

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Brenda Desy Romadhon

NIM : 122010101036

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Uji Efektivitas Doksisisiklin sebagai Inhibitor MMP-2 dan MMP-9 dalam Proses Dermonekrosis Akibat Racun Kumbang Tomcat (*Paederus* sp.)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi 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, November 2015

Yang menyatakan,

Brenda Desy Romadhon

NIM 122010101036

**SKRIPSI**

**UJI EFEKTIVITAS DOKSISIKLIN SEBAGAI INHIBITOR MMP-2 DAN  
MMP-9 DALAM PROSES DERMONEKROSIS AKIBAT  
RACUN KUMBANG TOMCAT  
(*Paederus* sp.)**

Oleh

Brenda Desy Romadhon  
NIM 122010101036

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : dr. Al Munawir, M.Kes, Ph.D

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Sugiyanta, M.Ked

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Uji Efektivitas Doksisiklin sebagai Inhibitor MMP-2 dan MMP-9 dalam Proses Dermonekrosis Akibat Racun Kumbang Tomcat (*Paederus* sp.)” telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal : Rabu, 2 Desember 2015

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji

Penguji I,

Penguji II,

Dr.rer.biol.hum.dr. Erma Sulistyaningsih, M.Si

NIP 19770222 200212 2 001

dr. Ulfa Elfiah, M.Kes, Sp.BP-RE

NIP 19760719 200112 2 001

Penguji III,

Penguji IV,

dr. Al Munawir, M.Kes, Ph.D

NIP 19690901 199903 1 003

dr. Sugiyanta, M.Ked

NIP 19790207 200501 1 001

Mengesahkan

Dekan,

dr. Enny Suswati, M.Kes

NIP 19700214 199903 2 001



## RINGKASAN

**Uji Efektivitas Doksisisiklin sebagai Inhibitor MMP-2 dan MMP-9 dalam Proses Dermonekrosis Akibat Racun Kumbang Tomcat (*Paederus sp.*);**  
Brenda Desy Romadhon, 122010101036; 2015: 54 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Dermonekrosis akibat kontak dengan racun kumbang Tomcat (*Paederus sp.*) menyebabkan terjadinya dermatitis paederus dengan gejala berupa rasa gatal, merah, dan melepuh. Awalnya, racun paederin diduga berasal dari tubuh kumbang Tomcat (*Paederus sp.*) yang tergencet. Namun, penelitian terbaru menduga adanya simbiosis antara bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan tubuh kumbang tersebut. *Pseudomonas aeruginosa* diduga mensekresikan enzim metaloproteinase ekstraseluler yakni MMP-2 dan MMP-9 yang mampu mendegradasi komponen matriks ekstraseluler kulit seperti kolagen, gelatin dan elastin. Doksisisiklin merupakan salah satu antibiotik golongan tetrasiklin yang memiliki efek sebagai inhibitor MMP dan antibiotik spektrum luas. Berdasarkan hal tersebut, terapi menggunakan doksisisiklin diharapkan dapat memberi dua efek sekaligus yakni sebagai antibiotik dan inhibitor MMP. Tujuan penelitian ini ialah melakukan uji efektivitas terhadap doksisisiklin sebagai inhibitor MMP-2 dan MMP-9 yang diduga berperan dalam proses dermonekrosis akibat racun kumbang Tomcat (*Paederus sp.*). Hasil penelitian diharapkan menjadi landasan teori dan bahan pertimbangan dokter dalam melakukan terapi pada pasien dermatitis paederus.

Jenis penelitian ini ialah eksperimental murni secara *in vitro* dengan rancangan *post test only control group design*. Penelitian dilakukan mulai September sampai November 2015 di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Sampel dalam penelitian ini ialah tiap sumuran pada gel gelatin 8% yang dianalogikan sebagai kulit manusia. Variabel bebas berupa pemberian racun paederin dan molaritas doksisisiklin sedangkan variabel



terikat berupa densitas pita pada gel yang diukur menggunakan densitometer berupa *software* Image J. Kelompok penelitian terdiri atas kelompok kontrol negatif (hanya racun paederin), perlakuan A (racun paederin+doksisiklin 1 mM), perlakuan B (racun paederin+doksisiklin 10 mM), perlakuan C (racun paederin+doksisiklin 100 mM) dan kelompok kontrol normal (aquades) yang kemudian diuji aktivitas enzim MMP-2 dan MMP-9 menggunakan metode gelatin zimografi.

Ekstraksi racun paederin dilakukan menggunakan metode homogenisasi secara makros dengan pelarut aquades dan didapatkan kadar protein 0,88 µg/µl. Sebanyak 12,32 µg racun paederin kemudian dimasukkan ke dalam setiap sumuran sesuai desain penelitian dan didapatkan penurunan densitas pita MMP-9 pada gel. *Relative optical density* pada kelompok kontrol negatif dianggap memiliki ketebalan 1. Rata-rata ketebalan pita MMP-9 pada kelompok A dan B ialah 0,79±0,045 dan 0,37±0,065 berturut-turut jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Sedangkan kelompok perlakuan C memiliki nilai *relative optical density* sebesar 0 menyamai kelompok kontrol normal. Data tersebut berbeda signifikan pada uji *One Way ANOVA* ( $p < 0,05$ ).

Penelitian ini menunjukkan bahwa MMP-2 dan MMP-9 terbukti berperan dalam mekanisme dermonekrosis akibat racun kumbang Tomcat (*Paederus* sp.). Selain itu, doksisiklin sebagai inhibitor MMP dan antibiotik terbukti efektif menghambat MMP-9 dalam proses dermonekrosis tersebut secara *in vitro*. Dari hasil yang diperoleh perlu dilakukan penelitian lanjutan menggunakan uji zimografi dengan substrat lain dan uji efektivitas doksisiklin dalam sediaan topikal secara *in vivo* terhadap proses dermonekrosis akibat racun kumbang Tomcat (*Paederus* sp.).

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah Swt. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Efektivitas Doksisisiklin sebagai Inhibitor MMP-2 dan MMP-9 dalam Proses Dermonekrosis Akibat Racun Kumbang Tomcat (*Paederus* sp.)”. Skripsi ini disusun untuk melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran (S.Ked).

Skripsi ini tidak mungkin terwujud tanpa bantuan dari banyak pihak. Oleh sebab itu, penulis mengucapkan banyak terima kasih terutama kepada pihak-pihak sebagai berikut.

1. dr. Al Munawir, M.Kes, Ph.D selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Sugiyanta, M.Ked selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian hingga penulisan skripsi ini dapat terwujud;
2. dr.Rini Riyanti, Sp.PK selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing dan memberikan tauladan selama penulis menjadi mahasiswa;
3. DIKTI yang telah mendanai penelitian ini dalam Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) 2014 dan yang telah menyelenggarakan Pekan Ilmiah Mahasiswa Nasional (PIMNAS) 27 di Semarang dan PIMNAS 28 di Kendari;
4. rekan kerja penelitian Putri Erlinda Kusumaningrum, Silvi Ahmada Chasya dan Bagus Indra Kusuma yang telah mendedikasikan tenaga dan pikiran dalam menyelesaikan penelitian kita bersama;
5. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menerima kritik dan saran dari semua pihak dalam hal penyempurnaan skripsi ini. Akhirnya, semoga skripsi ini dapat menambah khasanah ilmu pengetahuan dan bermanfaat bagi masyarakat luas.

Jember, November 2015

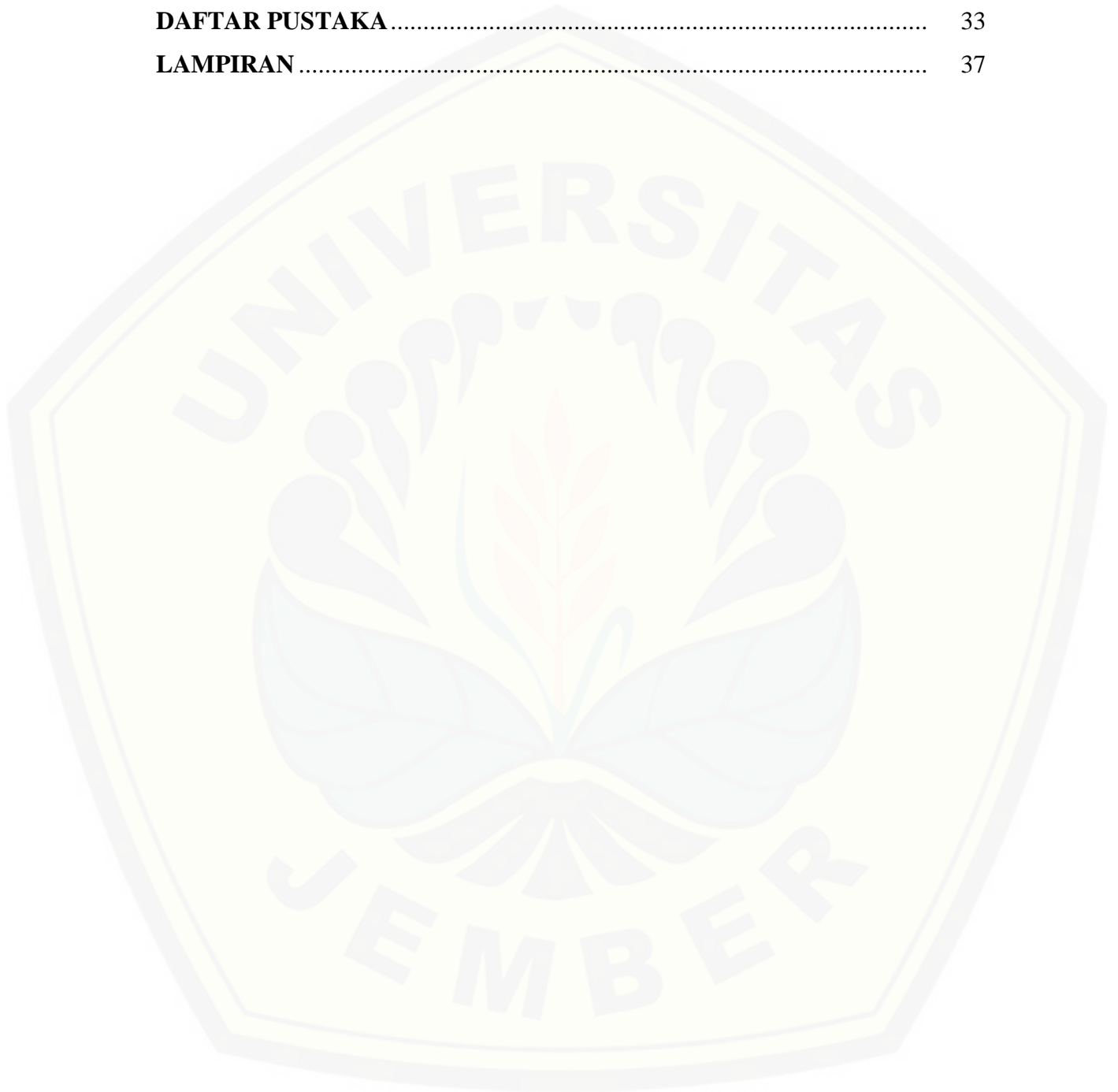
Penulis

**DAFTAR ISI**

<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	i
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>PRAKATA</b> .....	x
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 LatarBelakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	3
<b>1.3 Tujuan</b> .....	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	3
<b>1.4 Manfaat</b> .....	3
1.4.1 Manfaat Keilmuan.....	3
1.4.2 Manfaat Aplikatif.....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
<b>2.1 Kumbang Tomcat (<i>Paederus</i> sp.)</b> .....	4
<b>2.2 Dermatitis Paederus</b> .....	6
<b>2.3 Matriks Metaloproteinase (MMP)</b> .....	8
<b>2.4 Doksisisiklin</b> .....	11

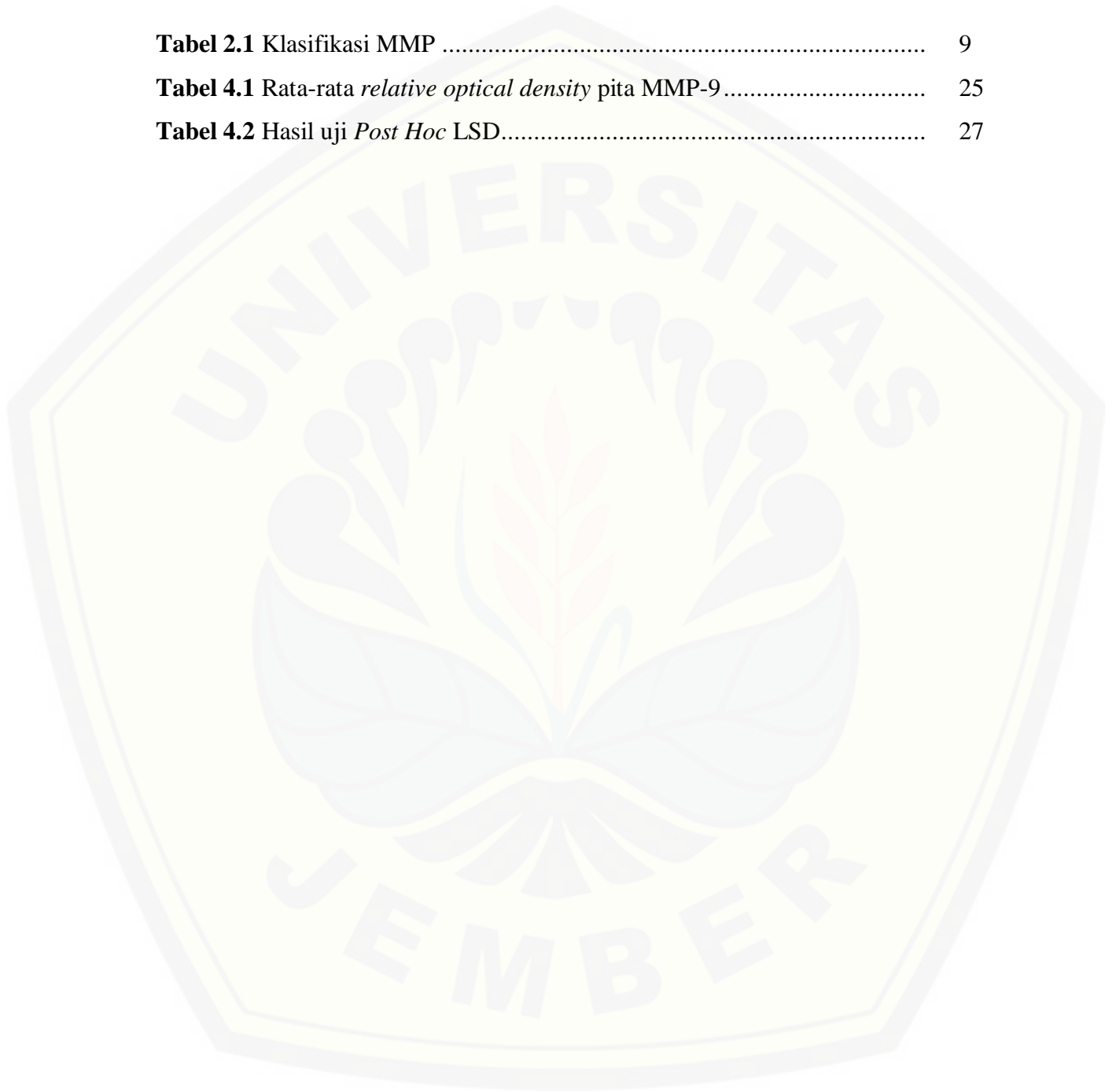
2.5 Metode Deteksi MMP-2 dan MMP-9.....	11
2.6 Kerangka Konseptual.....	13
2.7 Hipotesis.....	14
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>15</b>
3.1 Jenis Penelitian.....	15
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	15
3.3 Sampel Penelitian.....	15
3.4 Variabel Penelitian.....	15
3.4.1 Variabel Bebas.....	15
3.4.2 Variabel Terikat.....	16
3.5 Rancangan Penelitian.....	16
3.6 Definisi Operasional.....	17
3.6.1 Racun Paederin.....	17
3.6.2 Doksisisiklin.....	17
3.6.3 Densitas Gel.....	18
3.7 Alat dan Bahan.....	18
3.7.1 Alat.....	18
3.7.2 Bahan.....	18
3.8 Prosedur Penelitian.....	18
3.8.1 Pencarian Kumbang Tomcat ( <i>Paederus</i> sp.).....	18
3.8.2 Ekstraksi Racun Paederin.....	19
3.8.3 Uji Kadar Protein Bradford.....	19
3.8.4 Pembuatan Larutan Doksisisiklin.....	20
3.8.5 Uji Gelatin Zimografi.....	20
3.9 Analisis Data.....	21
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>22</b>
4.1 Hasil Penelitian.....	22
4.1.1 Kadar Protein Racun Paederin.....	22
4.1.2 Zimogram.....	23
4.2 Analisis Data.....	26
4.3 Pembahasan.....	27

<b>BAB 5. PENUTUP .....</b>	<b>32</b>
<b>5.1 Kesimpulan .....</b>	<b>32</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>32</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>33</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>37</b>



**DAFTAR TABEL**

<b>Tabel 2.1</b> Klasifikasi MMP .....	9
<b>Tabel 4.1</b> Rata-rata <i>relative optical density</i> pita MMP-9 .....	25
<b>Tabel 4.2</b> Hasil uji <i>Post Hoc</i> LSD.....	27





**DAFTAR GAMBAR**

<b>Gambar 2.1</b> Kumbang Tomcat ( <i>Paederus</i> sp.) .....	4
<b>Gambar 2.2</b> Dermatitis paederus .....	6
<b>Gambar 4.1</b> Kurva standar <i>bovine serum albumin</i> (BSA) .....	22
<b>Gambar 4.2</b> Hasil zimografi .....	23
<b>Gambar 4.3</b> Rata-rata ketebalan pita MMP-9 .....	25

**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Lampiran 1.</b> Prosedur Zimografi.....	37
<b>Lampiran 2.</b> Hasil Absorbansi Protein Racun Paederin.....	40
<b>Lampiran 3.</b> Zimogram.....	41
<b>Lampiran 4.</b> Plot Image J MMP-9 .....	43
<b>Lampiran 5.</b> Hasil <i>relative Optical Density</i> .....	46
<b>Lampiran 6.</b> Analisis Statistik.....	47
<b>Lampiran 7.</b> Dokumentasi Kegiatan .....	50
<b>Lampiran 8.</b> Perijinan Komisi Etik .....	53

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Dermonekrosis akibat kontak dengan racun kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) menyebabkan terjadinya suatu penyakit yang disebut dermatitis paederus. Dermatitis paederus dapat terjadi akibat adanya gencetan pada kumbang Tomcat (*Paederus* sp.), sehingga kumbang tersebut menghasilkan racun yang disebut racun paederin. Racun paederin mampu menimbulkan gejala berupa rasa gatal, merah, dan melepuh seperti gejala terbakar pada kulit. Dalam menangani gejala tersebut, dokter cenderung menggunakan kortikosteroid sebagai terapi dermatitis paederus (Kemenkes RI, 2012). Padahal, berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Fakoorziba *et al.* (2011), pengobatan dermatitis paederus menggunakan kortikosteroid tidak efektif karena menyebabkan waktu penyembuhan menjadi lebih lama.

Kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) pertama kali menyerang tahun 1915 di Afrika (Mbonile, 2011). Sejak itu, serangan Tomcat (*Paederus* sp.) terjadi di berbagai belahan dunia termasuk Indonesia. Pada tahun 2008 sampai 2012, tercatat sebanyak 260 warga di Tulungagung, 50 warga Gresik dan 160 warga Surabaya terjangkit dermatitis paederus (Kompas, 2012). Belum ada penelitian maupun data sah dari Dinas Kesehatan mengenai prevalensi terjadinya dermatitis paederus di Indonesia. Jumlah penderita secara konkret pun masih belum diketahui sehingga diduga penderita yang terserang namun tidak tercatat jauh lebih banyak mengingat Indonesia adalah negara agraria dengan sebagian penduduk bermata pencaharian sebagai petani.

Awalnya, racun paederin diduga berasal dari tubuh kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) yang tergencet. Namun, berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Piel *et al.* (2004), gen pada biosintesis racun paederin tidak berasal dari genom kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) itu sendiri melainkan lebih mendekati genom bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Hal ini menunjukkan bahwa racun

paederin bukan berasal dari tubuh kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) melainkan berasal dari bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang bersimbiosis di dalam tubuh kumbang tersebut. Penelitian lain menyebutkan bahwa penggunaan terapi tambahan berupa antibiotik ternyata menghasilkan waktu penyembuhan yang lebih singkat daripada hanya menggunakan kortikosteroid dan antihistamin meskipun mekanisme penyembuhan dengan antibiotik tersebut masih belum diketahui secara pasti (Qadir *et al.*, 2006). Hal ini memperkuat bukti adanya simbiosis antara bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan kumbang Tomcat (*Paederus* sp.).

Menurut Asoodeh dan Musaabadi (2012), *Pseudomonas aeruginosa* mampu mensekresikan enzim metaloproteinase ekstraseluler. Enzim matriks metaloproteinase (MMP) merupakan enzim proteolitik yang memiliki kemampuan mendegradasi matriks ekstraseluler. MMP-2 dan MMP-9 merupakan MMP yang mendegradasi komponen matriks ekstraseluler kulit seperti kolagen, gelatin dan elastin (Setianto *et al.*, 2011; Whittaker dan Ayscough, 2001). Oleh sebab itu, peneliti menduga bahwa enzim MMP-2 dan MMP-9 memiliki peran dalam proses terjadinya dermonekrosis akibat racun paederin.

Doksisiklin merupakan salah satu antibiotik golongan tetrasiklin yang sensitif terhadap bakteri gram positif dan gram negatif. Golongan obat ini dalam dosis rendah sebesar 20 mg telah memiliki efek sebagai MMP inhibitor. Sedangkan dalam dosis tinggi yakni 100 mg, selain memiliki efek MMP inhibitor, doksisiklin juga memiliki efek sebagai antibiotik (Lindeman *et al.*, 2009). Berdasarkan hal tersebut, terapi menggunakan doksisiklin diharapkan dapat memberi dua efek sekaligus yakni sebagai antibiotik dan MMP inhibitor. Doksisiklin juga memiliki resistensi yang rendah sehingga dapat digunakan dalam terapi dermatitis paederus (Kristanti, 2012; Kang *et al.*, 2013). Berdasarkan latar belakang di atas, penulis tertarik untuk meneliti peran MMP-2 dan MMP-9 dalam mekanisme terjadinya dermatitis paederus dan pengobatan yang sesuai untuk penyakit ini secara *in vitro* menggunakan metode gelatin zimografi.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini ialah sebagai berikut.

- a. Apakah MMP-2 dan MMP-9 berperan dalam mekanisme dermonekrosis akibat racun kumbang Tomcat (*Paederus sp.*)?
- b. Apakah penggunaan doksisisiklin dapat menghambat proses dermonekrosis akibat racun kumbang Tomcat (*Paederus sp.*) secara *in vitro* dengan metode gelatin zimografi?

## 1.3 Tujuan

### 1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini ialah melakukan uji efektivitas doksisisiklin sebagai inhibitor MMP-2 dan MMP-9 yang diduga berperan dalam proses dermonekrosis akibat racun kumbang Tomcat (*Paederus sp.*).

### 1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini ialah:

- a. membuktikan bahwa MMP-2 dan MMP-9 berperan dalam mekanisme dermonekrosis akibat racun kumbang Tomcat (*Paederus sp.*),
- b. membuktikan bahwa penggunaan doksisisiklin mampu menghambat dermonekrosis akibat racun kumbang Tomcat (*Paederus sp.*) sehingga dapat digunakan sebagai terapi spesifik dalam pengobatan dermatitis paederus.

## 1.4 Manfaat

### 1.4.1 Manfaat Keilmuan

Penelitian ini dapat dijadikan landasan teori dan sebagai dasar pengembangan penelitian selanjutnya khususnya dalam bidang kedokteran dan toksikologi.

### 1.4.2 Manfaat Aplikatif

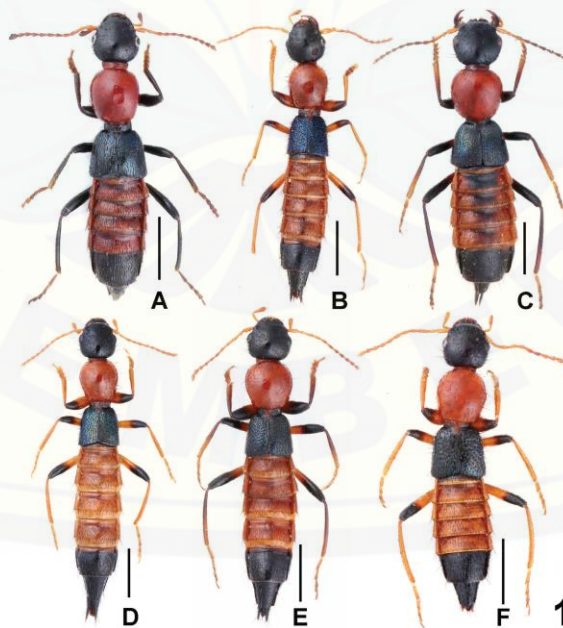
Penelitian ini dapat dijadikan bahan pertimbangan dokter dalam melakukan terapi pada pasien dermatitis paederus.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kumbang Tomcat (*Paederus* sp.)

Kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) merupakan salah satu serangga yang mampu menyebabkan timbulnya lesi dermatitis pada kulit manusia. Terdapat tiga famili serangga yang mampu menimbulkan lesi tersebut, yakni *Meloidae*, *Oedemeridae* dan *Staphylinidae*. Kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) sendiri merupakan serangga yang berasal dari famili *Staphylinidae*, ordo *Coleoptera*, kelas *Insecta* dan termasuk dalam serangga endemik di kawasan Asia Tenggara (Khan *et al.*, 2009). Kumbang ini memiliki ukuran tubuh yang kecil yakni berkisar kurang dari 1 cm dengan bentuk tubuh yang pipih dan berbulu halus. Kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) dapat diidentifikasi secara mudah karena memiliki warna dasar coklat dengan garis-garis coklat kemerahan dan hitam pada ekornya. Ekor kumbang ini berbentuk khas yakni berbentuk runcing dan akan dinaikkan seperti kalajengking ketika kumbang ini merasa terancam.



**Gambar 2.1** Kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) (Peng *et al.*, 2015)



Kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) merupakan kumbang yang memiliki kemampuan berjalan cepat dan dapat terbang. Hal ini ditunjukkan dengan ukuran kaki yang cukup panjang sehingga memungkinkan kumbang ini berjalan cepat di habitatnya. Selain itu, kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) juga memiliki kemampuan terbang dalam jarak dekat. Meskipun dapat terbang, sayap yang dimiliki oleh kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) tidak sempurna dan berwarna gelap bahkan tidak terlihat.

Kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) merupakan kumbang yang aktif pada malam hari (*nocturnal aktif*). Selain itu, kumbang ini bersifat fototaksis atau mendekati cahaya. Hal ini yang menyebabkan kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) sering memasuki rumah warga pada malam hari terutama saat periode pasca panen ketika habitat kumbang ini telah musnah akibat proses panen.

Habitat kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) ialah tempat-tempat lembab seperti persawahan dan pepohonan di hutan. Oleh sebab itu, kelompok yang paling sering terkena racun paederin ialah petani dan tentara. Selain itu, serangan kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) pun paling sering terjadi pada musim penghujan yakni April hingga awal September (Fakoorziba *et al.*, 2011). Serangan kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) sangat bergantung pada tempat, musim dan cuaca.

Kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) memiliki racun pada tubuhnya yang disebut sebagai racun paederin. Racun ini terdapat baik pada tubuh kumbang betina maupun kumbang jantan. Bahkan, pada fase imago maupun larva juga ditemukan kandungan racun ini (You *et al.*, 2003). Awalnya, racun paederin diduga berasal dari tubuh kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) yang tergenet. Namun, berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Piel *et al.* (2004), gen pada biosintesis racun paederin tidak berasal dari genom kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) itu sendiri melainkan lebih mendekati genom bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Hal ini menunjukkan bahwa racun paederin bukan berasal dari tubuh kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) melainkan berasal dari bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Berdasarkan hal tersebut, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* diduga bersimbiosis di dalam tubuh kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) sehingga dapat menghasilkan racun paederin yang dapat merusak kulit.

Berdasarkan Khan *et al.* (2009), racun paederin berada pada permukaan tubuh kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) sehingga kontak antara kulit dan kumbang ini berpotensi menimbulkan lesi pada kulit. Racun paederin memiliki rumus kimia  $C_{24}H_{45}O_9N$ . Rumus tersebut didominasi unsur H yang bersifat sangat asam sehingga bersifat korosif dan mampu mengiritasi permukaan kulit (Singh dan Ali, 2007). Bahkan menurut You *et al.* (2003), racun paederin memiliki sifat yang lebih toksik jika dibandingkan dengan racun kobra.

## 2.2 Dermatitis Paederus

Dermatitis merupakan suatu peradangan atau iritasi pada kulit, baik pada epidermis atau dermis sebagai respon terhadap faktor-faktor internal maupun eksternal. Sedangkan Paederus adalah nama genus dari hewan kumbang Tomcat (*Paederus* sp.), dalam bahasa Inggris dikenal dengan nama *rove beetles* atau kumbang penjelajah. Oleh sebab itu, dermatitis paederus atau bisa disebut juga dermatitis linier memiliki definisi berupa iritasi akut pada kulit yang disebabkan oleh senyawa beracun yang terdapat pada tubuh kumbang Tomcat (*Paederus* sp.).



**Gambar 2.2** Dermatitis paederus (AOCD, tanpa tahun)

Gejala dermatitis paederus yang timbul pada kulit disebabkan oleh adanya kontak kulit dengan racun yang ada pada kumbang tomcat, yaitu racun paederin. Racun paederin dikeluarkan dari tubuh kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) bukan melalui sengatan ataupun gigitan, melainkan karena tubuh kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) tergencet atau tidak sengaja ditekan. Kulit yang terkena racun paederin baik secara langsung maupun tidak langsung (melalui tangan, handuk, baju, alat yang tercemar racun) dapat melepuh dan disertai rasa gatal. Hal ini karena racun paederin dengan rumus kimia  $C_{24}H_{45}O_9N$  yang didominasi unsur H bersifat sangat asam sehingga bersifat korosif dan mampu mengiritasi permukaan kulit (Singh dan Ali, 2007).

Karakteristik lesi akibat dermatitis paederus ialah berupa lesi eritema akut berbentuk vesikel dan pustul pada daerah yang mengalami inflamasi. Proses yang terjadi pada dermatitis paederus diawali oleh penetrasi racun paederin ke dalam kulit yang intact sehingga menyebabkan reaksi inflamasi pada kulit. Kulit kemudian berubah menjadi eritema dengan sensasi terbakar. Tanda klinis ini dapat dideteksi pertama kali setelah 24-72 jam pasca kontak dengan racun paederin dan dapat disebut sebagai periode laten. Setelah beberapa hari, vesikel yang terbentuk dapat berkembang menjadi bula dalam rentang waktu 7-15 hari. Setelah itu, lesi berubah menjadi krusta dan mengering hingga terlepas dari kulit dan meninggalkan bercak hiperpigmentasi sampai berbulan-bulan (Fakoorziba *et al.*, 2011).

Bagian tubuh yang sering mengalami lesi akibat racun paederin ialah bagian tubuh yang mudah dan sering terpapar dunia luar seperti leher, lengan, kepala dan wajah. Selain itu, terdapat kondisi *mirror image lesions* atau *kissing lesions* yakni lesi yang terjadi di bagian lain tubuh yang tidak terkontaminasi racun paederin akibat tersentuhnya bagian tubuh tersebut dengan lesi yang terjadi di tubuh yang berlawanan. Racun paederin pun dapat merusak kulit di bagian sensitif tubuh misalnya mata dan genital (Davidson *et al.*, 2009). Hal ini menunjukkan bahwa baik kontak langsung maupun tidak langsung antara racun paederin dan kulit berpotensi menyebabkan munculnya dermatitis paederus.



Diagnosis terhadap dermatitis paederus dapat ditegakkan melalui pengamatan terhadap gambaran lesi serta riwayat kontak dengan serangga Tomcat (*Paederus* sp.). Diagnosis pasti penyakit ini tergolong sulit karena tidak semua pasien dapat mengidentifikasi keberadaan kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) pada kulitnya disebabkan ukuran kumbang ini yang tergolong kecil. Selain riwayat kontak, kejadian dermatitis paederus yang sering terjadi pada musim penghujan juga dapat dijadikan sebagai patokan dalam merujuk diagnosis dermatitis paederus. Penyakit ini pun memiliki beberapa diagnosis banding yang memiliki gambaran klinis serupa seperti herpes simplex, herpes zoster, luka bakar, reaksi alergi, dan dermatitis kontak iritan (Khan *et al.*, 2009).

Pengobatan yang paling sering digunakan oleh dokter dalam menangani dermatitis paederus ialah penggunaan kortikosteroid topikal (Kemenkes RI, 2012). Padahal, berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Fakoorziba *et al.* (2011), pengobatan dermatitis paederus menggunakan kortikosteroid pada tikus tidak efektif karena menyebabkan waktu penyembuhan menjadi lebih lama. Penelitian lain juga menyebutkan bahwa penggunaan terapi tambahan berupa antibiotik ternyata menghasilkan waktu penyembuhan yang lebih singkat daripada hanya menggunakan kortikosteroid dan antihistamin meskipun mekanisme penyembuhan dengan antibiotik tersebut masih belum diketahui secara pasti (Qadir *et al.*, 2006). Selain itu, antibiotik yang biasanya diresepkan untuk dermatitis paederus lebih bertujuan sebagai pencegahan terhadap infeksi sekunder yang mungkin terjadi (Khan *et al.*, 2009).

### 2.3 Matriks Metaloproteinase (MMP)

Matriks metaloproteinase atau MMP merupakan enzim protease yang mampu mendegradasi matriks ekstraseluler seperti kolagen, elastin, gelatin, matriks glikoprotein dan proteoglikan. Enzim ini diproduksi dalam keadaan tidak aktif atau pro-MMP sehingga dibutuhkan aktivasi enzim terlebih dahulu agar enzim ini dapat bekerja. Pro-MMP dapat diaktifkan oleh ion kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dan zink ( $\text{Zn}^{2+}$ ) pada pH netral. Ion logam tersebut berperan sebagai kofaktor yang berikatan pada enzim dan berfungsi sebagai katalisator proses enzimatik yang

terjadi. Aktivasi MMP terjadi di lingkungan ekstraselluler atau di permukaan sel (Maitra *et al.*, 2003).

MMP yang telah ditemukan hingga saat ini ialah sebanyak 26 jenis MMP yang dapat dibagi lagi berdasarkan spesifisitas substratnya yakni kolagenase, gelatinase, stromielisin, dan matrilisin. Jenis MMP dapat dilihat pada Tabel 2.1.

**Tabel 2.1** Klasifikasi MMP

No.	MMP No.	Class	Enzyme
1	MMP-1	Collagenases	Collagenase-1
2	MMP-8		Neutrophill collagenase
3	MMP-13		Collagenase-3
4	MMP-18		Collagenase-4
5	MMP-2	Gelatinases	Gelatinase-A
6	MMP-9		Gelatinase-B
7	MMP-3	Stromelysins	Stromelysin-1
8	MMP-10		Stromelysin-2
9	MMP-11		Stromelysin-3
10	MMP-27		Homology to stromelysin-2 (51,6%)
11	MMP-7	Matrilysins	Matrilysin (PUMP)
12	MMP-26		Matrilysin-2
13	MMP-14	MT-MMP (membrane type)	MT1-MMP
14	MMP-15		MT2-MMP
15	MMP-16		MT3-MMP
16	MMP-17		MT4-MMP
17	MMP-24		MT5-MMP
18	MMP-25		MT6-MMP
19	MMP-12	Other enzymes	Macrophage metalloelastase
20	MMP-19		RASI 1
21	MMP-20		Enamelysin
22	MMP-21		MMP identified on chromosome 1
23	MMP-22		MMP identified on chromosome 1
24	MMP-23		From human ovary cDNA
25	MMP-28		Epilysin
26	MMP-29		Unnamed

Sumber : Verma dan Hansch (2007)

MMP merupakan endopeptidase yang dihasilkan oleh berbagai *connective tissue* dan sel *pro-inflammatory* di dalam tubuh seperti fibroblast, osteoblast, sel endotel, makrofag, neutrofil, dan limfosit. Sel *non-inflammatory* seperti fibroblast, sel endotel, dan sel epitel mampu menghasilkan MMP-1, MMP-2, dan atau MMP-9. Sedangkan sel inflamasi seperti PMN dan makrofag kebanyakan menghasilkan MMP-8 dan MMP-9 (Maitra *et al.*, 2003).

MMP memiliki berbagai peran dalam proses fisiologis maupun patologis di dalam tubuh. Beberapa proses fisiologis yang melibatkan MMP ialah proses angiogenesis, apoptosis, implantasi, *remodeling* tulang, perkembangan janin, dan proses penyembuhan luka. Selain itu, banyak pula proses patologis yang melibatkan MMP yakni arthritis, aterosklerosis, kanker, ulkus gaster, metastasis, periodontitis dan lain-lain. Munculnya proses patologis yang diperantarai oleh MMP disebabkan adanya ketidakseimbangan produksi MMP di dalam tubuh. Produksi MMP diatur oleh hormon, *growth factor*, sitokin, inhibitor MMP endogen (MMPIs) dan inhibitor jaringan MMPs (TIMPs). Kelebihan ekspresi MMP akan menghasilkan ketidakseimbangan antara aktivitas MMPs dan TIMPs yang dapat menyebabkan timbulnya berbagai kondisi patologis yang telah disebutkan sebelumnya (Verma dan Hansch, 2007).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Piel *et al.* (2004), gen pada biosintesis racun paederin tidak berasal dari genom kumbang Tomcat (*Paederus sp.*) itu sendiri melainkan lebih mendekati genom bakteri gram negatif *Pseudomonas aeruginosa*. Hal ini menunjukkan bahwa racun paederin bukan berasal dari tubuh kumbang Tomcat (*Paederus sp.*) melainkan berasal dari bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang bersimbiosis di dalam tubuh kumbang tersebut. Pada penelitian lain disebutkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* menghasilkan enzim proteolitik yaitu matriks metaloproteinase (MMP) meskipun masih belum diketahui secara spesifik MMP yang berperan (Asoodeh dan Musaabadi, 2012).



#### 2.4 Doksisisiklin

Doksisisiklin adalah salah satu jenis obat dari tetrasiklin, merupakan basa yang sukar larut dalam air akan tetapi mudah larut ketika dalam bentuk garam natrium dan garam HCl-nya. Obat golongan tetrasiklin selain memiliki sifat antimikroba juga memiliki kemampuan menghambat sitokin dan mediator protease pada *cascade* inflamasi. Doksisisiklin merupakan salah satu obat golongan tetrasiklin yang paling poten (Maitra *et al.*, 2003). Kelebihan doksisisiklin dari golongan tetrasiklin lain adalah kemampuan obat ini untuk diabsorpsi lebih dari 90% dan penyerapannya tidak dipengaruhi oleh makanan. Doksisisiklin juga tidak memiliki kontraindikasi pada pasien dengan gangguan ginjal karena mengalami metabolisme di hati (Gunawan, 2012).

Doksisisiklin sebagai antibiotik bersifat bakteristatik dengan cara menghambat sintesis protein bakteri pada ribosomnya. Selain itu, resistensi doksisisiklin sebagai antibiotik masih rendah sehingga memungkinkan untuk diberikan pada pasien dengan dermatitis paederus. Dosis untuk mendapatkan efek sebagai antibiotik adalah 100 mg sekali atau dua kali sehari (Katzung, 2012).

Doksisisiklin juga dapat memberikan efek penekanan aktivitas kolagenase pada dosis 20 mg dua kali per hari. Doksisisiklin menghambat aktivitas MMP dengan melakukan ikatan pada ion  $\text{Ca}^{2+}$  sehingga menyebabkan enzim tidak berfungsi. Dengan kemampuannya sebagai inhibitor MMP, doksisisiklin memberikan efek positif terhadap waktu penyembuhan luka yang lebih singkat. Aktivitas doksisisiklin sebagai kolagenase telah diketahui, namun belum ada penelitian mengenai aktivitas doksisisiklin terhadap gelatinase (Katzung, 2012; Kristanti, 2012).

#### 2.5 Metode Deteksi MMP-2 dan MMP-9

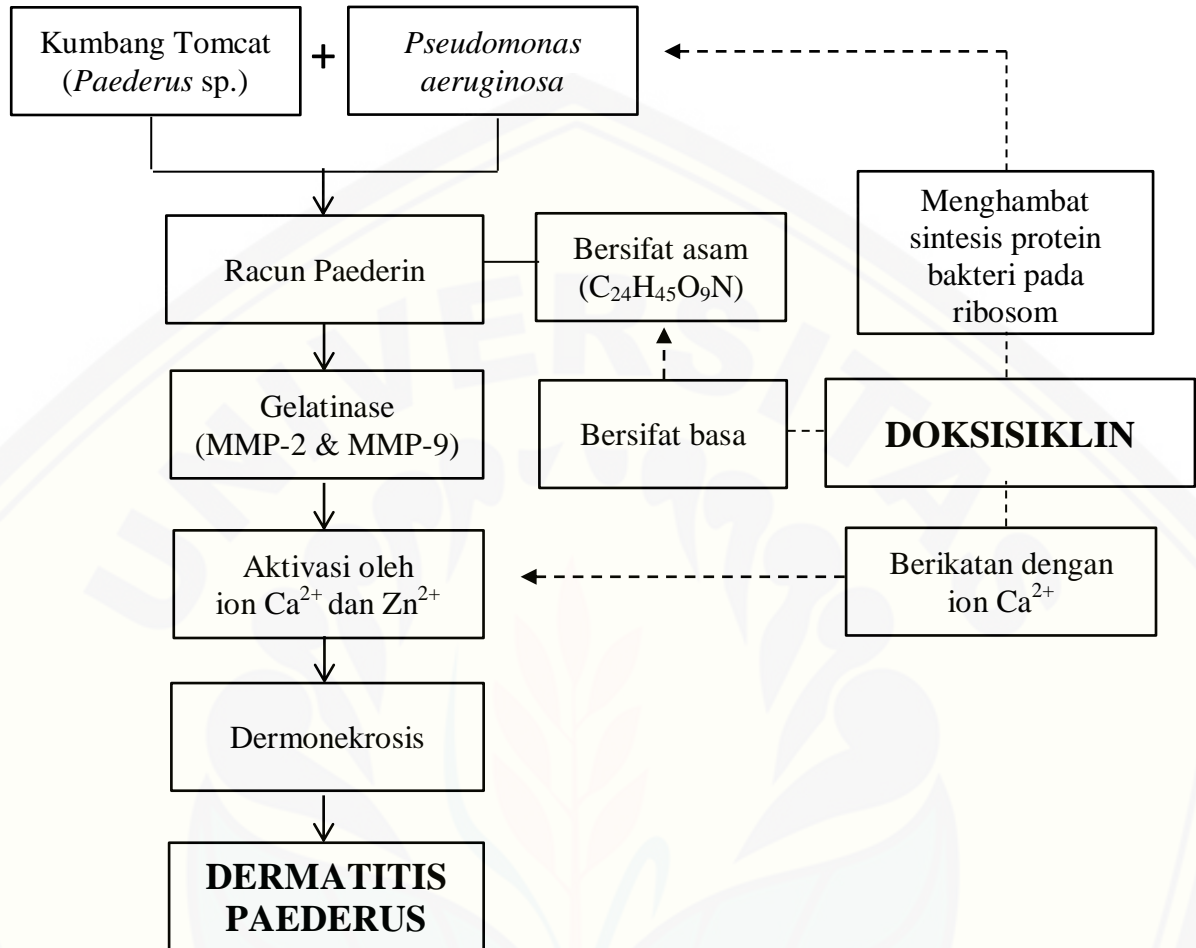
Terdapat beberapa metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi MMP-2 dan MMP-9. Metode tersebut terdiri atas metode gelatin zimografi, imunoblotting, dan ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). Ketiga metode yang telah disebutkan tersebut memiliki prinsip kerja, kelebihan dan kekurangan masing-masing.

Gelatin zimografi merupakan metode yang biasa digunakan dalam mendeteksi gelatinase (MMP-2 dan MMP-9). Metode ini tergolong sederhana, cukup sensitif dan bersifat semi kuantitatif dalam mendeteksi MMP-2 dan MMP-9 (Hu dan Beeton, 2010). Bahan yang diuji dapat berasal dari supernatan hasil kultur sel, urin, serum dan bahan uji lain yang dipercaya mengandung MMP-2 dan MMP-9. Bahan tersebut kemudian di *running* pada gel SDS-PAGE (*Sodium Dodesil Sulfat Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) yang mengandung gelatin sebagai substrat MMP-2 dan MMP-9. Enzim MMP-2 dan MMP-9 akan mencerna substrat gelatin tersebut sehingga menghasilkan pita berwarna putih yang memperlihatkan kemampuan enzim dalam mencerna substratnya.

Metode kedua yang sering digunakan ialah teknik imunoblotting khususnya *western blotting*. Prinsip kerja metode ini ialah interaksi antara antigen dan antibodi. Protein yang akan dideteksi seperti MMP-2 dan MMP-9 dianggap sebagai antigen yang akan dikenali oleh antibodi yang spesifik terhadap protein tersebut. Antibodi yang digunakan dapat bersifat monoklonal ataupun poliklonal. Antibodi monoklonal lebih dianjurkan karena memiliki spesifitas yang lebih tinggi karena hanya mampu mengikat satu protein spesifik. Namun, dengan alasan yang sama, hal tersebut menjadi kekurangan antibodi monoklonal akibat sensitifitas yang lebih rendah jika dibandingkan dengan antibodi poliklonal (GE Healthcare, 2014). Istilah *blotting* digunakan untuk menunjukkan proses *blot* protein yang telah dipisahkan melalui SDS-PAGE pada suatu membran *nitroselulosa* ataupun membran PVDF. Metode imunoblotting ini memberi informasi tentang ukuran protein dalam skala kilodalton dan ekspresi protein jika dibandingkan dengan kontrol (Shimokawa *et al.*, 2002).

Metode ketiga ialah metode ELISA yang memiliki prinsip yang mirip dengan imunoblotting yakni interaksi antara antigen dan antibodi. Berbeda dengan dua metode sebelumnya, deteksi MMP-2 dan MMP-9 menggunakan ELISA menghasilkan data kuantitatif jumlah MMP-2 dan MMP-9 (Tutton *et al.*, 2003). Alat ukur yang digunakan ialah spektrofotometer yang memiliki prinsip pengukuran berdasarkan perhitungan absorbansi zat akibat adanya perbedaan warna dengan panjang gelombang tertentu.

2.6 Kerangka Konseptual



Keterangan:

-----> : menghambat

Simbiosis antara kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) dan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* menyebabkan terbentuknya racun paederin yang bersifat asam sehingga korosif terhadap kulit. Selain itu, diduga racun paederin tersebut mengandung gelatinase yang terdiri atas MMP-2 dan MMP-9 yang dihasilkan oleh bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. MMP-2 dan MMP-9 akan aktif apabila berikatan dengan ion  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Zn}^{2+}$ . Sifat korosif dan aktivasi gelatinase ini akan menyebabkan timbulnya gejala dermatitis paederus.

Doksisiklin merupakan antibiotik yang bersifat basa dan memiliki kemampuan inhibisi terhadap MMP. Sifat basa pada doksisiklin akan menetralkan sifat asam pada racun paederin sehingga dapat mencegah kerusakan pada kulit. Doksisiklin berperan aktif dalam menghambat sintesis protein pada ribosom bakteri sehingga antibiotik ini memiliki efek bakteriostatik pada *Pseudomonas aeruginosa* yang termasuk bakteri dengan tingkat koresistensi yang tinggi terhadap antibiotik. Doksisiklin juga berikatan dengan ion  $\text{Ca}^{2+}$  sehingga hal ini akan menyebabkan enzim gelatinase tidak dapat teraktivasi. Ketiga aktivitas ini menyebabkan doksisiklin mampu menghambat proses dermonekrosis akibat racun kumbang Tomcat (*Paederus* sp.).

## 2.7 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini ialah sebagai berikut.

- a. MMP-2 dan MMP-9 berperan dalam mekanisme dermonekrosis akibat racun kumbang Tomcat (*Paederus* sp.).
- b. Doksisiklin dapat menghambat proses dermonekrosis akibat racun kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) secara *in vitro* dengan metode gelatin zimografi.

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental murni (*true experimental design*). Penelitian dilakukan secara *in vitro* dengan rancangan *post test only control group design*.

### 3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan September sampai dengan bulan November 2015. Pencarian kumbang Tomcat (*Paederus sp.*) dilakukan di daerah persawahan Desa Antirogo Kabupaten Jember. Uji laboratorium yang terdiri atas ekstraksi racun paederin, pengukuran kadar protein, pembuatan larutan doksisisiklin, dan uji zimografi dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

### 3.3 Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini ialah tiap sumuran pada gel gelatin 8% yang dianalogikan sebagai kulit manusia. Racun paederin yang diekstraksi dari tubuh kumbang Tomcat (*Paederus sp.*) kemudian dimasukkan ke dalam sumuran gel tersebut untuk melihat proses dermonekrosis yang terjadi.

### 3.4 Variabel Penelitian

#### 3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini ialah:

- a. pemberian racun paederin, dan
- b. molaritas doksisisiklin.

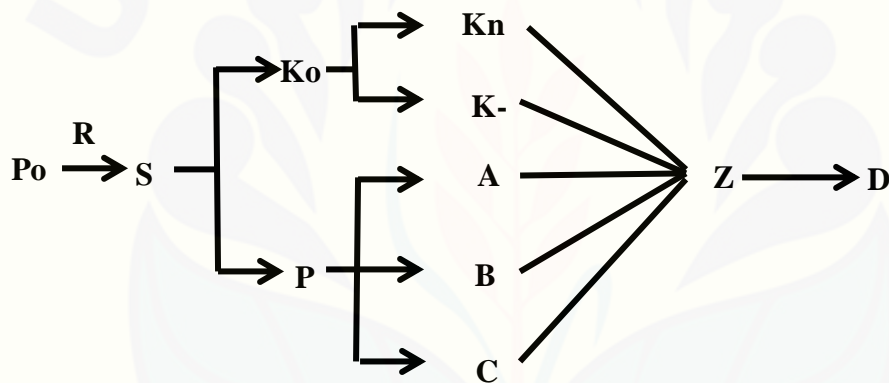


### 3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini berupa densitas pita pada gel yang diukur menggunakan densitometer berupa *software* Image J.

### 3.5 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang dilakukan ialah *post test only control group design*. Pada penelitian ini, sampel dibagi menjadi dua kelompok yakni kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Jumlah perlakuan pada penelitian ini ialah sebanyak tiga perlakuan dengan pengulangan sebanyak tiga kali pada tiap perlakuan. Rancangan penelitian dapat dilihat pada skema berikut.



Keterangan :

Po : Gel gelatin 8%

R : Randomisasi

S : Tiap sumuran pada gel gelatin 8%

Ko : Kelompok kontrol

P : Kelompok perlakuan

Kn : Kelompok kontrol normal berisi aquades dan tanpa pemberian racun paederin

K- : Kelompok kontrol negatif dengan pemberian racun paederin dan tanpa doksisisiklin



- A : Kelompok perlakuan A dengan pemberian racun paederin dan doksisisiklin 1 mM
- B : Kelompok perlakuan B dengan pemberian racun paederin dan doksisisiklin 10 mM
- C : Kelompok perlakuan C dengan pemberian racun paederin dan doksisisiklin 100 mM
- Z : Uji zimografi
- D : Data densitas gel

### 3.6 Definisi Operasional

#### 3.6.1 Racun Paederin

*Stock* racun pederin didapatkan melalui ekstraksi racun dari tubuh kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) dengan metode homogenisasi secara makros menggunakan mortar dengan pelarut aquades. Perbandingan jumlah kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) dan aquades ialah sebanyak 5 ekor kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) dalam 1 ml aquades. Suspensi racun kemudian disentrifuge dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit dan diambil bagian supernatan. Supernatan tersebut selanjutnya dilakukan pengukuran kadar protein menggunakan uji Bradford dengan standar *bovin serum albumin* (BSA) 1 µg/µl sehingga didapatkan racun dengan konsentrasi yang ditunjukkan dalam satuan µg/µl.

#### 3.6.2 Doksisisiklin

Doksisisiklin yang digunakan ialah doksisisiklin *hyclate* yang merupakan sediaan doksisisiklin *pro analisis* berbentuk serbuk dengan berat molekul (Mr) sebesar 1025,89 yang berasal dari Sigma Aldrich, Singapura. Doksisisiklin *hyclate* merupakan bentuk garam HCl dari doksisisiklin sehingga sediaan ini bersifat terlarut dalam air. Serbuk doksisisiklin *hyclate* dilarutkan di dalam aquades sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 1 mM, 10 mM, dan 100 mM.

### 3.6.3 Densitas gel

Densitas gel merupakan ketebalan pita hasil uji zimografi pada gel *acrilamide* 8% yang mengandung gelatin. Densitas gel diukur menggunakan densitometri berupa *software* Image J sehingga dihasilkan data semi-kuantitatif berupa perbandingan ketebalan pita antara kelompok perlakuan dan kontrol negatif yang ditampilkan dalam bentuk *relative optical density*.

## 3.7 Alat dan Bahan

### 3.7.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas perangkat elektroforesis, *shaker*, wadah plastik, laptop yang telah diinstall *software* Image J, *handscoon*, mortar, mikropipet *blue tip*, *yellow tip*, *white tip*, eppendorf, *high speed sentrifuge*, *vortex*, *mikroplate*, *elisa reader*, aluminium foil, *incubator*, dan *software* Microsoft excel.

### 3.7.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah kumbang Tomcat (*Paederus* sp.), es batu, aquades, doksisisiklin *hyclate*, *bovine serum albumin*, larutan Bradford, *acrylamide gel* 8%, gelatin, *running buffer*, Triton X-100, *development buffer*, *Comassie Blue*, dan methanol.

## 3.8 Prosedur Penelitian

### 3.8.1 Pencarian Kumbang Tomcat (*Paederus* sp.)

Pencarian kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) dilakukan di habitat kumbang tersebut yaitu area persawahan di antara dedaunan padi. Metode penangkapan menggunakan cara manual menggunakan tangan yang telah dilengkapi dengan alat pelindung diri berupa *handscoon*. Identifikasi kumbang dilakukan dengan melihat morfologi khas kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) yaitu ukuran tubuh yang kecil (<1 cm), pipih, berbulu halus, berwarna dasar coklat dengan garis-garis coklat kemerahan dan hitam pada ekornya yang berbentuk runcing.

### 3.8.2 Ekstraksi Racun Paederin

Berdasarkan metode yang dilakukan oleh You *et al.* (2003) yang dimodifikasi, ekstraksi kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) dilakukan dengan menghancurkan *whole body* kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) menggunakan mortar. Pelarut yang digunakan ialah aquades dengan perbandingan 5 ekor kumbang Tomcat (*Paederus* sp.) dalam 1 ml aquades. Suspensi yang didapat kemudian disentrifuge dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit sehingga didapatkan supernatan yang berisi racun paederin. Seluruh proses ekstraksi dilakukan dalam suhu 4°C untuk mencegah degradasi protein yang dapat terjadi akibat peningkatan suhu.

### 3.8.3 Uji Kadar Protein Bradford

Uji Bradford merupakan suatu uji untuk mengukur konsentrasi protein total dalam suatu larutan. Uji ini melibatkan pewarna Coomassie Brilliant Blue (CBB) yang berikatan dengan protein dalam suatu larutan yang bersifat asam sehingga memberikan warna kebiruan. Karena menghasilkan warna, uji ini dapat diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometri. Protein standar yang digunakan ialah *bovin serum albumin* (BSA) dengan konsentrasi yang telah diketahui yakni 1 µg/µl. Langkah kerja pengukuran kadar protein racun paederin ialah sebagai berikut.

1. Siapkan 5 eppendorf yang masing-masing diisi dengan protein *bovin serum albumin* (BSA) 1 µg/µl sebanyak 0 µl, 5 µl, 10 µl, 15 µl dan 20 µl dan 2 eppendorf yang masing-masing diisi dengan racun paederin sebanyak 10 µl dan 20 µl.
2. Tambahkan larutan Bradford pada tiap eppendorf tersebut hingga mencapai volume total 1 ml.
3. Vortex kemudian tutup dengan aluminium foil dan inkubasi selama 15 menit dalam suhu 37° C.
4. Ambil larutan tersebut sebanyak 100 µl dan masukkan kedalam mikroplate kemudian lihat absorbansi protein dengan panjang gelombang 595 nm pada ELISA reader.

5. Masukkan data absorbansi protein *bovin serum albumin* (BSA) di Microsoft Excel untuk mengetahui grafik dan persamaannya sebagai kurva standar.
6. Masukkan data absorbansi racun paederin pada persamaan kurva standar sehingga didapatkan kadar protein racun paederin dalam satuan  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

#### 3.8.4 Pembuatan Larutan Doksisisiklin

Doksisisiklin *hyclate* ditimbang menggunakan timbangan mikro dan dilarutkan di dalam aquades sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 1 mM, 10 mM, dan 100 mM. Larutan tersebut kemudian di *vortex* dan disentrifuge dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit sehingga didapatkan supernatan yang mengandung doksisisiklin *hyclate* yang telah terlarut sepenuhnya di dalam aquades. Perhitungan molaritas larutan doksisisiklin *hyclate* didapatkan melalui rumus sebagai berikut.

$$M = \frac{Mr}{V}$$

Keterangan :

M : Molaritas ( g/l)

Mr : Massa molekul relatif ( gram)

V : Volume (liter)

#### 3.8.5 Uji Gelatin Zimografi

Zimografi adalah teknik elektroforesis untuk mendeteksi protease di dalam suatu sampel sedangkan gelatin zimografi merupakan elektroforesis yang bertujuan secara spesifik mendeteksi enzim gelatinase yakni MMP-2 dan MMP-9. Oleh sebab itu, gel yang digunakan mengandung gel *acrilamide* 8% dan substrat gelatin sebanyak 20 mg/ml. Sebelumnya, doksisisiklin *hyclate* dicampur dengan racun paederin sesuai konsentrasi tiap perlakuan di dalam eppendorf. Setelah itu, larutan ditambah dengan *loading buffer* dengan perbandingan volume 1:1 dan kemudian di inkubasi selama 15 menit pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ . Larutan kemudian dimasukkan ke dalam sumuran pada gel elektroforesis menggunakan *white tip* berujung tipis. Elektroforesis dilakukan di dalam *running buffer* dengan tegangan